

**Reaktion von Streß-Proteinen
auf Ozon und UV-B Strahlung bei Tabak
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und cv. Bel B)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Michaela Thalmair
aus
München
Januar 1996

Teile der vorliegenden Arbeit sind zur Publikation eingereicht worden:

Thalmair M, Bauw G, Thiel S, Döhring T, Langebartels C, Sandermann H (1996)

Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. J Plant Physiol, im Druck

Siefert F, Thalmair M, Langebartels C, Sandermann H, Grossmann K (1996)

Epoxiconazole-induced stimulation of the antifungal hydrolases chitinase and β -1,3-glucanase in wheat. Phytopathology, eingereicht

Die Dissertation wurde am 19.01.1996 bei der Ludwig-Maximilians-Universität München eingereicht und am 4.03.1996 von der Fakultät für Biologie angenommen.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Sandermann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.1996

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung

1

- 1. Potentielle globale Klimaveränderungen und ihre Ursachen
- 1.1. Zunahme von O₃ und CO₂ in der Troposphäre
- 1.2. Abnahme von stratosphärischem O₃
- 1.3. Zunahme der troposphärischen UV-B Einstrahlung

1

1

1

3

- 2. Reaktionen von Pflanzen auf mögliche Parameter globaler Klimaveränderungen

5

- 2.1. Effekte von erhöhten O₃ und CO₂ - Konzentrationen
- 2.2. Effekte von erhöhter UV-B Strahlung
- 2.3. Interaktionen von O₃ und UV-B

5

7

- 3. Pflanzliche Untersuchungssysteme

10

- 3.1. Reaktionen im Kompartiment Apoplast/Zellwand

10

- 3.2. Modellsystem sortenabhängiger O₃-Toleranz:
Nicotiana tabacum L. cv. Bel W3 und Bel B

12

- 4. Pathogenesis-related (PR) - Proteine von Pflanzen

13

- 4.1. Überblick

13

- 4.2. Charakterisierung von β -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3)

16

- 4.2.1. Reaktionen von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen auf O₃, UV-B und CO₂

17

- 5. Themenstellung

19

II. Material und Methoden

- 1. Material

21

- 1.1. Geräte

21

- 1.2. Chemikalien

21

- 1.3. Verbrauchsmaterial

21

- 1.4. Pflanzenmaterial

22

- 2. Anzucht von Tabakpflanzen

22

- 3. Schadgasbehandlung von Tabakpflanzen

22

- 3.1. Ozonerzeugung und -analyse

22

- 3.2. Expositionsküvetten

23

- 3.3. Behandlung von Tabakpflanzen mit O₃

23

3.4.	Bonitur von Blattschäden	23
3.5.	Behandlung von Tabakpflanzen mit O ₃ und NO ₂ bzw. mit Ethylen	23
3.6.	Behandlung von Tabakpflanzen mit CO ₂	24
3.7.	Behandlung von Tabakpflanzen mit O ₃ und/oder <i>Botrytis cinerea</i>	24
4.	Behandlung von Tabakpflanzen mit UV-B und/oder O ₃	24
5.	O ₃ -Exposition von Tabakpflanzen im Freiland	26
6.	Gewinnung von interzellulärer Waschflüssigkeit (IWF)	29
7.	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	29
8.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	29
8.1.	Oxalatoxidase-Aktivität	29
8.2.	β-1,3-Glucanase-Aktivität	30
8.3.	Chitinase-Aktivität	31
9.	Bestimmung von ACC und MACC	31
10.	Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen	32
10.1.	Trenn-Prinzip	32
10.2.	Pipettierschema	32
10.3.	Probenvorbereitung und Auftrennungsparameter	33
10.4.	Färbemethoden	34
11.	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen-Seren	34
11.1.	Immunisierung von Kaninchen gegen β-1,3-Glucanase und Chitinase	36
11.2.	Serum-Präparation aus Kaninchenblut	37
11.3.	Gewinnung von polyklonalen Antikörpern (ex vivo) aus Kaninchen-Serum	37
11.4.	Präparation biotinylierter Antikörper	38
12.	Nachweis von Enzymkonzentrationen mittels immunologischer Testverfahren (ELISA / Western blotting)	38
12.1.	Herstellung der Rohextrakte	38
12.2.	ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)	38
12.2.1.	Coating	39
12.2.2.	Blocking	40
12.2.3.	„Wasch“-Schritte	40
12.2.4.	Antigen-Applikation	40
12.2.5.	Biotinylierter Antikörper	40

12.2.6.	Streptavidin-konjugierte alkalische Phosphatase	40
12.2.7.	Zugabe des Substrates für die alkalische Phosphatase	40
12.3.	Rocket-Immunelektrophorese	42
12.3.1.	Herstellung der Agarose-Gele	43
12.3.2.	Horizontale Elektrophorese und Gelfärbung	43
12.4.	Western blotting	44
12.4.1.	Elektrophoretisches Blotting	44
12.4.2.	Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen	44
12.4.3.	Inkubation mit dem ersten (spezifischen) Antikörper	45
12.4.4.	„Wasch“-Schritte	45
12.4.5.	Inkubation mit dem zweiten (unspezifischen) Antikörper	45
12.4.6.	Farbreaktion	45
13.	Charakterisierung von Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Mikrosequenzierung	46
13.1.	Protein-Extraktion	46
13.1.1.	Gesamtextrakte	46
13.1.2.	Interzelluläre Waschflüssigkeit	47
13.2.	Zweidimensionale Gelelektrophorese	47
13.3.	Protein-Electroblotting	49
13.4.	Enzymatischer <i>in situ</i> Verdau von Membran-gebundenen Proteinen	50
13.5.	Auftrennung der Peptide mittels Reversed-Phase HPLC	50
13.6.	Aminosäuresequenz-Analyse	51

III. Ergebnisse

1.	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv. Bel W3 und Bel B: Kultivarspezifische Unterschiede in der Entwicklung Ozon- abhängiger Blattschäden	52
2.	Proteinmuster der Tabakkultivare Bel W3 und Bel B (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	53
2.1.	Proteinbanden der interzellulären Waschflüssigkeit (IWF)	53
2.2.	Peptidsequenzen des Bel B spezifischen Proteins bei 21 kDa	54
3.	Ozon-abhängige Veränderungen auf Proteinebene	56
3.1.	Proteinmuster der IWF	57
3.1.1.	Charakterisierung von O ₃ -related Proteinen bei 25 und 26 kDa	57
3.1.1.1.	Proteinbanden	57

3.1.1.2.	Sequenzen	58
3.1.1.3.	Enzymaktivität	59
3.1.2.	Charakterisierung von O ₃ -related Proteinen bei 4, 28 und 35 kDa	61
3.1.2.1.	Proteinbanden	61
3.1.2.2.	Sequenzierung des 28 kDa Proteins und immunologischer Nachweis als saure Chitinase	64
3.2.	Proteine in Gesamtblattextrakten	65
3.2.1.	Immunologischer Nachweis von Chitinase und β-1,3-Glucanase	65
3.2.1.1.	Effekte des Fungizids Epoxiconazol auf die Proteingehalte von Chitinase und β-1,3-Glucanase	72
3.2.1.2.	Vergleich der Effekte von O ₃ -Behandlung und <i>Botrytis cinerea</i> -Infektion auf die Proteingehalte an Chitinase und β-1,3-Glucanase	74
3.2.2.	Ozonabhängige Veränderungen des Proteinmusters bei ein- und zweidimensionaler Auftrennung	75
3.2.3.	Sequenzierungsergebnisse	81
4.	Ozon- und UV-B -bedingte morphologische und biochemische Effekte	82
4.1.	Symptome nach O ₃ - und UV-B-Behandlung	83
4.2.	Enzymatische Aktivität der β-1,3-Glucanase	87
4.3.	Immunologischer Nachweis von β-1,3-Glucanase und Chitinase	90
4.4.	Effekte von erhöhtem CO ₂ auf die Enzymaktivität der β-1,3-Glucanase	94
5.	UV-B -abhängige Veränderungen (Morphologie, Biochemie)	95
5.1.	Variation der spektralen Bestrahlungsstärke	95
5.2.	Symptome bei verschiedenen UV-B Bestrahlungsstärken	97
5.3.	Aktivität der Enzyme β-1,3-Glucanase und Chitinase	101
5.4.	Proteinmuster und Sequenzierungsergebnisse von Gesamtblatt- extrakten nach UV-B Behandlung verschiedener Bestrahlungs- stärke	104
5.5.	Proteinmuster der IWF	108
6.	Freilandversuche (Fürth/Odenwald)	109
IV.	Diskussion	116
V.	Zusammenfassung	141
VI.	Literatur	144

Abkürzungen

ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure
BSA	Bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
CHCl ₃	Trichlormethan (Chloroform)
CO ₂	Kohlen(stoff)dioxid
cv	Kultivar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOC	Desoxycholat
DTE	Dithioerythrol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter immunologischer Nachweis)
EPOKA	Expositionskammern der GSF
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
HCl	Salzsäure
H ₂ O dest	Destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IWF	Interzelluläre Waschflüssigkeit
kDa	Kilo-Dalton
LfU	Bayerisches Landesamt für Umweltschutz
Lsg.	Lösung
MACC	N-malonyl-ACC
MeOH	Methanol
N ₂	Stickstoff (flüssig oder gasförmig)
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge
O ₂	Sauerstoff
O ₃	Ozon
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
POD	Peroxidase
PR	Pathogenesis-Related
rpm	Rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
Rubisco	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase
SDS	Sodium-dodecyl-sulphate (Natriumdodecylsulfat)
se	Standardfehler
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
TCA	Trichloroacetic acid (Trichloressigsäure)
Temed	N, N, N', N' Tetramethylenethyldiamin
TFA	Trifluoroacetic acid (Trifluoressigsäure)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett

I. Einleitung

1. Potentielle globale Klimaveränderungen und ihre Ursachen

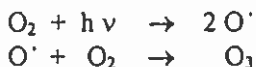
Das kontinuierliche Wachstum der Weltbevölkerung resultiert in verstärkter Emission von Abgasen aus Landwirtschaft, Industrie und Verbrennungsprozessen fossiler Energieträger. Dies führt zu Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Atmosphäre. Erhöhte Konzentrationen individueller Gase bzw. Strahlung wie UV-B haben entweder direkte biologische Effekte zur Folge oder sie beeinflussen in ihrer Gesamtheit das globale Klima, indem sie z.B. durch Rückstrahlung von Sonnenenergie zur Erwärmung der Atmosphäre und Erhöhungen der globalen Temperatur (sog. „Treibhauseffekt“), veränderten Niederschlagsmustern und verlängerten Vegetationszeiten führen können (Kley und Klockow, 1989).

1.1. Zunahme von O₃ und CO₂ in der Troposphäre

Veränderungen der Konzentrationen von troposphärischem O₃ und CO₂ sind Bestandteil der Diskussion über eine globale Klimaveränderung (Watson et al., 1990). Zur Abschätzung der globalen Entwicklung gibt es verschiedene numerische Klimamodelle (s. Enquete-Kommission, 1991). Die Konzentration von CO₂ ist seit Beginn des Industriezeitalters von 280 µl/l auf 350 µl/l angestiegen (Bazzaz, 1990). Ebenfalls anthropogen bedingt ist die während der letzten 100 Jahre im globalen Jahresdurchschnitt von ca. 10-20 nl/l auf 30-40 nl/l signifikant angestiegene Konzentration von troposphärischem O₃ (Kley und Volz-Thomas, 1990). Dieses entsteht aus Vorläufersubstanzen wie Stickstoffoxiden und Kohlenwasserstoffen (z.B. Terpenen) unter Lichteinwirkung (Photooxidation) und ist Hauptbestandteil des sog. „Sommersmogs“.

1.2. Abnahme von stratosphärischem O₃

O₃ entsteht in der Stratosphäre aus Sauerstoffmolekülen (O₂) unter Einwirkung der Sonnenstrahlung (Wellenlänge < 240 nm):



Im Gleichgewicht mit der stratosphärischen Ozonbildung findet jedoch dort auch ein ständiger photolytischer Ozonabbau durch Absorption von UV-Strahlung (Wellenlänge < 320 nm) statt. Durch besonders in den letzten drei Jahrzehnten in die Stratosphäre gelangende Fluorchlorkohlenwasserstoffe (FCKW) (z.B. aus Kälte- oder Lösemitteln) wird jedoch dieses Gleichgewicht zwischen

Ozonbildung und -abbau verschoben. Dadurch findet ein verstärkter, sehr komplexer, heterogen-katalytischer Abbauprozess von Ozon durch Chloratome statt, die durch energiereiche UV-Strahlung aus den FCKW freigesetzt werden. Dieser durch FCKW ausgelöste stratosphärische Ozonabbau ist Ursache für das „Ozonloch“, das zuerst über der Antarktis beobachtet wurde und dort in den letzten Jahren immer größere Ausmaße annimmt (Enquete Kommission, 1994). Auch außerhalb des „Ozonloches“ wurde z.B. am Hohenpeißenberg in den 70er und 80er Jahren eine Ozon-Abnahme in der Stratosphäre und eine Ozon-Zunahme in der Troposphäre beobachtet (s. Abb. 1). Am Hohenpeißenberg gemessene Ozon-Trends sind in Abb. 1 für den Zeitraum von 1967 bis 1990 dargestellt. Der Ozonrückgang in der Stratosphäre im Höhenbereich um etwa 22 km betrug im vergangenen Jahrzehnt ca. 0.5 % pro Jahr (Enquete Kommission, 1994). Zu berücksichtigen ist, daß der troposphärische Ozon-Anstieg (s. 1.1.) seit Ende der 80er Jahre abflacht (s. Abb. 1) bzw. seit Beginn der 90er Jahre an vielen Stationen kein weiterer Anstieg mehr zu beobachten ist (s. Abb. 2 für Neuherberg bei München).

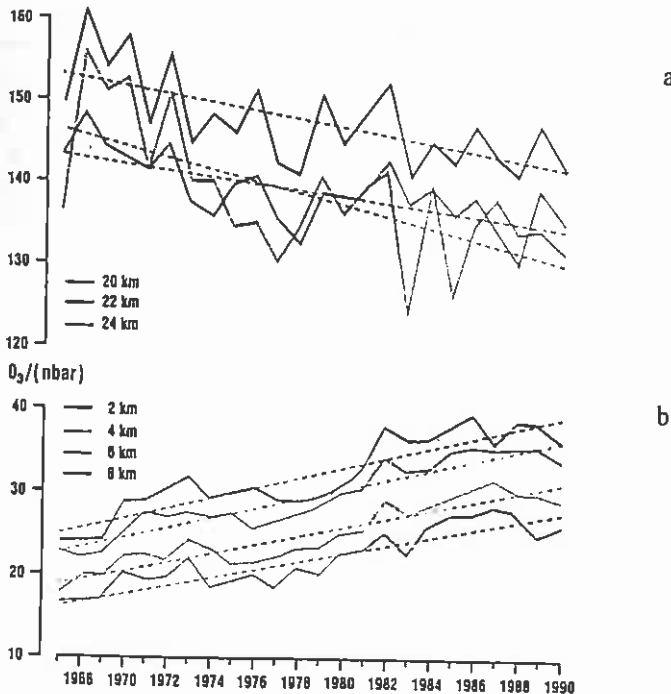


Abb. 1

Abb. 1: Ozon-Trends in verschiedenen Höhen der Stratosphäre (a) und der Troposphäre (b) für den Zeitraum von 1967 bis 1990, Meteorologisches Observatorium Hohenpeißenberg (aus Enquete Kommission, 1994; Wege und Vandersee, 1991)

[n/l]

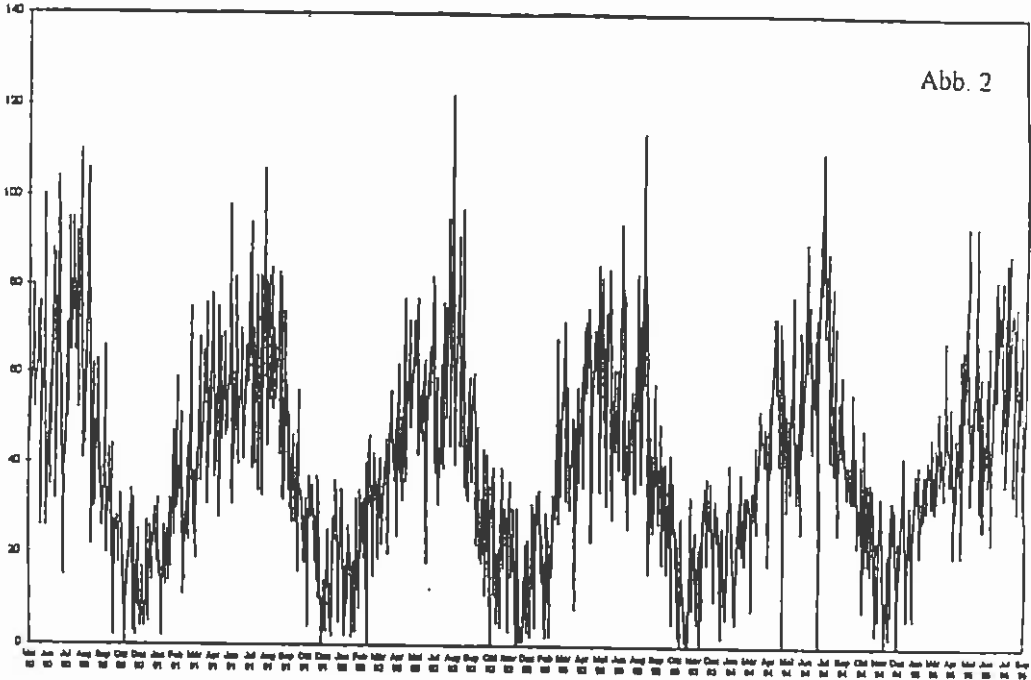


Abb. 2: Tägliche Ozonmaxima (30 min) der Jahre 1990-1995 in Neuherberg bei München (freundlicherweise von Herrn Strube, EPOKA, zur Verfügung gestellt)

1.3. Zunahme der troposphärischen UV-B Einstrahlung

Als ultraviolette Strahlung bezeichnet man den Wellenlängenbereich zwischen 200 und 400 nm. Dieser wird weiter unterteilt in die Bereiche UV-C (200-280 nm), UV-B (280-315 (320) nm) und UV-A (315 (320) - 400 nm) (Tevini, 1993).

Früher wurde für den Übergangsbereich von UV-B zu UV-A vorwiegend 320 nm, heute wird eher 315 nm angegeben (Tevini, 1993). Durch die Abnahme der schützenden stratosphärischen Ozonschicht (s. 1.2.) nimmt die Menge an UV-B Strahlung, die die Erdoberfläche erreicht, zu (Teramura, 1990; Kerr und McElroy, 1993). Das Spektrum der Sonnenstrahlung verändert sich durch Verschiebung der UV-Absorptionskante hin zu kürzeren Wellenlängen (s. Abb. 3). Die Schnittpunkte der Spektren bei $10^{-1} \text{ mW m}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ Bestrahlungsstärke werden nach Döhring et al. (1996) als „cut-off“-Wellenlängen bezeichnet.

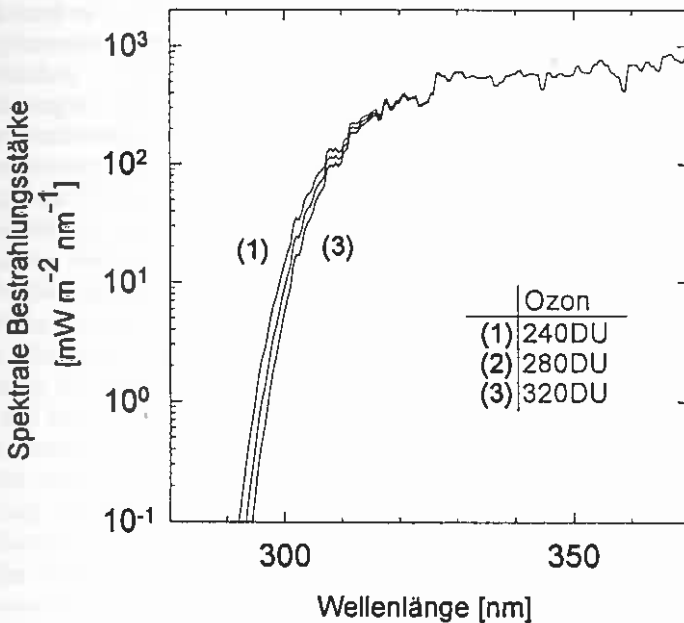


Abb. 3: Verschiebung der Absorptionskanten der terrestrischen Sonnenstrahlung (nach Köfferlein et al., 1995); Berechnung für unterschiedliche Ozonschichtdicken von 240, 280 und 320 DU (60° Sonnenhöhe); 1 DU (Dobson Unit) = 2.69×10^{20} Moleküle $\text{O}_3 \text{ m}^{-2}$ bei 1.013 hPa und 0°C (Madronich, 1993)

In der Antarktis und den umliegenden Gebieten ist seit einigen Jahren während der jährlichen Abnahmephase des stratosphärischen Ozons eine Zunahme der terrestrischen UV-B-Strahlung zu beobachten. Aber auch in Europa wurde in

alpinen Gebieten eine erhöhte UV-B-Intensität gemessen (Blumthaler und Ambach, 1990). In Ballungsräumen und Industriegebieten dagegen läßt sich eine derartige UV-B-Zunahme gegenwärtig nicht feststellen, da sie durch eine verstärkte UV-Absorption infolge des Anstiegs von troposphärischem Ozon sowie anderer Luftschadstoffe abgeschwächt bzw. kompensiert wird (Seckmeyer und Mc Kenzie, 1992). Unter Berücksichtigung von anlaufenden Maßnahmen zur Reduktion der Luftverschmutzung (z.B. Kfz-Katalysator) wird sich eine Erhöhung an UV-B Strahlung jedoch langfristig gesehen auch hier bemerkbar machen. Das Ausmaß der zu erwartenden Änderungen der UV-B Intensität läßt sich zur Zeit nur mit Hilfe von Modellrechnungen abschätzen (Enquete Kommission, 1992). Diesem zufolge hat die Intensität der UV-B Strahlung in den mittleren Breiten beider Hemisphären zwischen 1979 und 1989 um 4 bis 12 % zugenommen (Madronich, 1992). Dabei ist zu berücksichtigen, daß regionale UV-Strahlungsdosen beträchtliche tägliche, monatliche und jährliche Schwankungsbreiten aufweisen, die z.B. auf verschiedene Bewölkungsgrade zurückzuführen sind (Frederick und Erlick, 1995). Insgesamt wird die Vegetation - auch bei einem baldigen Ausstieg aus der FCKW-Produktion - noch einige Jahrzehnte mit einer Zunahme solarer UV-B Strahlung konfrontiert sein (Tevini, 1995).

2. Reaktionen von Pflanzen auf mögliche Parameter globaler Klimaveränderungen

2.1. Effekte von erhöhten O₃ - und CO₂ - Konzentrationen

Eine Beeinträchtigung der Leistungsfähigkeit von Kulturpflanzen durch bodennahes Ozon ist in vielen Regionen der Erde zu beobachten. In den USA werden die jährlichen Ernteverluste durch Ozon auf zwei Milliarden Dollar geschätzt (Heck et al., 1988). Ozon bewirkt eine Reduktion von Photosynthese, Wachstum und Ertrag und kann bei einigen Arten zu vorzeitigen Seneszenzerscheinungen führen (Pell und Dann, 1991). Damit assoziiert ist u.a. ein schneller Abbau der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) auf Proteinebene (Pell, 1994).

Wenn O₃ über die Stomata ins Blattinnere vorgedrungen ist, reagiert es mit Komponenten der Zellwand und des Plasmalemmas unter Bildung von reduzierten Sauerstoffspezies wie z.B. Superoxidradikalen (O₂⁻), Hydroxylradikalen (OH[•]) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (Heath, 1987; Kangasjärvi et al., 1994). Die verstärkte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies gilt allgemein als Kennzeichen pflanzlicher Stresssituationen (Foyer, 1994). Diese Folgeprodukte von O₃ können zu Autoxidationen führen (Salter und Hewitt, 1992). Davon können z.B. Proteine, Nukleinsäuren und vielfach ungesättigte Fettsäuren betroffen sein (Mustafa, 1990).

Auf Proteinebene konnte eine Induktion der Aktivität von antioxidativen Enzymen gezeigt werden, wie z.B. von Ascorbat-Peroxidase (Mehlhorn, 1990). Ferner wurden Enzyme des Phenylpropanoid-Stoffwechsels wie z.B. PAL (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase) als Ozon-induziert erkannt (Rosemann et al., 1991). Trotz vieler Ansatzpunkte sind die präzisen Mechanismen des Schädigungsprozesses und der pflanzlichen Abwehr gegenüber Ozon-Angriffen noch nicht bekannt. Ebenso sind mögliche prädisponierende Effekte im Hinblick auf Pflanzenkrankheiten erst unzureichend untersucht (Manning und Tiedemann, 1995).

Bezüglich erhöhter CO_2 -Konzentrationen wird in der Literatur häufig eine Steigerung der Photosyntheserate pflanzlicher Individuen genannt (Bazzaz, 1990; Baker und Allen, 1994). Gleichzeitig steigt die Effizienz der Wassernutzung und damit kommt es zu einer Wachstumssteigerung und Kohlenstoff-Akkumulation in der Phytomasse (Amthor, 1995). Diese kann sich z.B. in einer verstärkten unterirdischen Biomasseproduktion äußern (Mauney et al., 1992). Modellierungen des Ausmaßes einer Zunahme des globalen terrestrischen Pflanzenwachstums als Antwort auf ansteigende atmosphärische CO_2 -Konzentrationen zeigen eine große Variationsbreite. Zu berücksichtigen ist die Fähigkeit der Pflanzen, sich bis zu einem bestimmten Grad an veränderte CO_2 -Konzentrationen anzupassen (Amthor, 1995). Die pflanzlichen Antworten reichen von raschen Veränderungen (s. Photosynthese) zu langsameren Reaktionen, wie z.B. Modifikationen der Rubisco-Aktivität (Besford et al., 1990) sowie Veränderungen der Stomata-Dichte (Woodward, 1987). Hinsichtlich der Effekte auf die Stomata-Dichte werden verschiedene Ansichten vertreten. Es wurden Abnahmen (O'Leary und Knecht, 1981), Zunahmen (Woodward und Bazzaz, 1988) und keine Reaktion der Stomata-Dichte (Körner, 1988) beschrieben. Die verschiedenen Ergebnisse werden auf artspezifische Unterschiede sowie auf Einflüsse verschiedener Lichtqualitäten während der Versuche zurückgeführt (Gay und Hauck, 1994). Wenig bekannt ist allerdings bis jetzt über die Auswirkungen erhöhter CO_2 -Konzentrationen auf Pflanzenkrankheiten und mögliche Veränderungen der pflanzlichen Prädisposition. Denn kombiniert mit einer verstärkten Biomasseproduktion ist ein Anstieg der mikroklimatischen Feuchtigkeit zu erwarten, der wahrscheinlich Pflanzenkrankheiten (wie z.B. Mehltau-Befall) begünstigen wird. Außerdem muß berücksichtigt werden, daß eine verstärkte Biomasseproduktion auch mit einem vergrößerten Inokulum-Potential für nekrotrophe Organismen einhergeht (Manning und Tiedemann, 1995). In Bezug auf Pflanzengemeinschaften wurde eine Beeinflussung kompetitiver Interaktionen durch erhöhtes CO_2 aufgrund unterschiedlicher Reaktionen verschiedener Spezies postuliert (Bazzaz, 1990). Der Autor folgert, daß es dadurch zu einer veränderten Struktur von Pflanzengemeinschaften mit potentiellen langfristigen ökologischen Verschiebungen kommen kann. Derzeit fehlen **Langzeit-Studien** an Pflanzengemeinschaften im Freiland unter natürlich erhöhten CO_2 -Bedingungen (Amthor, 1995).

2.2. Effekte von erhöhter UV-B Strahlung

Generell ist zu beachten, daß die spektralen Verhältnisse der natürlichen Globalstrahlung zwischen 280 nm und 800 nm unter Vermeidung von UV-C-Strahlung unterhalb von 280 nm möglichst genau simuliert werden müssen, um aus Pflanzenexperimenten in Expositions-kammern Rückschlüsse auf die ökologischen Verhältnisse in der Natur ziehen zu können (Fiscus und Booker, 1995). Insbesondere der hohe solare Weißlichtanteil im Freiland ist in Kammer- und Gewächshausexperimenten unbedingt nachzuahmen, da andernfalls u.a. eine Hemmung des Photolyase-Enzyms (Langer und Wellmann, 1990; Pang und Hays, 1991) eintritt, was zu unrealistisch hohen Effekten führt. „Reparatur“-Enzyme wie die Photolyase sind in der Lage, Cyclobutylpyrimidin-Dimere, die als Folge von UV-B Strahlung aus benachbarten Pyrimidinen in pflanzlicher DNA gebildet werden können, zu monomerisieren (Sutherland, 1981b). Unter diesen Gesichtspunkten sind auch die im folgenden genannten UV-B - Effekte zu sehen.

Als biochemischer Marker für UV-B Streß bei Pflanzen gilt die vermehrte Produktion von Schutzpigmenten, vor allem von Flavonoiden (Hahlbrock und Scheel, 1989) sowie von Anthocyanen (Takahashi et al., 1991). Experimentell beobachtet wurden als Folgen erhöhter UV-B Strahlung u.a. ein verringertes Blatt- und Sproßwachstum, eine Schädigung des Photosyntheseapparates (PS II) und eine Reduktion der Blütenbildung (Tevini, 1992). Rau et al. (1988) stellten fest, daß bei zusätzlicher UV-B Bestrahlung im Langtag z.B. die Langtagpflanze *Hyoscyamus niger* L. rosettig bleibt und keine Blüte bildet. In vitro wurde eine geringere Pollenkeimungsrate bei simulierter solarer UV-B Strahlung beobachtet (Flint und Caldwell, 1984). In ökologischer Hinsicht wird eine verringerte Biomasse-Produktion erwartet (Tevini et al., 1981; Sullivan und Teramura, 1988). Als phytochemische Reaktionen auf UV-B Einwirkung zeigten Krizek et al. (1993) bei *Cucumis sativus* L. eine drastische Zunahme der PAL (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase)-Aktivität, eine erhöhte Konzentration an freien und konjugierten Polyaminen sowie veränderte Aktivitäten von SOD (Superoxiddismutase) und Katalase. Bornman und Teramura (1993) stellten als wichtige Angriffspunkte für UV-B Nukleinsäuren, Membranlipide und Proteine heraus. Durch erhöhte UV-B Strahlung nahm z.B. die Aktivität der Rubisco (Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase) ab (Strid et al., 1990). Die Reprimierung weiterer Proteine, wie z.B. des Chloroplasten-kodierten D1 Proteins und des Zellkern-kodierten Chlorophyll a/b bindenden Proteins, wurde auf Transkriptniveau gezeigt (Jordan et al., 1991). Induziert wurde z.B. das „Reparatur“-Enzym Photolyase (Sutherland 1981b; Langer und Wellmann, 1990; Pang und Hays, 1991). Eine detaillierte Darstellung derartiger UV-Reparaturmechanismen in Pflanzen ist z.B. Stapleton (1992) zu entnehmen.

Potentielle Konsequenzen einer durch Ozonabnahme in der Stratosphäre bedingten Zunahme der solaren UV-B Strahlung in der Troposphäre sind in Abb. 4 für höhere Pflanzen dargestellt.

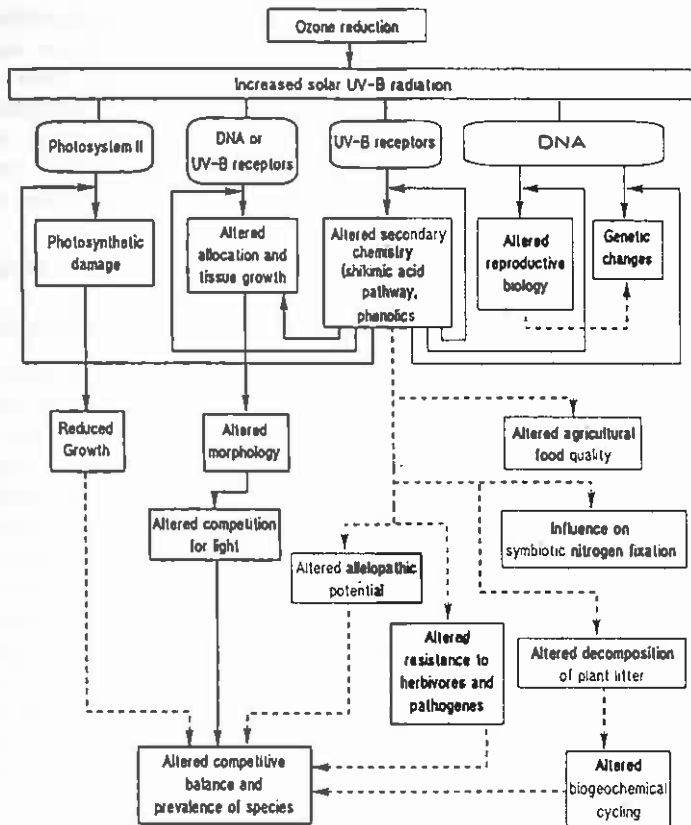


Abb. 4: Mögliche Konsequenzen einer durch Ozonabnahme in der Stratosphäre bedingten Zunahme der solaren UV-B Strahlung für höhere Pflanzen (aus Tevini, 1993). Gestrichelte Linien wurden für experimentell bis jetzt noch nicht bewiesene Interaktionen verwendet.

Wie in Abb. 4 gezeigt, wirkt sich eine Erhöhung der solaren UV-B Strahlung u.a. auf der Ebene des Photosystems II aus, wodurch Schädigungen im Bereich der Photosynthese und damit verbunden Wachstumsreduktionen zu erwarten sind. Interaktionen von erhöhtem UV-B auf DNA-Ebene könnten zu genetischen Veränderungen (z.B. Tumorentwicklung) und einer veränderten Reproduktions-

biologie (z.B. durch Thymin-Dimere) führen. Möglicherweise bewirkt ein Anstieg von solarem UV-B auch über Wechselwirkungen mit potentiellen UV-B - bzw. DNA-Rezeptoren morphologische Veränderungen bzw. Veränderungen im Sekundärstoffwechsel von Pflanzen (Shikimat Weg, Phenole). Da z.B. Flavonoide und Phenole UV-B Filtereigenschaften besitzen, dürften sich daraus negative Rückkopplungsmöglichkeiten ergeben (s. Abb. 4). Andererseits sind als potentielle Konsequenzen davon in ökologischer Hinsicht vor allem Veränderungen in der zwischenartlichen „Wettbewerbs“- bzw. „Konkurrenz“-Situation im Hinblick auf Mineralstoff- und Wasserversorgung sowie Anfälligkeit gegenüber Pflanzenkrankheiten zu erwarten (Abb. 4).

2.3. Interaktionen von O₃ und UV-B

Evolutionsgeschichtlich betrachtet stellen Ozon und UV-B Strahlung sehr wichtige Merkmale der Umwelt dar, in der sich pflanzliche Arten über einen langen Zeitraum hinweg entwickelt haben. Ungünstige Auswirkungen beider Faktoren für die Vegetation sind in Experimenten unter kontrollierten Bedingungen bei Überschreitung bestimmter Schwellenwerte beobachtet worden (Runeckles und Krupa, 1994). Andererseits sind sowohl konstitutive als auch induzierbare Antioxidantien bzw. UV-B absorbierende sekundäre Stoffwechselprodukte bei Pflanzen bekannt (Tevini, 1993; Sandermann et al., 1994). Bestimmte Vorgänge sind UV-B spezifisch (Jungblut, 1995). Andere werden als Antwort auf Ozon und UV-B induziert (Willekens et al., 1994a). So konnte auf mRNA-Ebene auf O₃- bzw. UV-B-Behandlung hin eine erstaunliche Übereinstimmung des Verhaltens antioxidativer Abwehrgene beobachtet werden. Willekens et al. (1994a) zeigten, daß eine Katalase-Isoform (Cat 2) sowie Glutathion-Peroxidase auf beide Streßfaktoren mit einer ähnlich raschen Zunahme reagieren. Ferner erhöht sich durch O₃ ebenso wie durch UV-B die Menge an aktivierten Sauerstoffspezies und die Lipidperoxidation in Pflanzen (Foyer et al., 1994). Bei O₃- und UV-B behandelten Pflanzen agieren deshalb möglicherweise - wie bei Pflanzen-Pathogen Studien postuliert (Dixon et al., 1994) - aktivierte Sauerstoffspezies als Signalmoleküle für Abwehr- oder Schadeffekte.

Über Interaktionen von O₃ und UV-B ist nur sehr wenig bekannt. Runeckles und Krupa (1994) sehen die Schwierigkeiten bei kombinierten Experimenten mit simultaner O₃ und UV-B Exposition vor allem in der Simulation möglichst realistischer Konzentrationen. Sie fordern aufgrund der UV-B absorbierenden Eigenschaft von troposphärischem O₃ exakte Messungen der UV-B Konzentration während der O₃-Behandlung. Derartige Informationen fehlen z.B. bei Versuchen in Open-Top Kammern im Freiland mit Sojabohnen (*Glycine max* L.) von Booker et al. (1992a und 1992b). Booker et al. (1992a) konnten keine UV-B/O₃-Interaktionen feststellen. Erhöhtes UV-B förderte weder die O₃-Effekte noch bot es einen Schutz davor. Probleme bei der Beurteilung der Effekte ergeben sich auch durch zu niedrige Weißlichtanteile bei Kammerexperimenten (s. 2.2.). Dies war z.B. bei Untersuchungen von Agrawal et al. (1991) der Fall. In dieser Studie wurden *Phaseolus vulgaris* L. -Pflanzen zunächst mit erhöhtem UV-B und anschließend mit

einer akuten O₃-Dosis behandelt. Nur die O₃-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion der Photosynthese und der stomatären Leitfähigkeit. Die Autoren betonen jedoch, daß durch die verwendete geringe photosynthetische Photonen-Flußrate (PPFR) von 300 µmol m⁻² s⁻¹ keine Rückschlüsse auf Freilandeffekte möglich sind. Feder und Shrier (1990) kamen bei der Untersuchung des Pollenschlauch-Wachstums von Tabak und Petunien zu dem Ergebnis, daß eine Kombination von UV-B- und nachfolgender O₃-Behandlung stärker reprimierend wirkt als einer dieser Streß-Faktoren allein. Sie stellten die DNA als Hauptangriffspunkt für UV-B heraus im Vergleich zu zellulären Membranen, die vorwiegend durch O₃ beeinflusst werden. Insgesamt gesehen besteht bezüglich kombinierter Effekte von O₃ und UV-B noch erheblicher Forschungsbedarf (Runeckles und Krupa, 1994).

3. Pflanzliche Untersuchungssysteme

3.1. Reaktionen im Kompartiment Apoplast/Zellwand

Für eine Analyse früher Effekte ist auf zellulärem Niveau der Apoplast von besonderem Interesse. Unter dem Apoplasten (gr. *apo* = weg, getrennt von; *plastos* = geformt, gebildet) versteht man die Gesamtheit der außerhalb des Cytoplasmas liegenden Räume eines vielzelligen pflanzlichen Organismus einschließlich der Zellwände und der Aussparungen zwischen den Zellen (Interzellularen). Der Besitz einer vom Cytoplasma ausgeschiedenen, starren äußeren Hülle (Saccoderm, Zellwand) zeichnet die pflanzliche Zelle (im Vergleich zur tierischen Zelle) aus (Strasburger, 1991). Sie ist vorhanden, „weil die Pflanzenzellen mit ihren meist stark entwickelten Vakuolen einen erheblichen osmotischen Binnendruck entwickeln können, so daß der aufgeblähte Protoplast ein Widerlager benötigt“ (Strasburger, 1991). Als Bausteine pflanzlicher Zellwände dienen Pektine (in Form des Protopektins), Hemicellulosen, Cellulose und Lignin. Außerdem enthalten die Zellwände Struktur-Proteine (ca. 10 %), z.B. Hydroxyprolin-reiche Glykoproteine, Prolin-reiche Proteine und Glycin-reiche Proteine (Schneiderbauer et al., 1995). Diese Proteine können neben Zellwand-architektonischen Funktionen auch zusätzliche Aufgaben erfüllen. Bradley et al. (1992) beobachteten auf Elicitor-Behandlung von Bohnen (*Phaseolus vulgaris* L.) - oder Sojabohnen (*Glycine max* L.) - Zellsuspensionskulturen eine Streßantwort, bei der eine Verstärkung der Zellwand durch oxidatives „Cross-linking“ von (Hydroxy-)Prolinreichen Strukturproteinen erreicht wird. Die Autoren sehen darin einen Schutzmechanismus der Pflanze z.B. gegenüber Pathogenen und anderen Streßfaktoren der Umwelt. Auf mRNA-Ebene konnte durch Ozonbehandlung eine Induktion des Hydroxyprolin-reichen Zellwand-Glykoproteins Extensin in den Blättern von Buche (*Fagus sylvatica* L.) und in den Nadeln von Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) und Fichte (*Picea abies* (L.) KARST.) festgestellt werden (Schneiderbauer et al., 1995).

Gasförmige Substanzen treffen nach der Stomata-Passage zunächst auf den Flüssigkeitsfilm um die Mesophyllzellen, die Apoplastenflüssigkeit. Ozon z.B. wird dort praktisch vollständig abgebaut. Chameides (1989) schließt nicht aus, daß Antioxidantien wie z.B. Ascorbat und sekundäre Pflanzenstoffe wie z.B. Cumarine und Phenole zum Abfangen von O_3 beitragen können. Langebartels et al. (1991) zeigten, daß in der IWF von Tabakpflanzen außerdem Polyamin-Konjugate, wie z.B. Caffeoyl-Putrescin vorkommen, die als effektive Sauerstoffradikalfänger bekannt sind (Bors et al., 1989). Im Apoplasten wurden sehr unterschiedliche Enzyme, wie z.B. Peroxidasen, Diaminoxidasen, Thionine, α -Amylasen, β -Glucosidasen, β -1,3-Glucanasen, Chitinasen etc. gefunden (s. Tab. 1). Die beiden letzteren Gruppen können direkt mit dem biotischen Streßfaktor reagieren, indem sie mikrobielle Zellwände abbauen, oder sie besitzen Signalcharakter für die Aktivierung weiterer Abwehrreaktionen (s. 4. Pathogenesis-related (PR)-Proteine). Von Kerner (1990) wurde in der interzellulären Waschflüssigkeit von Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bel B) ein noch nicht näher charakterisiertes Kultivar-spezifisches Protein von 21 kDa beschrieben.

Tab. 1: Beispiele für apoplastische bzw. Zellwand-assoziierte Proteine

Bezeichnung des Proteins	Vorkommen	Autoren
Peroxidase	Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i>) Flachs (<i>Linum usitatissimum</i>)	Rathmell und Sequeira (1974) McDougall (1992)
Ascorbat-Peroxidase	Weißer Fetthenne (<i>Sedum album</i>)	Castillo und Greppin (1986)
Diaminoxidase	Erbse (<i>Pisum sativum</i>)	Federico und Angelini (1986) Peters et al. (1989)
α -Amylasen	Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Heitz et al. (1991)
β -1,3-Glucanase, Chitinase	Hafer (<i>Avena sativa</i>) Gurke (<i>Cucumis sativus</i>) Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Fink et al. (1988) Boller und Métraux (1988) Thalmair et al. (1996)
β -D-Glucosidase, Malatdehydrogenase, Arylesterase	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>), Hafer (<i>Avena sativa</i>)	Li et al. (1989)
Coniferylalkoholoxidase	Kiefer (<i>Pinus strobus</i>), Tanne (<i>Abies balsamea</i>), Lärche (<i>Larix laricina</i>), Fichte (<i>Picea rubens</i>)	Savidge und Udagama-Randeniya (1992)
Thionin	Gerste (<i>Hordeum vulgare</i>)	Andresen et al. (1992)

3.2. Modellsystem sortenabhängiger O₃-Toleranz:

Nicotiana tabacum L. cv. Bel W3 und Bel B

Als pflanzliches Modellsystem für Untersuchungen zur Ozontoleranz wurden seit mehr als 30 Jahren die beiden *Nicotiana tabacum* L. Kultivare Bel W3 und Bel B verwendet. Sie resultierten aus Bemühungen der amerikanisch-kanadischen Tabakindustrie Ende der 50er Jahre, Krankheits- und insbesondere O₃-resistente Sorten zu züchten (Heggstad, 1991). Bel W3 reagiert äußerst empfindlich und selektiv gegenüber O₃ mit der Entwicklung von braunen fleckenförmigen Nekrosen auf der Blattober- und -unterseite, während cv. Bel B gegenüber derzeitigen Ozonwerten tolerant ist. Menser et al. (1963a) stellten fest, daß Bel W3 Pflanzen bei zweistündiger Behandlung mit 100 nI/l O₃ sichtbare Blattschäden zeigten. Dagegen bedurfte es einer zweistündigen Behandlung mit 220 nI/l O₃, um die Blätter von Pflanzen des Kultivars Bel B zu schädigen.

Die Ursache des deutlichen Unterschiedes beider Kultivare in ihrer O₃-Toleranz ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Rhoads und Brennan (1978) vermuteten, daß der Resistenzfaktor im Blatt zu suchen sei. Sie fanden heraus, daß die Blätter des Kultivars Bel B größere Wasseraustausch-Kapazitäten (H₂O-Influx und -Efflux) besitzen als solche von cv. Bel W3 und damit besser in der Lage sind, Blattgewebe-Verletzungen zu verhindern. Kerner (1990) konnte jedoch keine Unterschiede im Volumen der Interzellularräume beider Kultivare feststellen.

O₃-induzierte Blattschäden werden auch deutlich von klimatischen Faktoren, wie z.B. Licht, Temperatur und Luftfeuchte beeinflusst (Heck, 1968; Guderian, 1985). Um quantitative Korrelationen zwischen ambienten O₃-Konzentrationen und Bel W3-Blattschäden vornehmen zu können, ist eine nähere Charakterisierung der Blattantwort auf zeitlicher und räumlicher Basis mit simultanen Messungen der O₃-Werte sowie anderer Umweltfaktoren (wie z.B. Lufttemperatur, -feuchtigkeit, -druck) erforderlich (Krupa et al., 1993). Derartige Bioindikation unter Einsatz von cv. Bel W3 Pflanzen im Freiland wurde z.B. von Grünhage et al. (1993) durchgeführt. Diese Autoren entwickelten ein ökotoxikologisches Modell, das das Ozonrisiko-Potential für Pflanzen aus vertikalen Stoffflußdichten in der Atmosphäre ableitet. Dabei wurden die Austauschigenschaften der bodennahen Atmosphäre und die Senkeneigenschaften der Pflanze am Beispiel *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 mit Hilfe von üblichen meteorologischen Meßdaten wie Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Windgeschwindigkeit etc. berücksichtigt. Die Ergebnisse von Tonneijck und Bugter (1991), die feststellten, daß moderate O₃-Konzentrationen größere Blattschäden bei cv. Bel W3 Pflanzen verursachten als sehr hohe Konzentrationen, sind ebenfalls nur aus „pflanzlicher Sicht“ (Grünhage et al., 1993) zu erklären. Sehr hohe O₃-Werte treten nämlich im allgemeinen zusammen mit Klimafaktoren auf, die einen Stomatenschluß verursachen, wie z.B. hohe Strahlungsintensität sowie niedrige Luft- und Bodenfeuchte.

Um aufgrund von Tabaknekrosen Rückschlüsse auf die Gefährdung der einheimischen Vegetation ziehen zu können, wurde in einem Berliner Bioindikationsprogramm (Cornelius et al., 1985) die relative O₃-Empfindlichkeit von 53 Wildpflanzenarten des Berliner Stadtgebietes gegenüber dem Tabak (cv. Bel W3) in Freilandbehandlungskabinen getestet, die bei Faensen-Thiebes (1983) beschrieben sind. Dabei wiesen ca. 20 % der untersuchten Wildpflanzen (vor allem Leguminosenarten) höhere oder gleich hohe O₃-bedingte Blattschäden auf als der standardisierte Bioindikator. Demnach reagierte die Tabakvarietät Bel W3 im Vergleich zur einheimischen Vegetation nicht überempfindlich und kann durchaus zur Abschätzung der Gefährdung der Flora durch Ozonimmissionen herangezogen werden.

Neben der akuten O₃-Schädigung in Form von sichtbaren Blattnekrosen gibt es bei cv. Bel W3 jedoch auch latente O₃-Wirkungen, z.B. bei niedrigen Konzentrationen, die über einen längeren Zeitraum hinweg wiederholt auftreten. Steinberger und Naveh (1982) beobachteten neben wachstumsreduzierenden Effekten eine erhöhte Empfindlichkeit von cv. Bel W3 Pflanzen, die mit niedrigen O₃-Konzentrationen (30 nl/l, 3x4 h) vorbehandelt worden waren, gegenüber nachfolgenden Expositionseignissen (mit 80 bzw. 100 nl/l O₃). Das bedeutet, daß O₃ in der Lage ist, allein durch physiologische Schädigung die Prädisposition von Pflanzen zu verändern.

4. Pathogenesis-related (PR) - Proteine von Pflanzen

4.1. Überblick

Pflanzen haben eine Vielzahl von Abwehrmechanismen entwickelt, die durch externe Faktoren ausgelöst werden können. Zu diesem generellen Abwehrsystem gehört die Induktion von Streßproteinen, insbesondere von **pathogenesis-related (PR)-Proteinen**. Dies sind kleine, säurestabile Proteine mit einem Molekulargewicht von 6-43 kDa (Gattung *Nicotiana* L.). Sie können definiert werden als „pflanzliche Proteine, die in pathologischen oder verwandten Situationen induziert werden“ (van Loon et al., 1994). Daraus ergibt sich, daß sie nicht nur durch biotische Faktoren, wie z.B. auf Pathogen-Infektion hin (Van Loon und Van Kammen, 1970; Bol et al., 1990) auftreten, sondern auch durch eine Vielzahl von abiotischen Stimuli, wie beispielsweise durch Salicylsäure (Ward et al., 1991) induziert werden können. Sie lassen sich aufgrund von Aminosäuresequenz- bzw. serologischen Ähnlichkeiten in Gruppen (sog. PR-Protein-Familien) einteilen, wobei bisher in der Literatur unterschiedliche Nomenklaturen existierten. Um eine Vereinheitlichung der Benennung von PR-Proteinen zu erreichen, haben van Loon et al. (1994) entsprechende Empfehlungen veröffentlicht, die in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt wurden. Häufig können in einer Familie saure und basische Mitglieder aufgrund

des isoelektrischen Punktes (IEP) unterschieden werden, wobei die sauren Formen vorwiegend extrazellulär im Apoplasten, die basischen Formen dagegen intrazellulär in der Vakuole lokalisiert sind (Meins et al., 1992). Vereinzelt wurden jedoch auch basische extrazelluläre PR-Proteine beschrieben, z.B. für die Kartoffel (Kombrinck et al., 1988). Die funktionelle Analyse von PR-Proteinen hat gezeigt, daß sie hauptsächlich β -1,3-Glucanase (PR-2) und Chitinase (PR-3, -8 und -11) -Aktivitäten besitzen, aber auch Thaumatin-ähnliche Proteine (PR-5), Proteinase-Inhibitoren (PR-6) und Peroxidasen (PR-9) sind in dieser Gruppe enthalten (van Loon et al., 1994).

Tab. 2 gibt einen zusammenfassenden Überblick über PR-Proteine aus *Nicotiana tabacum* L. und anderen *Nicotiana* L. Arten (nach Van Loon et al., 1994).

Tab. 2:	Pathogenesis-related Proteine bei Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i> L. und andere <i>Nicotiana</i> L. Arten) (nach van Loon et al., 1994). IEP, Isoelektrischer Punkt; Referenzen: 1, Van Loon und Van Kammen, 1970; 2, Gianinazzi et al., 1970; 3, Ahl et al., 1982; 4, Van Loon, 1982; 5, Pierpoint, 1983; 6, Parent und Asselin, 1984; Pierpoint, 1986; 8, Cornelissen et al., 1987; 9, Hogue und Asselin, 1987; 10, Kauffmann et al., 1987; 11, Legrand et al., 1987; 12, Fritig et al., 1989; 13, Van den Bulcke et al., 1989; 14, Kauffmann et al., 1990; 15, Geoffroy et al., 1990; 16, Stintzi et al., 1991; 17, Woloshuk et al., 1991; 18, Lawton et al., 1992; 19, Heitz et al., 1993; 20, Stintzi et al., 1993; 21, Melchers et al., 1994; 22, Ponstein et al., 1994
---------	---

Familie	Mitglied	Molekulargewicht [kDa]	IEP	Biochemische Eigenschaften	Auch bekannt als
PR-1	a	15	4.0	unbekannt	IV ¹ , b ₁ ²
	b	15	4.4		III ¹ , b ₂ ²
	c	15	4.5		II ¹ , b ₃ ²
	d	15			b ₁ ³
	e	15			b ₀ ³
	f	14			b ₁ ³
	g	17	10.7		basisches PR-1 ⁸
PR-2	a (II)	31	4.1	β -1,3-Glucanase	I ¹ , b ₄ ²
	b (II)	33	4.6		N ⁴ , b ₅ ⁶
	c (II)	35	4.7		O ⁴ , b _{6(b)} ^{6,9} , O ⁷
	d (III)	35	5.3		Q ⁷ , PR-35 ¹³
	e (I)	33	>7		basische Glucanase
PR-3	a (II)	27	4.5	Chitinase	P ⁴ , b _{7(b)} ^{6,9}
	b (II)	28	4.8		Q ⁴ , b _{8(b)} ^{6,9}
	c (I)	34	>7		basische Chitinase A ¹¹ , chi 34 ²⁰
	d (I)	32	>7		b ₁₃ ⁹ , basische Chitinase B ¹¹ , chi 32 ²⁰
	e (I)	28	>7		chi 28 ²⁰
PR-4	a ₁	15	6.0	Ähnlich zu Kartoffel-win Proteinen	R ⁴ , R ⁵ , b _{9c} ⁹ , r ₁ ¹⁴
	a ₂	13			R ⁴ , R ⁵ , b _{9b} ⁹ , r ₂ ¹⁴
	b ₁	15	6.5		s ₁ ¹⁴
	b ₂	13			s ₂ ¹⁴
	c	20	>7		CBP20 ²²
PR-5	a	24	5.0	Thaumatococcus-ähnlich	S ⁴ , R ⁵ , b _{9(a)} ^{6,9} , R ¹⁴
	b	24	5.2		S ¹⁴
	c	26	>7		Osmotin ¹⁶ , AP24 ¹⁷
	d	26	>7		n-Osmotin ²⁰
PR-6	a	6	8.7	Proteinase-Inhibitor	Subtilisin-Inhibitor ^{13,19} , TIMPa ²⁰
	b	6	8.7		TIMPb ²⁰
PR-8	a (III)	28	4.4	Chitinase/Lysozym	O ⁷ , b _{6c} ⁹ , saure Klasse III Chitinase ¹⁸ , lys28a ²⁰
	b (III)	28	8.3		lysbl ²⁰
	c (III)	28	8.3		lysbl ²⁰
PR-9	a	39		Peroxidase	P39a ²⁰
	b	40			P40a ²⁰
PR-11	a (V)	41	>7	Chitinase	45 K ^{12,20} , Typ V Chitinase ²¹
	b (V)	43	>7		Typ V Chitinase ²¹

4.2. Charakterisierung von β -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3)

Unter den PR-Proteinen dominieren die (Endo-) Hydrolasen (Boller, 1985; Kombrinck et al., 1988). Die meisten Hydrolasen wurden als β -1,3-Glucanasen [EC 3.2.1.39] (Kauffmann et al., 1987) und Chitinasen [EC 3.2.1.14] (Legrand et al., 1987) identifiziert. Dabei handelt es sich um monomere Polypeptide mit Molekulargewichten im Bereich von 20 bis 40 kDa (Meins et al., 1992). β -1,3-Glucanasen spalten vorwiegend β -1,3-verknüpfte Polyglukane, Chitinasen zerlegen das N-Acetylglucosamin-Polymer Chitin in kleinere Fragmente (Chitooligosaccharide) (Boller, 1988). Chitin kommt bei Pflanzen nicht vor, ist aber ein Hauptbestandteil pilzlicher Zellwände (Bol et al., 1990). β -1,3- / β -1,6-Glukane sind ebenfalls Hauptkomponenten mikrobieller Zellwände, β -1,3-Glukane sind aber auch endogen in Pflanzen zu finden (z.B. in den Primärwänden wachsender Zellen, in Pollenschläuchen oder als Kallose in den Siebplatten des Phloems etc.) (Boller, 1988).

Die Funktion von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen ist intensiv bei verschiedenen Pflanzenarten untersucht worden. Hauptsächlich spielen sie wohl aufgrund ihres fungiziden Potentials bei der pflanzlichen Abwehr gegenüber phytopathogenen Pilzen eine Rolle (Mauch et al., 1988). Ihre Funktion besteht aber auch darin, bei Pathogenbefall Oligosaccharide (Elicitoren) aus der pilzlichen (oder der pflanzlichen) Zellwand freizusetzen, die weitere Abwehrbezogene Reaktionen auslösen (Simmons, 1994). Bei bakteriellen Infektionen (z.B. mit *Pseudomonas tabaci*) wurde ebenfalls eine Induktion von Chitinase und β -1,3-Glucanase gezeigt (Meins und Ahl, 1989). Bei vielen Pflanzen werden β -1,3-Glucanasen und Chitinasen koordiniert exprimiert (Vögeli et al., 1988). Dies beinhaltet eine Proteinneusynthese, die durch eine Pathogen-induzierte Aktivierung der entsprechenden Gene hervorgerufen wird. Für zusätzliche, nicht-defensive Funktionen spricht die Existenz gewebespezifischer bzw. entwicklungsbedingt auftretender Hydrolasen (z.B. in Wurzeln, älteren Blättern und Blüten), die häufig einer hormonellen Regulation unterliegen (Linthorst, 1991).

Bei Tabak finden sich basische und saure Isoformen beider Enzyme. Die sauren Isoformen sind extrazellulär (Apoplast) lokalisiert, während die basischen Isoformen intrazellulär (Vakuole) vorkommen (Keefe et al., 1990). Bei einer Speicherung in der Vakuole werden die Enzyme erst bei einer Dekompartimentierung der Zelle unspezifisch frei, z.B. wenn eine Pilzhyphe den Tonoplast der Vakuole auflöst (Mauch und Staehelin, 1989). Es wurde festgestellt, daß der Bestimmungsort der vakuolären (basischen) Hydrolasen durch eine Tonoplast-typische Aminosäuresequenz bestimmt wird. Van den Bulcke et al. (1989) fanden bei basischen β -1,3-Glucanasen eine Verlängerung am C-Terminus (Carboxylendständiger Rest), die den sauren Glucanasen fehlt. Diese C-terminale Verlängerung wurde auch bei vakuolären Chitinasen entdeckt (Neuhaus et al., 1991a). Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich in ihrer

Induzierbarkeit durch verschiedene Streßfaktoren (Linthorst, 1991). Die sauren Isoformen sind z.B. durch Infektion induzierbar, während die basischen Isoformen zusätzlich z.B. auf Verwundung und Ethylenbehandlung ansprechen (Linthorst, 1991). Durch exogenes Ethylen können viele Abwehrreaktionen der Pflanze ausgelöst werden, wie z.B. die Induktion von basischen Isoformen der β -1,3-Glucanase und Chitinase bei Tabak (Keefe et al., 1990). Die Rolle endogen gebildeten Ethylens ist dagegen weniger klar, obwohl sein Auftreten in vielen Streßsituationen, wie z.B. bei Pathogenbefall (Boller, 1988) oder Ozonexposition (Langebartels et al., 1991) beobachtet wurde.

4.2.1. Reaktionen von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen auf O_3 , UV-B und CO_2

Die Resistenz von Pflanzen gegenüber Krankheiten äußert sich oft in Form einer Restriktion des Wachstums und der Ausbreitung eines Pathogens auf eine kleine Zone rund um den Infektionsort. Damit verbunden ist in vielen Fällen ein lokalisierter Zelltod des Pflanzengewebes, was zum Auftreten von nekrotischen Läsionen führt. Pathogen-Restriktion und Nekrosenbildung charakterisieren die hypersensitive Antwort (HR, hypersensitive response) (Matthews, 1991). Oft ist mit dieser lokalen Antwort innerhalb einer Periode von mehreren Tagen bis zu einer Woche die Entwicklung einer verstärkten Resistenz gegenüber einer sekundären Infektion durch das gleiche oder ein anderes Pathogen verbunden. Diese verstärkte Resistenz kann sich über die ganze Pflanze hinweg manifestieren und wird dann als systemisch erworbene Resistenz (SAR, systemic acquired resistance) bezeichnet (Ross, 1961; Ryals, 1992). Die Mechanismen der HR und SAR sind bis heute noch nicht vollständig verstanden. Zahlreiche physiologische, molekulare und biochemische Veränderungen konnten jedoch gleichzeitig beobachtet werden, wie z.B. die Expression von Genen, die für hydrolytische PR-Proteine wie β -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3) kodieren. Tab. 3 gibt einen Überblick über Reaktionen und Regulationsmöglichkeiten der Familien PR-2 (β -1,3-Glucanasen) und PR-3 (Chitinasen) am Beispiel der Gattung *Nicotiana* L. .

Tab. 3: Regulation von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen (in der Gattung *Nicotiana* L.); IEP, isoelektrischer Punkt; TMV, Tabakmosaikvirus; HR, hypersensitive response (hypersensitive Antwort); SAR, systemic acquired resistance (systemisch erworbene Resistenz); +, vorhanden; -, nicht vorhanden; $\uparrow$, Induktion; $\downarrow$, Hemmung; ?, Reaktion bis jetzt unbekannt; Referenzen: 1, Meins et al., 1992; 2, Felix und Meins, 1986; 3, Neale et al., 1990; 4, Felix und Meins, 1986; 5, Shinshi et al., 1987; 6, Felix und Meins, 1987; 7, Keefe et al., 1990; 8, Kauffmann et al., 1987; 9, Legrand et al., 1987; 10, Brederode et al., 1991; 11, Ward et al., 1991; 12, Schraudner et al., 1992; 13, Ernst et al., 1992

	PR-2 β-1,3-Glucanase		PR-3 Chitinase	
	I ¹	II ¹	I ¹	II ¹
BSP	basisch ¹	sauer ¹	basisch ¹	sauer ¹
Lokalisation	vakuolär ¹	extra- zellulär ¹	vakuolär ¹	extra- zellulär ¹
Regulation				
Entwicklungs- stadium	+ ^{2,3}	- ^{2,3}	+ ³	- ³
hormonelle Wirkung				
Auxin	↓ ⁴	- ⁴	↓ ⁵	- ⁵
Cytokinin	↓ ⁴	- ⁴	↓ ⁵	- ⁵
Ethylen	↑ ^{6,7}	- ^{6,7}	↑ ⁷	- ⁷
Phytohormone				
ABA/ET/SA	↑ ⁸	↑ ⁸	↑ ⁹	↑ ⁹
systemisch (S-AB)	- ¹⁰	↑ ¹⁰	- ¹⁰	↑ ¹⁰
Verwundung	↑ ¹⁰	- ¹⁰	↑ ¹⁰	- ¹⁰
Säurestress	- ¹¹	↑ ¹¹	- ¹¹	↑ ¹¹
O ₂	↑ ^{12,13}	- ^{12,13}	↑ ^{12,13}	↑ ^{12,13}
CO ₂	?	?	?	?
UV-C (254 nm)	↑ ¹⁰	↑ ¹⁰	↑ ¹⁰	↑ ¹⁰
UV-B (280-315 nm)	?	?	?	?

Eine entwicklungsbedingte Regulation wurde nur bei basischen Isoformen der β -1,3-Glucanase und Chitinase beobachtet (Felix und Meins, 1986; Neale et al., 1990). Ebenfalls nur die basischen Isoformen der beiden PR-Proteinfamilien unterliegen einer hormonellen Regulation (s. Tab. 3). Dabei führen Auxin und Cytokinin zu einer Reprimierung dieser Enzyme (Felix und Meins, 1986; Shinshi et al., 1987), während Ethylen eine Induktion bewirkt (Felix und Meins, 1987; Keefe et al., 1990). Streß-bedingt wurden z.B. auf Pathogenbefall (TMV) die basischen und sauren Isoformen assoziiert mit der hypersensitiven Antwort (HR) lokal induziert (Kauffmann et al., 1987; Legrand et al., 1987). Bei systemisch erworbener Resistenz (SAR) konnte nur eine Induktion der sauren Isoformen beider PR-Proteinfamilien beobachtet werden (Brederode et al., 1991). Salicylsäure-Behandlung induzierte ebenfalls nur die sauren Isoformen (Ward et al., 1991), während Verwundung zu einer Akkumulation der basischen Isoformen führte (Brederode et al., 1991). Abiotische Streßfaktoren können ebenfalls Induktionen dieser PR-Proteinfamilien auslösen (s. Tab. 3). Eine Behandlung von Tabakpflanzen mit O_3 erhöhte die Transkriptmengen von β -1,3-Glucanase (basische Isoformen), von Chitinase (basische und saure Isoformen) und von PR-1b in dieser zeitlichen Abfolge (Ernst et al., 1992). Durch O_3 -, nicht jedoch durch SO_2 - oder NO_2 -Behandlung wurden die Enzymaktivitäten der β -1,3-Glucanase und Chitinase induziert (Schraudner et al. 1992, 1994). Die Akkumulation von PR-Proteinen als Reaktion auf abiotische Stimuli kann mit anschließender verstärkter Resistenz gegenüber biotischen Faktoren gekoppelt sein. Beispielsweise führte UV-C (254 nm) -Behandlung von Tabakpflanzen zu verstärkter Expression von PR-Genen und nachfolgender TMV-Resistenz (Brederode et al., 1991; Yalpani et al., 1994). Effekte von erhöhter UV-B Strahlung (280-315 nm) auf β -1,3-Glucanasen und Chitinasen sind bisher unbekannt.

5. Themenstellung

Bis jetzt ist nur wenig bekannt über frühe biochemische Antworten von Pflanzen auf potentielle „Global Change“-Faktoren wie O_3 , CO_2 und UV-B in Bezug auf Schadmechanismen und Abwehrreaktionen bei Pflanzen.

Da abiotische und biotische Streßfaktoren oft ähnliche pflanzliche Abwehrreaktionen auszulösen vermögen, sollten die Wirkungen von O_3 , CO_2 und UV-B auf pathogenesis-related (PR)- Proteine, Komponenten des pflanzlichen Abwehrsystems, die durch Pathogen-Befall induziert werden, untersucht werden. Dazu sollten immunologische Methoden zur Quantifizierung der Antworten sowie Proteinsequenzierungstechniken zur Identifizierung von Proteinen eingesetzt werden. Als Modellsystem wurden die unterschiedlich ozonsensitiven Tabakkultivare Bel W3 und Bel B verwendet.

Ein noch relativ wenig untersuchtes Kompartiment der Zelle ist der Apoplast. Für die Analyse von Effekten, insbesondere der Aktivierung von Schutzreaktionen, die z.B. durch O_3 ausgelöst werden, ist der Apoplast besonders interessant. Deshalb sollten apoplastische Proteine von Tabak (cv. Bel W3 und Bel B) nach O_3 - und UV-B-Behandlung aufgetrennt und die Proteinmuster mit unbehandelten Kontrollen verglichen werden. Es sollte versucht werden, Änderungen im Proteinmuster zu erfassen und induzierte sowie reprimierte Proteine zu charakterisieren und identifizieren. Als Beitrag zu der Aufklärung der unterschiedlichen Ozontoleranz der beiden Tabakkultivare sollte ein Bel B spezifisches apoplastisches Protein von 21 kDa näher charakterisiert werden.

Die Untersuchung der Reaktionen von Proteinen auf UV-B Strahlung sollte unter realistisch simulierten Strahlungsbedingungen erfolgen. Dabei sollte eine Variation der spektralen Bestrahlungsstärke im UV-B Bereich durch Einsatz von verschiedenen Kantenfiltern Aufschluß über die Existenz von Schwellenwerten für einen UV-B Einfluß auf das Proteinmuster von Tabakpflanzen geben.

Die Ozoninduktion von biochemischen Antworten in Tabak war bisher nur in Klimakammern ermittelt worden und sollte in dieser Arbeit erstmals im Freiland überprüft werden. Dazu war die Exposition von Tabakpflanzen des Kultivars Bel W3 in einer Freiland-Meßstation über eine gesamte Vegetationsperiode geplant. Die biochemischen Veränderungen sollten mit den jeweiligen Ozonwerten sowie verschiedenen Klimaparametern korreliert werden.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Biometer Modell 501	Solar light, USA
ELISA-Mikrotiterplatten- Lesegerät Thermo _{max}	MWG, Biotech, Ebersberg
Fluoreszenz Spektrometer F-3000	Hitachi, München
Geltrockner	Bachhofer, Reutlingen
IEF Einheit (für Röhrchengele) Modell 175	Biorad, München
LKB Horizontalelektrophorese Universalkammer Multiphor II	Pharmacia, Freiburg
Netzgerät Macrodrive 5	
Mini-Gel-Elektrophorese-Einheit	Pharmacia, Freiburg
Milli Q-Anlage	Millipore, Eschborn
Netzgerät Modell 200/2.0	Biorad, München
Ozonanalysator CSI 3100	Columbia Scientific Instruments, USA
Ozongenerator 500	Fischer, Meckenheim
Protein-Sequenzierer 470 A	Applied Biosystems, Weiterstadt
Scanner OmniMedia 6 CX	XRS, USA
Thermoblock	Liebisch, Freiburg
Elektrophoretische Transfer Zelle Trans Blot SD Semi-dry	Biorad, München
UV-B Fluoreszenz-Lampen TL 12	Philips, Eindhoven
Vertikale Elektrophorese-Kammer Protean II xi	Biorad, München

1.2. Chemikalien

Es wurden Chemikalien der Firmen Aldrich, Biorad, Boehringer, Calbiochem, Fluka, Roth, Serva und Sigma eingesetzt. Die N,N'-Bis-methylenacrylamidlösung (Protogel: Acrylamid 30% (w/v), Bis 0.8% (w/v)) wurde von National Diagnostics (Stuttgart) bezogen. Zur Herstellung von Agarose-Gelen für die Immunelektrophorese wurde Biorad Agarose (Elektrophorese-Reinheitsgrad) verwendet.

1.3. Verbrauchsmaterialien

Einheitserde Typ T	Industrie-Erde Werk, Lauterbach Wallenrod
Fujichrome Dia 400 ASA	Fuji, Japan

Mikrotiterplatten	Biorad, München
Costar 96 Well Flat Bottom EIA Plates	
Perlite	Dämmstoff GmbH und Co, Dortmund
Pflanzschalen	Emanuel, München
TeKu-Pflanzcontainer	Emanuel, München
Transfer Membran Immobilon-P (PVDF, 0.45 µm)	Millipore, Eschborn
Transfer Membran (supported Nitrocellulose, 0.45µm)	Biorad, München

1.4. Pflanzenmaterial

Die Samen von *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 wurden von Dr. G.H.M. Krause (Landesanstalt für Immissionsschutz, Essen), die von *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel B von Prof. T.A. Mansfield (Lancaster, GB) zur Verfügung gestellt.

2. Anzucht der Tabakpflanzen

Tabaksamen wurden in einer 2:1 (v/v) Mischung aus Fruhstorfer Einheitserde und Perlite ausgesät, gewässert und mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Keimung von Bel B bzw. von Bel W3 erfolgte nach sieben bzw. zehn Tagen. Vier Wochen später wurden die Pflanzen in Plastiktöpfe (TeKu Container, Durchmesser 14 cm, schwarz) pikiert, und jeweils zunächst acht, nach zwei Wochen zur Vermeidung gegenseitiger Beschattung nur mehr sechs Töpfe in eine Pflanzschale gestellt. Die Pflanzen wurden täglich über diese Pflanzschalen mit deionisiertem Wasser gegossen und zweimal wöchentlich mit Blumendünger (2,5 ml Substral pro Liter deionisiertem Wasser; 100 ml pro Pflanze) gedüngt. Die Anzucht erfolgte bei $25/20 \pm 1^\circ\text{C}$ (Tag/Nacht), einer relativen Luftfeuchte von $70 \pm 5\%$ und einem zwölfstündigen Tag-Nachtzyklus ($6^\circ\text{--}18^\circ$ Uhr Licht von $60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Sylvania FR 96T12/215 W cool white Lampen) in einer klimatisierten Phytokammer, die an das Reinluftsystem angeschlossen ist (Langebartels et al., 1991). Acht bis zehn Wochen nach Aussaat wurden die Pflanzen bei einer Höhe von 20 bis 25 cm für Versuche eingesetzt.

3. Schadgasbehandlung von Tabakpflanzen

3.1. Ozonerzeugung und -analyse

Die Erzeugung von Ozon erfolgte mit Hilfe eines Ozongenerators (Modell 500, Fischer, Meckenheim) durch elektrische Entladung aus reinem Sauerstoff (Langebartels et al., 1991). Die Bestimmung der Ozonkonzentration wurde UV-

photometrisch mit einem Ozonanalysator (CSI 3100, Columbia Scientific Instruments, USA) durchgeführt, und der aktuelle Wert computergesteuert an den jeweiligen Sollwert angeglichen. Im Abstand von 30 s wurden die Meßwerte von einem Schreiber (Lamman Servokass 600) aufgezeichnet.

3.2. Expositionsküvetten

In einer mit der Anzuchtskammer vergleichbaren Klimakammer (Raab und Thiele) standen vier Plexiglasküvetten (70 x 110 x 110 cm) zur Verfügung, die einzeln mit gefilterter Frischluft versorgt wurden, und in die per Zuluftstrom Ozon zudosiert werden konnte. Über Teflonschläuche war eine Verbindung der Küvettenluft mit dem Ozonanalysator gegeben und somit eine kontinuierliche Ozonkonzentrationsbestimmung gewährleistet. Die klimatischen sowie die Lichtbedingungen wurden in Übereinstimmung mit den jeweiligen Anzuchtbedingungen gewählt.

3.3. Behandlung von Tabakpflanzen mit O₃

Alle in Expositionsversuchen eingesetzten Tabakpflanzen wurden in Reinluft angezogen (s. 2.), wie von Langebartels et al. (1991) beschrieben. Im Alter von acht bis zehn Wochen wurden die Pflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) einer fünfständigen Standard-Behandlung mit 150 n/l Ozon bzw. Reinluft in den Expositionsküvetten unterzogen. Die Behandlung erfolgte jeweils zwischen 9.00 und 14.00 Uhr. In allen Versuchen wurden gleichzeitig Kontrollpflanzen in Reinluft gehalten, die stets parallel mit den ozonbehandelten Pflanzen geerntet wurden, um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

3.4. Bonitur von Blattschäden

Die Blätter wurden von oben nach unten durchnummeriert. Als Blatt 1 wurde das erste Blatt ausgehend vom Vegetationspunkt der Pflanze, das größer als 8 cm war, bezeichnet. Die Einstufung der Blattschäden erfolgte nach Langebartels et al. (1991) prozentual zur Gesamtblattfläche.

3.5. Behandlung von Tabakpflanzen mit O₃ und NO₂ bzw. mit Ethylen

Die simultane Behandlung mit Ozon und NO₂ bzw. die Ethylenbehandlung erfolgten nach Graf (1993). Die neun Wochen alten Pflanzen (cv. Bel B) wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen (5 h / Tag) mit je 120 ± 20 n/l behandelt.

3.6. Behandlung von Tabakpflanzen mit CO₂

Zwei Monate alte Pflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) wurden in die Expositionsammern des GSF-Phytotrons (Payer et al., 1994) transferiert und sechs Tage in schadstofffreier Luft an höhere Lichtintensitäten adaptiert. Die Klimabedingungen beinhalteten einen 12 Stunden Licht (6.00-18.00; PPFR_{400-700 nm} $1100 \pm 50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$) / 12 Stunden Nacht -Zyklus und relative Luftfeuchtigkeiten zwischen 60 und 70%. Die Windgeschwindigkeit lag bei ca. 0.6 m/s. Die photosynthetisch aktive Strahlung (PPFR) stieg von 6.00 bis 7.00 Uhr an und fiel zwischen 17.00 und 18.00 Uhr wieder ab. Die Pflanzen wurden 7 h bzw. 24 h kontinuierlich mit erhöhtem CO₂ ($1820 \pm 5 \mu\text{l/l}$) behandelt. Kontrollpflanzen wurden parallel dazu in Reinfluft ($370 \pm 2 \mu\text{l/l}$ CO₂) gehalten.

3.7. Behandlung von Tabakpflanzen mit O₃ und/oder *Botrytis cinerea*

Sieben Wochen alte Pflanzen (cv. Bel W3) wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils fünf Stunden (10.00-15.00) mit den Ozonkonzentrationen 85 n/l, 165 n/l und 250 n/l behandelt. Entsprechende Kontrollpflanzen wurden in Reinfluft gehalten. Jeweils die Hälfte der mit Ozon vorbehandelten bzw. nicht vorbehandelten Pflanzen wurde mit Hyphensuspension aus einer *Botrytis cinerea*-Flüssigkultur beimpft (s. Anegg, 1995). Alle Versuchspflanzen wurden simultan 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet.

4. Behandlung von Tabakpflanzen mit UV-B und/oder O₃

Für Experimente mit kombinierter Ozon- und UV-B -Behandlung wurde die GSF-Phytotronanlage genutzt. Sie besteht aus vier begehbaren Expositionsammern (Nutzraum: 3.3 m x 2.8 m x 2.5 m) und einem Sonnensimulator mit kleinerem Nutzraum (Maße: 1.2 m x 1.2 m x 0.25 m). Das Bauprinzip der Phytotronanlage sowie detaillierte Beschreibungen sind in der Literatur zu finden (Seckmeyer und Payer, 1993; Döhring et al., 1994; Payer et al., 1994; Thiel et al., 1996).

An zwei aufeinanderfolgenden Tagen wurden neun Wochen alte Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) jeweils 5 h lang mit UV-B, mit Ozon oder mit UV-B und Ozon behandelt (V 62, s. III.4.). Vor Beginn der Exposition wurden die Pflanzen sechs Tage an die höheren Lichtintensitäten (PPFR ca. $1100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) adaptiert. Zu den Klima-Bedingungen gehörte ein Zyklus mit 14 h Licht (6.00-20.00 h) und 10 h Dunkelheit. Die photosynthetisch aktive Strahlung stieg von 6.00 bis 7.00 Uhr an und nahm zwischen 19.00 und 20.00 Uhr wieder ab. Alle anderen Parameter waren identisch mit denjenigen bei CO₂-Behandlung (vgl. 3.6.). Die Ozon- bzw. UV-Dosen sind den entsprechenden

Expositionsprofilen (s. III.4., Abb. 30) zu entnehmen. Bei kombinierter Behandlung mit UV-B und Ozon stimmten die Konzentrationen der einzelnen Parameter mit den Konzentrationen bei Behandlung mit nur jeweils einem Parameter überein. Maximale Ozonkonzentrationen waren 160 ± 10 nI/l.

UV-B Strahlung wurde zwischen 9.00 und 14.00 Uhr durch UV-B Fluoreszenzlampe (TL 12; Philips, Eindhoven, Niederlande) erzeugt. UV-C wurde durch Verwendung von zwei Borsilikat-Glas-Schichten (5 mm Tempax, 6,5 mm Pyran; Schott, Mainz, Deutschland) ausgeschlossen. Die Spektren im UV-Bereich wurden mit Hilfe eines Bentham Doppel-Monochromator Spektorradiometers (Thiel et al., 1996) gemessen. Die UV-B Strahlung wurde in MED-Einheiten (MED=Minimale Erythem-wirksame Dosis) ausgedrückt und war ca. 0.67 MED/h oder 7.5 MED als Gesamtdosis. Sie wurde durch kontinuierliches Monitoring mit Hilfe eines Robertson-Berger Meters (Biometer Modell 501, Solar Light, USA) erfaßt.

Bei Versuchen im Sonnensimulator (s. III.3.) wurde der Versuchsraum in vier Quadranten aufgeteilt, wodurch gleichzeitig vier verschiedene Glasfilter-Kombinationen eingesetzt werden konnten, nämlich (1) Sanalux+Plexiglas, (2) Sanalux+Sanalux, (3) Sanalux+Pyran, (4) Sanalux+Fensterglas.

Die entsprechenden cut-off Wellenlängen waren 277 nm (1), 287 nm (2), 293 nm (3) und 312 nm (4), die als Schnittpunkte der Strahlungs-Spektren bei 10^{-1} mW m⁻² nm⁻¹ Bestrahlungsstärke (vgl. III.3.) mit der Abszisse (Wellenlänge) zu verstehen sind (Döhring et al., 1996).

Sechs Wochen alte Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) wurden in den Sonnensimulator (Seckmeyer und Payer, 1993) transferiert, der folgende Klima- und Lichtbedingungen aufwies: 70 ± 5 % rel. Luftfeuchte, $25/20 \pm 2^\circ\text{C}$ (Tag/Nacht), 14 h Lichtperiode (6.00-20.00 h). Dabei wurden zwei Weißlichtkreise (VIS C1+C2) genutzt, wobei C1 bzw. C2 um 6.00 bzw. 7.00 Uhr an- und um 20.00 bzw. 19.00 ausgeschaltet wurde. Die verschiedenen Lampentypen der Lichtkreise sind Döhring et al. (1994) zu entnehmen. Die photosynthetisch aktive Strahlung (PPFR) betrug ca. $400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Bevor die UV-Behandlung gestartet wurde, wurden die Pflanzen vier Tage an höhere Lichtintensitäten adaptiert. Dann wurden sie für 3x5 h (jeweils von 9.00 bis 14.00 h) an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit UV-Licht behandelt. Das Anschalten der drei UV-B-Lampenkreise, die aus 96 UV-B Fluoreszenzlampe (TL 12; Philips, Eindhoven, Niederlande) bestehen, verursachte auch eine Zunahme in der UV-A Strahlung (320-400 nm) von 20 auf 26 W m^{-2} .

Die Spektren im UV-Bereich (s. III.3.) wurden mit Hilfe eines Bentham Doppel-Monochromator Spektorradiometers (Thiel et al., 1996) gemessen. Die biologisch effektive UV-B Strahlung (UV-B_{BE}) wurde mit Hilfe des pflanzlichen Wirkungsspektrum von Caldwell (1971) berechnet. Die Tab. 4 faßt die in diesem Versuch vorherrschenden physikalischen Parameter zusammen.

Tab. 4: Physikalische Parameter der UV-B Behandlung im Sonnensimulator-Versuch (s. III. 5.) unter Einsatz von vier verschiedenen Filtertypen (1-4): (1) Sanalux+Plexiglas, (2) Sanalux+Sanalux, (3) Sanalux+Pyran, (4) Sanalux+Fensterglas; UV-B_{BE}, biologisch effektive UV-B Strahlung nach Caldwell (1971).

Filtertyp, cut-off Wellenlänge [nm]	Erythem-wirksame Strahlung [MED/h]	UV-B _{BE} nach Caldwell [mW m ⁻²]	UV-C < 280 nm [W m ⁻²]	UV-B 280-320 nm [W m ⁻²]	UV-A 320-400 nm [W m ⁻²]
1	26.3	2700	1*10 ⁻³	9.4	27.0
2	7.2	680	2*10 ⁻⁵	4.7	24.2
3	3.1	250	-	2.8	22.6
4	0.13	-	-	0.02	14.1

Um eventuelle Starklichteffekte getrennt von UV-B Wirkungen auf Proteine im Apoplasten beobachten zu können, wurde in einem anderen Versuch ein Teil der sieben Wochen alten cv. Bel W3 Pflanzen in den Sonnensimulator transferiert, der andere Teil wurde in der Anzuchtskammer weiterkultiviert. Die Pflanzen im Sonnensimulator wurden dort neun Tage an die Starklichtbedingungen adaptiert (14 h Licht, 4.00-18.00 Uhr, ca. 450 W m⁻² im Vergleich zu ca. 90 W m⁻² in der Anzuchtskammer) und dann drei Tage zusätzlich mit UV-B (jeweils 6 h / Tag, 8.00-14.00 Uhr) behandelt. Als UV-Filter wurden zwei neue Tempax-Glasscheiben (cut-off bei ca. 291 nm) verwendet. Die Kontrollpflanzen im Sonnensimulator wurden unter Fensterglas gehalten.

Die mit bzw. ohne UV-B behandelten Pflanzen im Sonnensimulator (unter Starklichtbedingungen) wurden gleichzeitig mit den Pflanzen in der Anzuchtskammer, nämlich 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Aus je einer Blathälfte (der Blätter 3 und 4) wurde interzelluläre Waschflüssigkeit (s. 6.) gewonnen, die bei -70°C gelagert wurde.

5. Ozon-Exposition von Tabakpflanzen im Freiland

In Zusammenarbeit mit L. Grünhage und H.J. Jäger (Institut für Pflanzenökologie, Universität Gießen) wurden in Versuchen des Jahres 1994 Tabakpflanzen (cv. Bel W3; Samenmaterial s. 1.4.) von Mai bis September für jeweils 14 Tage auf dem Versuchsfeld der Universität Gießen in Fürth/Odenwald unter Standard-Bedingungen für Bioindikatorpflanzen exponiert. Die Expositionseinrichtung im Freiland bestand aus einer mit Kunststoff überzogenen

Eisenrahmenkonstruktion, in der maximal sechs Einsätze mit je vier Pflanzen befestigt werden konnten. Sie war oben und an den drei Seiten mit grünem Schattiergewebe bespannt (Schattierwert 50 %) und nur nach Norden geöffnet (s. Abb. 5).



Abb. 5: Expositionseinrichtung im Freiland (Fürth/Odenwald)

Die Pflanzen wurden im Gewächshaus in handelsüblicher Einheitserde (Typ LD 80) angezogen und im Alter von vier Wochen in TeKu Container (Durchmesser 16 cm, schwarz) pikiert. Gegen Pathogen-Befall (Blattläuse, weiße Fliegen etc.) wurde während der Anzucht bei Bedarf Neudosan (Neudorf) eingesetzt. Im Alter von ca. acht Wochen wurden sie in die Freilandexpositionsvorrichtung transferiert und dort für jeweils 14 Tage der ambienten Ozonbelastung ausgesetzt. Die Expositionsperioden überlappten sich um jeweils eine Woche, so daß insgesamt von Mai bis September 1994 15 Perioden à 14 d untersucht wurden (s. Abb. 6).

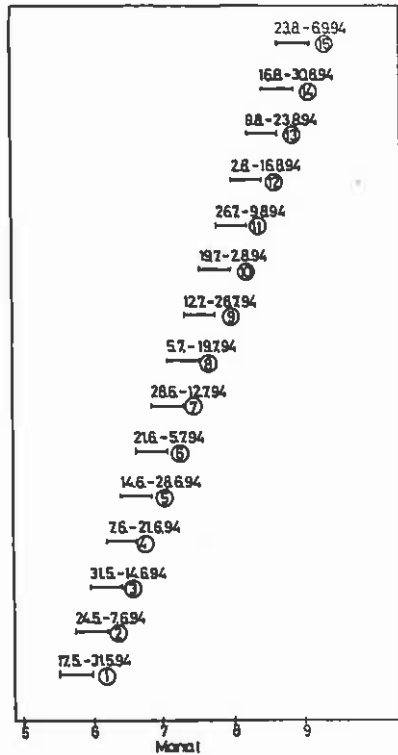


Abb. 6: Darstellung der sich überlappenden Expositionsperioden (1-15) des Jahres 1994 (Freilandversuch, Fürth/Odenwald)

Die Klima- und Ozonparameter wurden von einer Meßstation vor Ort aufgenommen. Nach jeweils 14 d Exposition wurden die Blätter auf Ozonschäden (in % Blattfläche) bonitiert (s. 3.4.), nach Blattnummern getrennt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C für anschließende biochemische Analysen gelagert.

6. Gewinnung von interzellulärer Waschflüssigkeit (IWF)

Um IWF zu gewinnen, wurden Blatthälften (ohne Mittelrippe) unter Vakuum (ca. 200 mbar; zweimal in Folge) mit Puffer (50 mM Natriumacetatpuffer pH 5.0, 100 mM KCl, 5 mM DTE) infiltriert (Kerner, 1990; Langebartels et al., 1991). Durch das Vakuum wurde die Luft aus den Interzellularen verdrängt und beim nachfolgenden langsamen Druckausgleich der Infiltrationspuffer in den Apoplasten eingesogen. Um die Blatthälften möglichst vollständig zu infiltrieren, wurde der Vorgang mindestens ein- bis maximal zweimal (pro Blatthälfte) wiederholt, wobei die dunkelgrüne Verfärbung der Blätter das Eindringen der Infiltrationsflüssigkeit in die Interzellularen widerspiegelte. Die infiltrierte Fläche betrug 70-90 % der Blatthälftenfläche. Anschließend wurden die infiltrierten Blätter vorsichtig (mit weichen Papiertüchern) abgetrocknet, eingerollt (Blattunterseite nach außen) und (mit der Schnittkante nach oben) in Eppendorf Variotips abzentrifugiert (1000 g, 15 min). Die IWF wurde dabei in Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Bei beiden Tabakkultivaren betrug das Volumen der interzellulären Waschflüssigkeit ca. 300-500 µl/g FG. Der Proteingehalt lag bei ca. 100-200 µg Protein/ml IWF bzw. ca. 30-100 µg Protein/g FG.

7. Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde nach Bradford (1976) ermittelt. Das Färbereagenz wurde nach Schraudner (1992) hergestellt. Die Bestimmung erfolgte im Mikroansatz, wobei 200 µl Färbereagenz zu 10 µl Probe gegeben wurden. Von jeder Probe wurden jeweils drei Parallelen bestimmt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin verwendet. Gemessen wurde nach 15 min bei 590 nm in einem Elisa-Mikrotiterplatten-Lesegerät (MWG-Biotech, Ebersberg).

8. Bestimmung von Enzymaktivitäten

8.1. Oxalatoxidase-Aktivität

Der Test wurde im wesentlichen nach Lane et al. (1993) durchgeführt. Die zu untersuchenden Proben (IWF) wurden durch Gefriertrocknung (bis fast zur Trockne) aufkonzentriert. Als Standard wurde gereinigte Oxalatoxidase aus Gerstenkeimlingen (Boehringer Mannheim) verwendet. Die IWF bzw. der Standard wurden im Verhältnis 2:1 mit 1%igem SDS-Probenpuffer versetzt, jedoch keiner Hitzedenaturierung (s. 10.3.) unterzogen. Jeweils mindestens 60 µg IWF-Protein bzw. 5 µg gereinigtes Enzym wurden auf SDS-Mini-Gele (s. 6.2.)

aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf Nitrozellulose-Membranen (Biorad, München) geblottet (vgl. 12.4.1.). Der Aktivitäts-Nachweis erfolgte auf dem Blot durch Kombinieren von 5 ml „Substrat“-Lösung (Puffer aus 2 mM Oxalat, 100 mM Succinat, pH 3.5) und 3 ml „Entwickler“-Lösung (250 µg 4 - Aminoantipyrin, 40 units Meerrettich-Peroxidase (Sigma, Deisenhofen) und 0.6 µl N,N-Dimethylanilin in 100 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 5.5). Innerhalb von ca. 5 min wurde bei vorhandener Oxalatoxidase-Aktivität eine violette Proteinbande sichtbar.

8.2. β -1,3-Glucanase-Aktivität

Zur Herstellung der Rohextrakte wurde Blattmaterial (je 0.2 g) unter flüssigem N₂ gemörsert, mit je 1 ml 70 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.5) versetzt und während des Auftauens mehrmals gründlich durchmischt. Nach Abzentrifugieren der Proben (15000 g, 10 min, 4°C; 3K12 Zentrifuge, Sigma, Deisenhofen) wurde der Überstand dekantiert und als Rohextrakt bei -70°C gelagert.

Die Aktivitätsmessung erfolgte nach Siefert et al. (1994) fluoreszenz-photometrisch, wobei als Substrat Laminarin (Sigma, Deisenhofen), ein Reservepolysaccharid aus der Braunalge *Laminaria digitata* (Strasburger, 1991), verwendet wurde. Der Reaktionsansatz enthielt 50 µl des Rohextraktes, der mit 70 mM Natriumacetatpuffer (pH 5.5) 1:10 (Kammerexperimente) bzw. 1:30 (Freilandproben) verdünnt worden war, und 100 µg Laminarin (Sigma, Deisenhofen) in 0.1 ml 50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6.0). Inkubiert wurde 30 min lang unter Schütteln bei 37 °C (Wasserbad). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl 4 M NaOH und anschließendes Erhitzen (80°C, 5 min) abgestoppt. Nach Zugabe des Färbereagenzes zur Ausbildung des fluoreszierenden Sirofluor-Laminarin Komplexes (Evans und Hoyne, 1984), das aus 0.4 ml 0.1 % (w/v) Anilinblau in dest. Wasser, 0.2 ml 1 M HCl und 0.6 ml 1 M Glycin-NaOH Puffer (pH 9.5) bestand, wurden die Proben 20 min bei 50°C inkubiert und im Dunkeln über Nacht bei 25°C geschüttelt. Unter Benutzung von thermostatisierten (25°C) Hellma Präzisionsküvetten (10.00 mm Schichtdicke, optisches Spezialglas) wurden die Proben bei einer Exzitationswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 480 nm in einem Fluoreszenzphotometer (F-3000, Hitachi, München) gemessen. Von jedem Extrakt wurden drei Parallelansätze und ein vierter Ansatz, in dem durch sofortige NaOH-Zugabe der Laminarinabbau verhindert wurde, untersucht. Aus der Differenz der vor Beginn der Reaktion abgestoppten Probe und dem Mittelwert der drei anderen Proben ergab sich die enzymatisch abgebaute Laminarinmenge. Nach Schraudner et al. (1992) wurde die resultierende β -1,3-Glucanase Aktivität berechnet und in nkat g⁻¹ FG ausgedrückt.

8.3. Chitinase-Aktivität

Die photometrische Messung der Chitinaseaktivität erfolgte nach Wirth und Wolf (1990) und Vogelsang und Barz (1993). Als Substrat wurde eine 0.2%ige (w/v) Lösung von Carboxymethylchitin-Remazol-Brilliant-Violett (CM-Chitin-RBV, Blue Substrates, Loewe, Otterfing) verwendet. Durch den enzymatischen Abbau entstanden Oligomere, die wasserlöslich waren und nach Abzentrifugieren des, unverbrauchten Substrates bei 550 nm photometrisch detektiert werden konnten. Die Herstellung des Rohextraktes erfolgte analog zur β -1,3-Glucanase-Aktivitäts-Bestimmung.

Im Reaktionsansatz wurden 300 μ l einer geeigneten Rohextraktverdünnung (1:30 in 70 mM Natriumacetatpuffer, pH 5.5) bzw. 300 μ l Natriumacetatpuffer als Leerwert bei 37°C 10 min im Wasserbad unter Schütteln vorinkubiert.

Durch Zugabe von 100 μ l Substrat wurde die enzymatische Reaktion gestartet. Die folgende Reaktionszeit betrug 10 min bei 37°C (unter Schütteln im Wasserbad). Die Reaktion wurde durch Zusetzen von 100 μ l 2 M HCl beendet. Nach einer 10 minütigen Präzipitationsphase des unverbrauchten Substrates auf Eis wurden die Proben abzentrifugiert (10000 g, 10 min, 4°C; 3K12 Zentrifuge, Sigma, Deisenhofen). Der Überstand wurde in Halbmikroküvetten (Plastibrand, 1.5 ml; Brand, Wertheim/Main) bei 550 nm in einem Spectrophotometer (DU-7, Beckman, München) gemessen. Von jedem Rohextrakt wurden drei Parallelansätze untersucht. Aus der optischen Dichte mit Enzym und ohne Enzym (Nullwert) wurde die Differenz gebildet ($\Delta OD_{550\text{ nm}}$). Die Berechnung der Chitinase-Aktivität erfolgte nach Vogelsang und Barz (1993), wobei 1 Unit als $\Delta OD_{550\text{ nm}} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ definiert wurde.

9. Bestimmung von ACC und MACC

Der Gehalt an ACC (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat) bzw. MACC (N-malonyl-ACC) erfolgte, wie bei Langebartels et al. (1991) beschrieben.

Blattmaterial (0.2 g) wurde unter flüssigem N_2 homogenisiert und mit 1 ml 80 % (v/v) Ethanol extrahiert. Das Pellet wurde nach Zentrifugation (10 000 g, 5 min) noch zweimal mit 0.5 ml 80 % (v/v) Ethanol extrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und durch Gelfiltration (NAP-5 Säulchen, Pharmacia) aufkonzentriert. Der Rest wurde in 1 ml Milli Q Wasser aufgenommen und mit 1 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die wäßrige Phase wurde *in vacuo* aufkonzentriert (bis zur Trockne) und in 1 ml H_2O aufgenommen. Der ACC-Gehalt wurde nach Lizada und Yang (1979) bestimmt. Der MACC-Gehalt wurde nach einer sauren Hydrolyse (2 N HCl, 3 h, 120 °C) der Ethanolextrakte bestimmt, indem der ACC Wert der nicht-hydrolysierten Probe von dem ACC-Gehalt der hydrolysierten abgezogen wurde. Alle Bestimmungen wurden in mindestens drei Parallelansätzen durchgeführt.

10. Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamidgelen

10.1. Trenn-Prinzip

Die SDS (Natriumdodecylsulfat)-Elektrophorese trennt ausschließlich nach unterschiedlichen Molekulargewichten/Molekülgrößen auf. Durch das anionische Detergenz SDS entstehen negativ geladene Protein-Mizellen mit konstanter Nettoladung pro Masseneinheit (mit ca. 1.4 g SDS / g Protein), die im elektrischen Feld wegen einheitlicher Ladung alle in Richtung Anode wandern. Ferner bewirkt SDS eine Auflösung der Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und damit eine Entfaltung und Streckung der Moleküle (R. Westermeier, 1990).

Durch Zugabe von β -Mercaptoethanol (oder DTT) - einer reduzierenden Thiolverbindung - dissoziieren Schwefelbindungen (z.B. zwischen Cysteinen), wodurch das jeweilige Polypeptid in seine Untereinheiten aufgespalten wird.

Es wurde ausschließlich die diskontinuierliche Gel-Elektrophorese (Laemmli, 1970) angewendet, bei der die aufgetragenen Proben zwei verschiedene Gele, nämlich ein Sammelgel und ein Trenngel durchlaufen. Die beiden Gele unterscheiden sich im pH-Wert des Puffers (Sammelgelpuffer pH 6.8, Trenngelpuffer pH 8.8), im Vernetzungsgrad der Polyacrylamidgel-Matrix (Sammelgel 4 % bzw. 5 %, Trenngel z.B. 12 %) sowie ihrer Größe (Sammelgel ca. 20-25 % des Gesamtgels). Neben Gelen mit konstanten Porendurchmessern wurden auch Poren-Gradienten-Gele verwendet (z.B. 12-15 % - oder 15-18 % - iges Trenngel), die mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen wurden und sich durch einen weiteren Trennbereich und sehr scharfe Protein-Banden auszeichnen. Generell wurde mit Hilfe von Markerproteingemischen über eine Eichkurve das Molekulargewicht der Proteine ermittelt. Es besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der jeweiligen Molekulargewichte und den relativen Wanderungstrecken der SDS-Polypeptid-Mizellen.

10.2. Pipettierschema

Pipettieranleitung für fünf 0.75 mm dicke SDS-Mini-Polyacrylamidgele (ca. 8 cm x 6 cm Fläche; Mini-Gelapparatur, Pharmacia, Freiburg) bzw. zwei 0.75 mm dicke denaturierende Gele von 18 cm x 15 cm (Protean II xi Vertical Electrophoresis Cell, Biorad, München):

Trenngel - mit konstantem Porendurchmesser von z.B. 13 %:

- 13.0 ml Protogellösung (National Diagnostics, Stuttgart)
- 7.5 ml Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- 0.3 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung

- 9.0 ml bidest. Wasser
- 150 μ l 10 % (w/v) Ammoniumpersulfat-Lösung
- 15 μ l Temed (Biorad, Richmond, CA)

Gradienten-Trenngel (z.B. 12-15 %):

„leichte“ Lösung (12 %):

- 8 ml Protogellösung (s.o.)
- 5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8.8)
- 100 μ l 20 % (w/v) SDS-Lösung
- 6.89 ml bidest. Wasser

„schwere“ Lösung (15 %):

- 10 ml Protogellösung (s.o.)
- 5 ml Trenngelpuffer (s.o.)
- 100 μ l 20 % (w/v) SDS-Lösung
- 0.89 ml bidest. Wasser
- 5 ml Glycerin

Jew. 10 ml von der „leichten“ bzw. der „schweren“ Lösung wurden mit je 4.9 μ l Temed und je 40 μ l Ammoniumpersulfatlösung (10 % w/v) versetzt und mit Hilfe eines Gradientenmischers (Model 385 Gradient Former, Biorad) gegossen.

Sammelgel 4 %:

- 2 ml Protogellösung (s.o.)
- 3.75 ml Sammelgel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6.8)
- 150 μ l 10 % SDS (w/v) - Lösung
- 9.0 ml bidest. Wasser
- 75 μ l Ammoniumpersulfatlösung (10 % w/v)
- 6 μ l Temed

Vor Zugabe von SDS sowie von Ammoniumpersulfat und Temed wurde die Lösung stets mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast.

10.3. Probenvorbereitung und Auftrennungsparameter

Es wurden z.B. Proteine aus der interzellulären Waschflüssigkeit (s. III. 2.) unter denaturierenden Bedingungen in SDS-Gelelen von 18 cm x 15 cm Größe vertikal

gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde die IWF im Verhältnis 2:1 mit SDS-Probenpuffer (2.5 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8; 2.0 ml Glycerin; 1.0 mg Bromphenol-Blau; 1.0 ml β -Mercaptoethanol; 2.0 ml 10 % (w/v) SDS-Lösung; 2.5 ml bidest. Wasser) versetzt, die Proteine denaturiert (5 min bei 95°C) und jeweils 10 μ g Protein pro Geltasche aufgetragen. Der Elektrodenpuffer wurde aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS, pH 8.3 frisch angesetzt.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mit einer Stromstärke von 30 mA im Sammelgel und 35 mA im Trenngel bei 10°C innerhalb von 3-4 h.

10.4. Färbemethoden

- Coomassie-Blau-Färbung:

Die Färbung der Gele erfolgte 30 min in der Färbelösung (0.1 % PhastGelBlue R350, Pharmacia in Methanol/Essigsäure/H₂O, 5:1:5, v/v/v). Anschließend wurde dreimal in je 30minütigen Intervallen mit Entfärber (Methanol/Essigsäure/H₂O, 2:1:7, v/v/v) die überschüssige Farbe entfernt.

- Silberfärbung

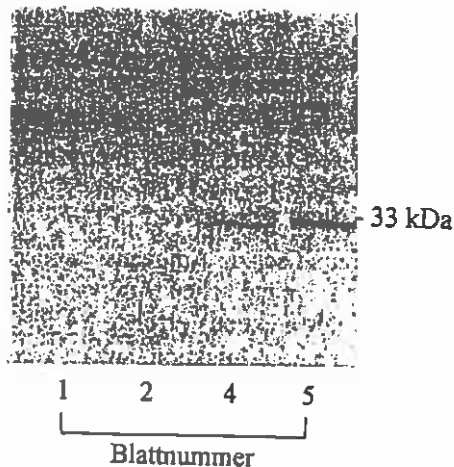
Lösung I:	40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Lösung II:	10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure
Lösung III:	10 % (v/v) Glutaraldehyd
DTT-Lsg.:	5 μ g/ml H ₂ O dest.
Silbernitratlsg.:	0.1 % (w/v) AgNO ₃
Entwickler:	3 % (w/v) Na ₂ CO ₃ , 0.05 % (v/v) Formaldehyd

Die Gele wurden zunächst 30 min in 500 ml der Lösung I, anschließend zweimal 30 min in Lsg. II (je 500 ml) und 30 min in Lsg. III (100 ml) fixiert. Dann wurden sie 24 h in bidest. Wasser inkubiert. Zur Färbung wurden die aufgetrennten Proteine im folgenden 30 min lang in DTT-Lösung (200 ml) reduziert und anschließend 30 min in Silbernitratlösung (200 ml) geschüttelt, bis die Proteinbanden braun angefärbt waren. Ein Abstoppen der Färbereaktion erfolgte mit kristalliner Zitronensäure. Nach der Färbung wurden die Gele 90 min lang bei 60°C auf dem Geltrockner (Bachofer, Reutlingen) unter Vakuum getrocknet.

11. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern aus Kaninchen-Antiseren

Die Antigene (gereinigte Enzymfraktionen von β -1,3-Glucanase und Chitinase), die für die Antikörpergewinnung verwendet wurden, stammten aus einer Isolierung aus *Nicotiana tabacum* L. cv. Havana 425 und wurden

freundlicherweise von Prof. F. Meins (Friedrich-Miescher-Institut, Basel) zur Verfügung gestellt, ebenso wie die lyophilisierten Antikörper β -1,3-Glucanase und Chitinase, die zur Etablierung der immunologischen Techniken (s. 12.) verwendet wurden. Während der Chitinase-Antikörper spezifisch nur mit basischen Isoformen bei 32 kDa und 34 kDa reagiert (Keefe et al., 1990), ist bei dem anti- β -1,3-Glucanase IgG neben der Erkennung der basischen Isoform bei 33 kDa auch eine Kreuzreaktivität mit sauren Isoformen, wie z.B. der sauren β -1,3-Glucanase bei 36 kDa bekannt (Neuhaus et al., 1992). Diese Antikörper konnten mit Hilfe der entsprechenden Antigene durch Kaninchen-Immunisierung (s. 11.1.) in größeren Mengen nachproduziert werden. Abb. 7 zeigt am Beispiel des β -1,3-Glucanase Antikörpers, daß die neu gewonnenen Immunglobuline bei Inkubation mit den gleichen Rohextrakten genauso reagierten wie die lyophilisierten von Prof. F. Meins (Friedrich-Miescher-Institut, Basel). Der Glucanase-Antikörper detektierte eine basische Isoform der β -1,3-Glucanase mit einem Molekulargewicht von ca. 33 kDa. Der Chitinase-Antikörper war spezifisch für zwei basische Isoformen der Chitinase bei 32 kDa und 34 kDa. Eine möglicherweise als Folge des Lyophilisierens aufgetretene artifizielle Präzipitationslinie (bei ca. 72 kDa) konnte bei Verwendung der selbst gewonnenen Antikörper (, die nicht lyophilisiert wurden,) nicht beobachtet werden. Für alle vorgestellten Ergebnisse (s. III.), die mit Hilfe von Antikörpern erzielt wurden, wurden die selbst gewonnenen Antikörper (s. 11.1.-11.4.) verwendet.



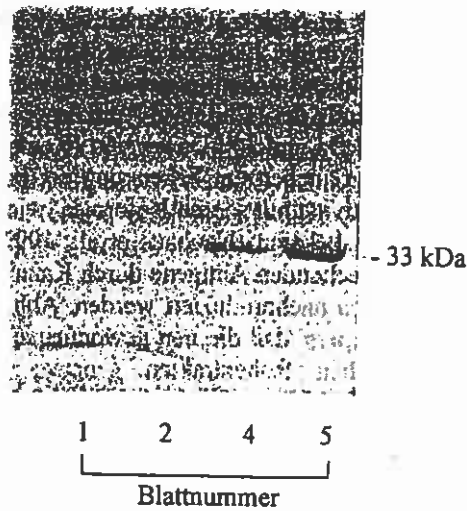


Abb. 7: Immunologisch detektierte β -1,3-Glucanase (33 kDa) unter Verwendung von (a) IgG von Prof. F. Meins (Friedrich-Miescher-Institut, Basel), (b) durch Kaninchen-Immunsierung selbst gewonnenes IgG. Bei (a) und (b) wurden jeweils 30 μ g Protein der gleichen Gesamtblattextrakte (cv. Bel W3) eingesetzt: 1, Blattnummer 1; 2, Blattnummer 2; 4, Blattnummer 4; 5, Blattnummer 5

11.1. Immunisierung von Kaninchen gegen β -1,3-Glucanase und Chitinase

Ein Kaninchen (1 kg, weiblich) wurde mit einer Emulsion aus 25 μ g des gereinigten β -1,3-Glucanase-Enzyms in 100 μ l physiolog. Kochsalzlösung und 100 μ l komplettem Freund'schen Adjuvans subkutan injiziert, ein zweites (vergleichbares) Kaninchen ebenso mit 150 μ l (37.5 μ g) des Chitinase-Antigens (1:1 mit komplettem Freund'schen Adjuvans gemischt). Eine erste Booster-Injektion (mit komplettem Freund'schen Adjuvans und den gleichen Antigen-Mengen wie bei der Initial-Injektion) erfolgte 14 Tage, eine weitere Booster-Injektion 21 Tage nach der Initial-Injektion, zuletzt wurden jedoch 420 μ g β -1,3-Glucanase-Antigen bzw. 430 μ g Chitinase-Antigen injiziert.

Vor der Initial-Injektion sowie zwischen den einzelnen Booster-Injektionen wurden jew. ca. 5 ml Blut (aus der Ohrarterie) abgenommen und die entsprechenden Seren auf den Antikörpertiter (indirekt über Hemmung der Enzymaktivität) getestet.

22 Tage nach der zweiten Booster-Injektion wurden die Gesamt-Kaninchenserum (jew. ca. 30 ml) durch Herz-Punktierung gewonnen.

11.2. Serum-Präparation aus Kaninchenblut

Die Serumgewinnung erfolgte wie bei Luthe (1986) beschrieben.

Das Kaninchenblut wurde 1-2 h bei Raumtemperatur stehengelassen (Klumpung und Gerinnung). Anschließend wurde das Blut über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde das Serum gesammelt durch 15minütiges Abzentrifugieren bei 5000 g. Vorsichtiges Abdekantieren des Überstandes lieferte das jeweilige Serum, das für die IgG-Präparation weiterverwendet wurde.

11.3. Gewinnung von polyklonalen Antikörpern (ex vivo) aus Kaninchen-Serum

Die Reinigung der Kaninchenserum erfolgte am Institut für Immunologie (Dr. Mysliwetz, GSF/Hämatologikum, Großhadern).

Die Gesamt-Seren wurden 1:5 mit PBS-Puffer (Phosphate-buffered saline, 0.14 M NaCl, 0.1 M K₂HPO₄, pH 7.4) verdünnt, steril filtriert und auf eine Protein G - Säule (Biorad, München) mit Pumpe (3 ml/min Durchlaufgeschwindigkeit) und UV-Monitor (beides Biorad, München) gegeben. (Die Protein G - Säule wurde vor Verwendung mit Ethanol und dann mit PBS gespült und bei 4°C gelagert.) Die an das Säulenfüllmaterial adsorbierten Kaninchen-IgGs wurden anschließend - nach Zwischenspülen der Säule mit PBS-Puffer - mit 0.1 M Na-Citratpuffer-HCl-Lösung (pH 2.7) eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen wurden jeweils mit 1 M Tris-Puffer (pH 8.0) umgepuffert (im Mengenverhältnis 1 ml Tris-Puffer : 13 ml IgG-Fraktion).

Zwischen den beiden verschiedenen Kaninchen-Seren (anti β -1,3-Glucanase bzw. anti-Chitinase) wurde die Säule mit Guanidin (Aminomethanamidin; 38.2 g auf 100 ml H₂O dest.) gereinigt, anschließend mit PBS, Ethanol und nochmals mit PBS gespült, um eine Vermischung der IgGs zu vermeiden.

Nach Umpuffern wurden die gesammelten Fraktionen über Nacht gegen PBS dialysiert und anschließend eine Proteinbestimmung durchgeführt. Da die Proteinkonzentrationen in beiden Fällen (mit ca. 3.7 mg/ml anti β -1,3-Glucanase bzw. 3.8 mg/ml anti-Chitinase) sehr hoch waren, erübrigte sich ein weiterer Einengungsschritt mit Polyethylenglykol. Die dialysierten Seren wurden ultrazentrifugiert (30 min bei 30000 rpm / 5°C) und sterilfiltriert (mit sterilen Spritzen-Filter-Aufsätzen / DynaGard, 0.2 μ m ME, Microgon Inc.). Für den sofortigen Gebrauch (s. 12.) wurden kleine Mengen aliquotiert, die mehrere Wochen lang bei 4°C gelagert werden konnten, während das Gesamtserum bei -70°C eingefroren wurde.

11.4. Präparation biotinylierter Antikörper gegen β -1,3-Glucanase und Chitinase

Nach Ultrazentrifugation der gereinigten Antikörperlösungen (15000 g; 15 min) wurde Biotin-N-Hydroxysuccinimidester (Calbiochem, Bad Soden) in DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst (3 mg/100 μ l), die Lösung in 100fachem molaren Überschuß dem gereinigten Serum zugesetzt und anschließend ca. 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Über Nacht wurde bei 4°C gegen PBS (mit zweimaligem Pufferwechsel) dialysiert, am nächsten Tag ultrazentrifugiert (s.o.) und das biotinylierte Serum bei 4°C gelagert.

12. Nachweis von Enzymkonzentrationen mittels immunologischer Testverfahren

12.1. Herstellung der Rohextrakte

Die Herstellung der Rohextrakte beruhte auf einem Extraktionsverfahren nach Sticher et al. (1992). 100 mg gemörserstes Blattmaterial wurden mit 300 μ l Extraktionspuffer (200 mM Tris pH 8.0, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0.25 mM EDTA) versetzt, kurz gepottet und 15 min bei 8800 g abzentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen und für Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISA) mit PBS-Tween (0.02 %, v/v) mindestens 1:500, für Rocket-Gele 1:10 verdünnt. Für Western blots wurde noch zusätzlich eine Proteinfällung mit 20 % (w/v) Trichloressigsäure (mind. 1 h bei 4°C) durchgeführt. Die gefällten Proteine wurden 10 min bei 15000 g (4°C) abzentrifugiert und die Pellets für die Durchführung einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) in SDS-Probenpuffer (2.5 ml 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8; 2.0 ml Glycerin; 1.0 mg Bromphenol-Blau; 1.0 ml β -Mercaptoethanol; 2.0 ml 10 % SDS-Lösung; 2.5 ml bidest. Wasser) aufgenommen, so daß sich eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml ergab. Die Suspensionen wurden 10 min bei 95°C erhitzt bis zur vollständigen Lösung der Pellets. Davon wurden je 10 μ l auf SDS-Polyacrylamid-Mini-Gele aufgetragen, so daß sich eine Proteinkonzentration von jeweils 30 μ g ergab.

12.2. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Chitinasen und β -1,3-Glucanasen wurden immunologisch in Mikrotiterplatten mit Hilfe eines „Sandwich“-ELISA nach Sticher et al. (1992) quantifiziert.

Testprinzip (Abb. 8) :

Bei dem hier verwendeten „Sandwich“-ELISA wird prinzipiell ein erster spezifischer Antikörper an die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Daran bindet das entsprechende Antigen, das wiederum von einem zweiten (spezifischen), biotinylierten Antikörper erkannt wird. An diesen vermag (über das Biotin-Molekül) ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym (z.B. alkalische Phosphatase) zu binden, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Extinktion wird photometrisch detektiert und ist ein Maß für die Konzentration des Antigens.

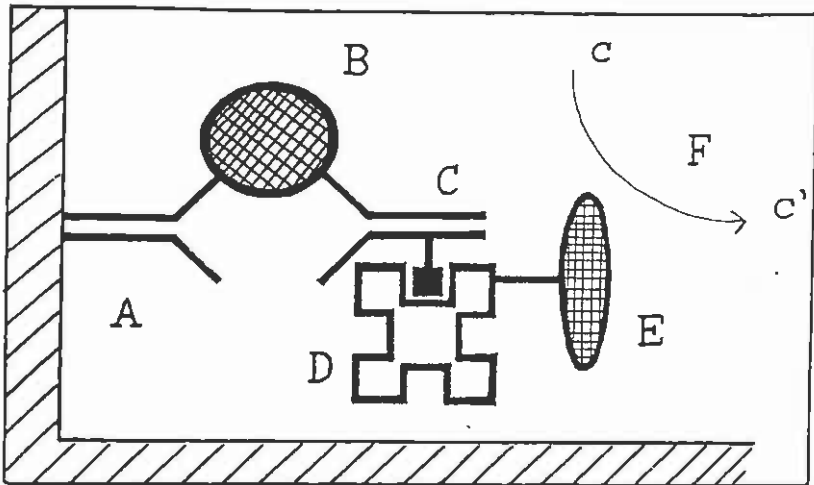


Abb. 8: Sandwich-ELISA. Schematische Darstellung des Testprinzips. A erster Antikörper, adsorbiert an die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte; B Antigen; C zweiter, biotinylierter Antikörper; D Streptavidin, gekoppelt mit einem Enzym E, das die Farbreaktion $F(c) \rightarrow (c')$ katalysiert.

12.2.1. „Coating“ der Mikrotiterplatte

Hierzu wurden 20 µg anti-B-1,3-Glucanase bzw. anti-Chitinase IgG / ml PBS-Puffer eingesetzt: Jeweils 100 µl davon pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden über Nacht bei 4°C inkubiert.

12.2.2. „Blocking“

Nach Entfernen der „Coating“-Lösung wurden jeweils 200 µl Blocking-Lösung (0.5 % (w/v) BSA in PBS mit 2 mM NaN_3) pro Vertiefung 2 h bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Dann wurde die Mikrotiterplatte entweder direkt anschließend für einen ELISA verwendet oder bei 4°C mit der Blocking-Lösung in den Vertiefungen in 2 mM NaN_3 gesättigter Luft (befeuchtetes Papier) mehrere Monate lang gelagert.

12.2.3. „Wasch“-Schritte

Vor allen nachfolgenden Inkubationsintervallen (12.2.4.-12.2.7.) wurden die Vertiefungen der Mikrotiterplatte dreimal mit jeweils 200 µl PBS-Tween (0.02 %, v/v) gewaschen und anschließend gut getrocknet.

12.2.4. Antigen-Applikation

Es wurden 100 µl/Vertiefung des mit PBS-Tween (0.02 %, v/v) mind. 1:500 verdünnten Rohextraktes (s.12.1.) bzw. des Standards/gereinigten Enzyms (mit PBS-Tween 0.02 % (v/v) verdünnt, vgl. Eichreihen, Abb. 6) appliziert und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Von jeder Probe wurden drei Parallelansätze pipettiert.

12.2.5. Biotinylierter Antikörper

Der biotinylierte Antikörper (250 µg/ml) wurde mit PBS-Tween (0.02 %, v/v) 1:500 verdünnt; davon wurden jeweils 100 µl pro Vertiefung für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

12.2.6. Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase

Mit Hilfe des Streptavidins ist eine Kopplung der alkalischen Phosphatase an das Biotinmolekül des sekundären Antikörpers möglich.

Die Stammlösung (Boehringer, 1000 units/ml) wurde 1:1500 in PBS-Tween (0.02 %, v/v) verdünnt; davon wurden jeweils 100 µl pro Vertiefung appliziert und 45 min bei Raumtemperatur inkubiert.

12.2.7. Zugabe des Substrats (für die alkalische Phosphatase)

Das Substrat bestand aus folgenden Komponenten:

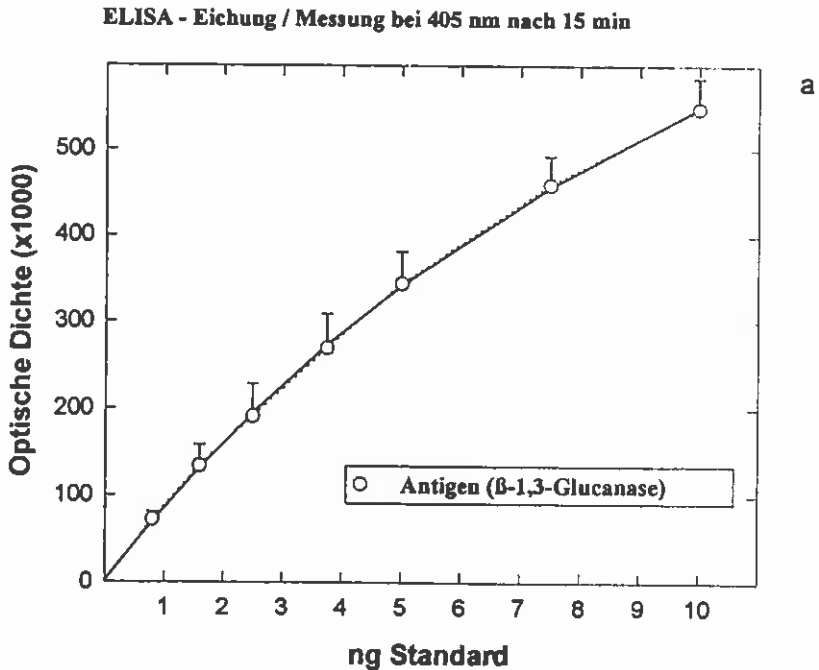
0.1 M Glycin pH 10.4; 1 mM MgCl_2 ; 1 mM ZnCl_2 ; 3 mM pNP (p-Nitrophenylphosphat, Sigma, Deisenhofen); davon wurden jeweils 200 µl pro

Vertiefung eingesetzt. Die alkalische Phosphatase katalysierte dabei folgende Farb-Reaktion:



Nach 15 min wurde die optische Dichte in einem ELISA-Mikrotiterplatten-Lesegerät (bei 405 nm; 25°C) gemessen.

Eine Eichung des Testes wurde erreicht, indem die Extinktionswerte auf eine jeweils mit Hilfe des entsprechenden Antigens (gereinigte β -1,3-Glucanase bzw. Chitinase) erstellte Eichreihe bezogen wurden (s. Abb. 9).



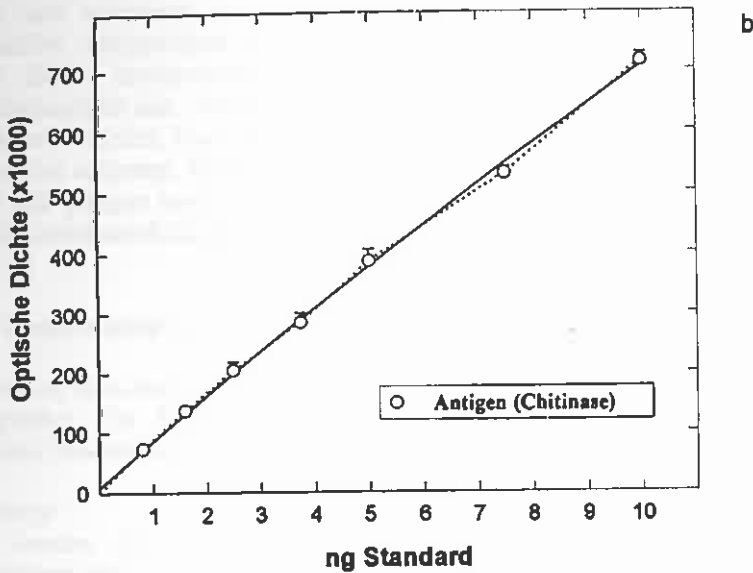


Abb. 9: Eichung des ELISAssays mit (a) gereinigter β -1,3-Glucanase (Antigen) und (b) gereinigter Chitinase (Antigen)

12.3. Rocket-Immunelektrophorese

Testprinzip:

Antigene wandern elektrophoretisch in ein Agarose-Gel, das Antikörper in einer bestimmten Konzentration enthält. Die Antikörper sind durch geeignete Wahl des Puffers ungeladen. Bei der elektrophoretischen Wanderung der Probe wird von den Antikörpern im Gel so lange jeweils ein Antigen pro Antikörper gebunden, bis das Konzentrationsverhältnis dem Äquivalenzpunkt für den Immunkomplex entspricht. Dabei bilden sich raketenförmige Präzipitationslinien aus. Die eingeschlossenen Flächen sind proportional zu den Konzentrationen der Antigene in den Proben. Hierbei ist es in der Regel hinreichend genau, die Länge der „rockets“ zu bestimmen und auf eine entsprechende Eichreihe (Abb. 10) mit gereinigtem Enzym (Antigen) zu beziehen.

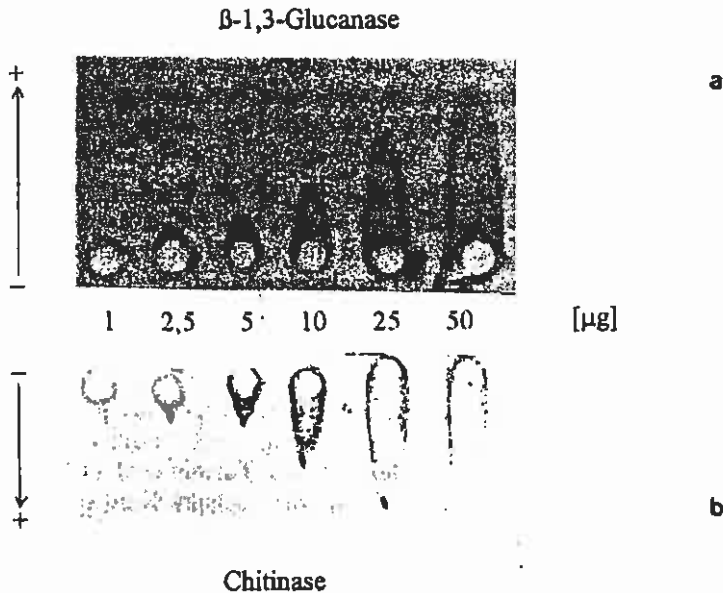


Abb. 10: Eichreihe, Rocket-Immunelektrophorese.
1, 2,5, 5, 10, 25, 50 μg Antigen:
a gereinigte β -1,3-Glucanase, b gereinigte Chitinase

12.3.1. Herstellung der Agarose-Gele

Es wurde eine 1%ige Agarose-Gel-Lösung hergestellt, indem 1 g Agarose (Biorad, München) in 100 ml Barbitursäurepuffer (pH 8.55) solange erhitzt wurde, bis die Agarose geschmolzen war. Dann wurden zu der auf 55°C abgekühlten Gellösung maximal 5 mg Antikörper (z.B. anti- β -1,3-Glucanase bzw. anti-Chitinase) gegeben. Die 55°C heiße Antikörper-Agarose-Lösung wurde anschließend zügig (mit vorgewärmter Pipette) in den vorgewärmten Gelgießstand gegossen, das Gel zunächst 1-2 h lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, um es dann über Nacht bei 4°C zu lagern.

12.3.2. Horizontale Elektrophorese und Gelfärbung

Mit Hilfe einer Glaspipette, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde, wurden aus der Gelmatrix „Löcher“ zum Auftragen der Proben „ausgestanzt“.

In diese wurden je 5 µl Rohextrakt (s. 12.1.) aufgetragen und bei 30 mA 3-4 h lang horizontal gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde eine frisch angesetzte Tris-Lösung (50 mM, pH 8.55) verwendet. Zu Beginn existierte jeweils ein Antigenüberschuß, dabei waren die Antigen-Antikörper-Komplexe löslich und wanderten in Richtung Anode. An den beiden Rändern der wandernden Antigen-Spur wurde die Äquivalenz-Konzentration erreicht: Es bildete sich - kontinuierlich von unten beginnend - eine raketenförmige Präzipitationslinie aus. Anschließend mußte die Barbitursäure wieder aus dem Gel entfernt werden. Dies geschah, indem feinporiges Filterpapier (Whatman) auf das Gel aufgelegt, beides gewendet und auf saugfähigem (Kleenex-)Papier ca. 10 min gelagert sowie anschließend trockengefönt wurde. Dann wurde das Gel mit Coomassie-Blau angefärbt (s.10.4.).

12.4. Western blotting

Die Western Blot-Analysen wurden modifiziert nach Towbin et al. (1979) durchgeführt. Die Modifikationen sind an der entsprechenden Stelle im Testablauf beschrieben.

Testprinzip:

Dabei werden die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine elektrisch auf eine immobilisierende, chemisch inerte Membran überführt. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Proteine sind dann frei zugänglich für großmolekulare Liganden wie z.B. Antikörper.

Das *Semi-dry* Blotting, das hierbei durchgeführt wurde, ist gegenüber dem sog. Tank- oder Naß-Blotting einfacher, billiger und schneller, da der Transfer mit Hilfe Puffer-getränkter Filterpapiere zwischen zwei horizontal angeordneten Graphitplatten als Elektroden erfolgt.

12.4.1. Elektrophoretisches Blotting

Die Proteine wurden in der Transblot SD Semi-dry Electrophoretic Transfer Cell (Biorad, München) 1 h bei 15 V auf PVDF Immobilon Membran (Millipore, Eschborn) überführt. Zur Kontrolle des vollständigen Transfers wurde jeweils ein sog. prestained Marker (low range, 22-142 kDa) verwendet, der nach dem Blotting vollständig vom Gel auf die Membran überführt war.

12.4.2. Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen

Nach kurzem Spülen der Membran in PBS-Puffer wurden die unbesetzten Bindungsstellen der Membran blockiert durch 2 h Inkubation unter Schütteln in

5 % (w/v) Magermilchpulver (entfettet; Töpfer, Dietmannsried) in PBS-Puffer (anstelle von 3 % BSA in einer Salzlösung aus 0.9 % (w/v) NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4; Towbin et al., 1979). Dadurch konnte ein unspezifisches Binden des Antikörpers völlig vermieden werden. Hierbei erwies sich ein Waschschriff (Towbin et al., 1979) vor Inkubation mit dem ersten Antikörper, der mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS-Puffer verdünnt wurde, als unnötig und wurde deshalb ausgelassen.

12.4.3. Inkubation mit dem ersten (*spezifischen*) Antikörper

Anschließend wurde die Membran mit dem ersten, für das analysierte Protein spezifischen Antikörper inkubiert. Es wurden jeweils 100 µg IgG in 30 ml PBS-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver eingesetzt. In dieser Antikörperlösung wurde die Membran über Nacht unter Schütteln inkubiert. Zur Detektion der basischen Isoform (33 kDa) bzw. der sauren Isoform (35 kDa) der β -1,3-Glucanase wurde ein spezifisches Kaninchen-Immunglobulin-anti- β -1,3-Glucanase, für die basischen Isoformen der Chitinase (32 und 34 kDa) ein Kaninchen-IgG-anti-Chitinase verwendet. Diese Antikörper wurden mit Hilfe der entsprechenden Antigene (Felix und Meins, 1985; Shinshi et al., 1987) gewonnen (s. 11.). Zur Detektion der sauren Chitinase (28 kDa) wurde ein spezifischer Kaninchen-Antikörper gegen saure Chitinase aus *Cicer arietinum* L. (Vogelsang und Barz, 1993) verwendet, der freundlicherweise von W.F. Oßwald (TU, München-Weihenstephan) zur Verfügung gestellt wurde.

12.4.4. „Wasch“-Schritte

Danach wurde die Membran dreimal 5 min lang in PBS-Tween (0.05 %, v/v) gewaschen. Dieser dreimalige Waschvorgang wurde nach dem folgenden Inkubationsschritt (12.4.5.) wiederholt, beim dritten Mal jedoch wurde nur mit PBS-Puffer *ohne* Tween gewaschen.

12.4.5. Inkubation mit dem zweiten (*unspezifischen*) Antikörper

Um die Bindungsstellen des ersten (spezifischen) Antikörpers an die Membran identifizieren zu können, wurde ein zweiter Antikörper verwendet, der unspezifisch an Kaninchen-Antikörper bindet und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist (Goat Anti Rabbit - Alkalische Phosphatase; Biorad, München). Davon wurden für jede Membran 10 µl in 30 ml PBS-Puffer mit 5 % (w/v) Magermilchpulver eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 2 h unter Schütteln.

12.4.6. Farbreaktion

Die Proteinbanden mit gebundenem Antikörper wurden mit Hilfe einer Farbreaktion mit der alkalischen Phosphatase visualisiert. Die Farbentwicklung

erfolgte mit dem Biorad Immun-Blot Assay Kit, indem 100 ml „Entwicklungs“-Puffer (0.1 M Tris-HCl, pH 9.5; 0.1 M NaCl; 5 mM $MgCl_2$) mit je 1 ml der Farbentwicklungslösungen Nitro-Blau-tetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat versetzt wurden. Die dunkelviolette Färbung der Banden erfolgte unter Schütteln der Membran im Farbentwicklungsbad in maximal 30 min. Die Reaktion wurde abgestoppt, sobald die Banden gut sichtbar waren, indem die Membran 10 min in bidest. Wasser gewaschen wurde. Danach wurden die Membranen mit den angefärbten Banden luftgetrocknet und anschließend lichtgeschützt gelagert.

13. Charakterisierung von Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und Mikrosequenzierung

13.1. Protein-Extraktion

13.1.1. Gesamtextrakte

Die Proteine wurden mit Phenol extrahiert - wie bei Hurkman und Tanaka (1986) beschrieben - mit einigen geringfügigen Modifikationen. Das gefrorene Blattmaterial wurde in einer vorgekühlten Reibschale (4°C) mit einem Pistill gemörsert, bis ein feiner Puder vorlag. Nach Zugabe von 2 ml Hurkman-Extraktionspuffer (0.7 M Saccharose, 0.5 M Tris, 30 mM HCl, 0.1 M KCl und 2 % β -Mercaptoethanol) wurde weiter homogenisiert, bis die nunmehr feine Suspension in ein Corex-Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Die Reibschale und das Pistill wurden mit 3 ml Extraktionspuffer gespült und die Spülflüssigkeit ebenfalls in das Corex-Zentrifugenröhrchen überführt.

Nach gründlichem Mischen wurde der Extrakt für 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5000 rpm, 5 min). Der Überstand wurde in ein neues Corex-Gefäß überführt und das Pellet ein zweites Mal mit 3 ml Extraktionspuffer versetzt. Nach 30minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Überstände vereinigt und 5 ml Wasser-gesättigtes, eiskaltes Phenol (99 %, Aldrich) hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen beider Phasen wurden die Extrakte mindestens 30 min auf Eis gestellt und anschließend die beiden Phasen durch 10minütiges Zentrifugieren bei 7000 rpm getrennt. Die (obere) Phenol-Phase wurde danach vorsichtig, ohne die Interphase zu berühren, abgenommen und in ein neues Corex-Röhrchen überführt, die (untere) Extraktionspuffer-Phase nochmals mit 2 ml Phenol versetzt und 1 h auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren (s.o.) wurden die Phenol-Phasen vereinigt und 5 Volumina Präzipitationspuffer (0.1 M NH_4 -acetat in eiskaltem Methanol) hinzugefügt. Die Proteine wurden über Nacht bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation (maximal 5000 rpm, 10 min) isoliert. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml H_2O

10 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 0,5 ml Probenpuffer (9.8 M Harnstoff, 2 % 10 % NP 40, 2 % Ampholine, 100 mM DTT) aufgenommen, gemischt und bei -20°C bis zum Einsatz (1.Dimension = IEF) eingefroren.

13.1.2. Interzelluläre Waschflüssigkeit

Die interzelluläre Waschflüssigkeit wurde durch Unterdruck-Infiltration - wie bei Langebartels et al. (1991) beschrieben - gewonnen (vgl. 4.). Da der mit ca. 3.5-7 % des löslichen Gesamtproteins relativ niedrige Proteingehalt der IWF (0.17-0.30 mg Gesamtprotein in 1.5-2.0 ml) für Mikrosequenzierungszwecke keine ausreichenden Proteinmengen lieferte, wurden folgende Konzentrierungsschritte vorgenommen:

Durch Lyophilisierung wurde die Apoplastenflüssigkeit bis fast zur Trockne eingengt und der Rückstand anschließend in 300 µl H₂O dest. aufgenommen. Nach Zugabe von jeweils 30 µl 0.15 % Natriumdesoxycholat (Na-DOC, BDH Biochemical Limited Poole, England) und 30minütiger Inkubation auf Eis (0°C) wurde eine TCA-Proteinfällung mit jeweils 30 µl 100 % TCA (Trichloressigsäure) durchgeführt. Nach mind. einstündiger Inkubation auf Eis (0°C) wurden die gefällten Proteine bei 5000 rpm 10 min in der Tischzentrifuge (Beckman) abzentrifugiert, dann in 90 µl Probenpuffer (2.6 ml 1 M Tris-Base, 20 ml Glycerin, 2 mg Bromphenolblau, 1.5 g DTT, 10 ml 20 % (w/v) SDS-Lösung, mit HCl auf pH 6.5-6.8 eingestellt) und 10 µl 1 M Tris-Base aufgenommen, 10 min bei 80°C im Wasserbad erhitzt und nach Abkühlen vollständig auf ein 15 %iges SDS-Gel (1.5 mm; 5 %iges Sammelgel) aufgetragen und *eindimensional* elektrophoretisch aufgetrennt.

13.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Zweidimensionale Gelelektrophorese wurde im wesentlichen ausgeführt wie bei Bravo (1984) beschrieben. Hierbei besteht die 1.Dimension aus einer Isoelektrischen Fokussierung (IEF). Für die Isofokussierung wurden Rundgele (1.5 mm Innendurchmesser) mit einer Endkonzentration von 3 % Ampholinen (LKB-Pharmacia) verwendet. Die Ampholine-Lösung enthielt vergleichbare Mengen von Ampholinen pH 3.5-10 (450 µl) und pH 4-6 (250 µl) bzw. pH 5-8 (250 µl). Die IEF-Rundgele setzten sich zusammen aus: Harnstoff (8.25 g), 30 % Acrylamid (1.95 ml), 2 % Bisacrylamid (0.78 ml), 10 % NP 40 (3 ml), H₂O (2.25 ml), Ampholine (0.75 ml), APS (10 µl), Temed (5 µl). Nachdem die zylinderförmigen Glasröhrchen (14 cm lang, 1.5 mm Durchmesser) unten mit Parafilm abgedichtet und dann bis zu einer Markierung (12 cm vom Grund aus) mit 1.Dim.-Gellösung gefüllt worden waren, wurde jedes Gel mit 10 µl H₂O überschichtet und für mindestens zwei Stunden der Polymerisation überlassen. Damit sich ein stabiler pH-Gradient ausbildet, ist eine

Vorfokussierung erforderlich: Dazu wurden in jedes Glasröhrchen (nach vollständigem Entfernen des Wassers) 20 µl Probenpuffer (s.o.) eingefüllt und dann vorsichtig mit 20 µl Overlay-Puffer (8 M Harnstoff, 5 % 10 % (v/v) NP 40, 1 % Ampholine, 100 mM DTT) überschichtet. Anschließend wurden die Röhrchen mit 0.02 M NaOH-Lösung (Kathodenpuffer), die entgast worden war, bis zum oberen Rand angefüllt, die obere Elektrodenkammer (Protean-2D, Biorad) ebenfalls mit Kathodenpuffer, die untere mit Anodenpuffer (0.01 M H_3PO_4) aufgefüllt. Dann wurde die Vorfokussierung zunächst mit 200 V (15 min) bzw. 300 V (weitere 30 min) gestartet und schließlich bei 400 V für 1 h fortgesetzt. Anschließend wurde die obere Elektrodenkammer geleert, der Puffer auf der Geloberfläche entfernt, 2-3mal mit Wasser gespült und dann die Proben (100 µl = ca. 100 µg Protein) aufgetragen. Die Proteinlösungen wurden jeweils wieder mit 20 µl Overlaypuffer (s.o.) überschichtet, dann die Röhrchen mit NaOH-Elektrodenpuffer (s.o.) aufgefüllt sowie die obere Elektrodenkammer mit frischer (entgaster) NaOH-Lsg. versorgt. Die *Isofokussierung* wurde zunächst bei 150 V (30 min) gestartet, dann bei 200 V (30 min) fortgesetzt und schließlich bei 300-400 V für 18 h (über Nacht) durchgeführt. Fokussierte Rundgele können vor Beginn der 2. Dimension bei -20°C eingefroren werden (, sollten jedoch nicht länger als 2 Tage gelagert werden).

Für die 2. Dimension (SDS-PAGE, vertikal) wurden 15%ige Laemmli-Trenngele gegossen (1.5 mm; 15 ml 30 % Acrylamid, 6 ml 2 % Bisacrylamid, 11.25 ml 1 M Tris-HCl pH 8.7, 0.15 ml 20 % SDS, 0.1 ml 10 % APS, 0.02 ml Temed), mit Wasser überschichtet und 2-3 h der Polymerisation überlassen. Die 2. Dim.-Gellösung wurde jeweils vor Zugabe von SDS, APS und Temed mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe entgast. Ferner wurden die Glasplattenränder (außerhalb der Spacer, die ca. 1 cm nach innen versetzt plaziert wurden) mit Agarose versiegelt, um ein Auslaufen der Polyacrylamidlsg. vor dem Polymerisieren zu verhindern. Anschließend wurde ein 5%iges Sammelgel (1.7 ml 30 % Acrylamid, 0.6 ml 2 % Bisacrylamid, 1.25 ml 1 M Tris-HCl pH 6.8, 5.7 ml H_2O dest., 0.05 ml 20 % SDS, 0.05 ml 10 % APS, 0.005 ml Temed) gegossen und mit Isobutanol überschichtet. Dabei wurde ein Freiraum von 1-2 cm über dem Sammelgel für das Aufbringen der 1. Dimension auf die 2. Dimension ausgespart. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde die Geloberfläche gründlich mit H_2O dest. gespült, um Isobutanol restlos zu entfernen. Dann erfolgte nach Aufbringen des fokussierten Rundgels auf die 2. Dimension und Überschichtung desselben mit 1 ml Äquilibrierpuffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 1 % SDS, 50 mM DTT, 20 % Glycerin) die elektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) in 50 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS - Laufpuffer zunächst 1 h bei 45 V, dann über Nacht (18.00-10.00 Uhr) bei 85 V. Um für Mikrosequenzierungszwecke ausreichende Proteinmengen zu gewinnen, wurden von jeder Probe mindestens vier Auftrennungen parallel durchgeführt (s. Abb. 11).

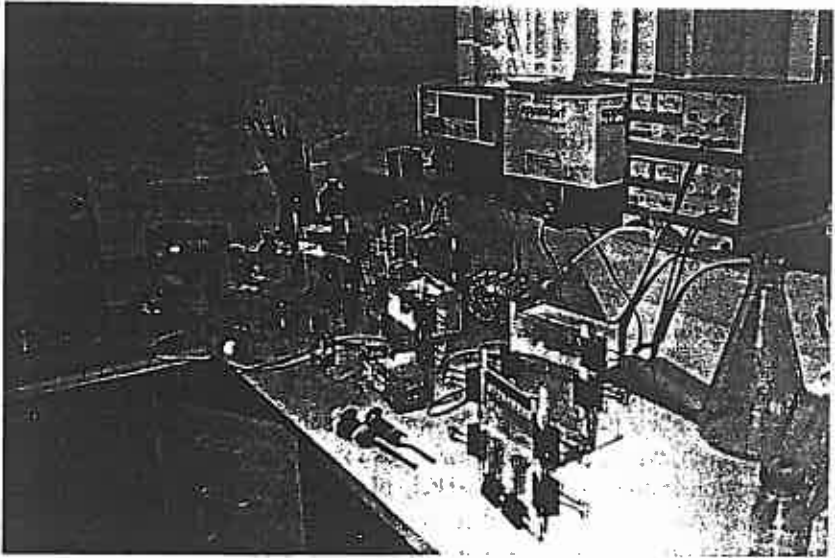


Abb. 11: Simultaner Einsatz möglichst vieler Elektrophoresekammern, um eine optimale Vergleichbarkeit der Auftrennungen zu gewährleisten (Laboratorium Genetika, Universität Gent, Belgien).

13.3. Protein-Electroblotting

Vor Beginn der Blotting-Prozedur wurden die Gele ca. 1 h in Prääquilibrierpuffer (50 mM Borsäure, 0.1 % SDS, pH 8.0) gelegt, um Quellungserscheinungen während des anschließenden Transfers zu reduzieren. Inerte Immobilon-PVDF-Membranen (Millipore) wurden als Trägermedien verwendet und auf Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membranen wurden zunächst in Methanol befeuchtet, dann extensiv mit dest. H_2O gespült und schließlich für mindestens 20 Minuten in Wasser inkubiert. Das „Blotting-Sandwich“ besteht nacheinander aus einem Schwamm, mind. 3 Whatman 3MM Filterpapierblättern, dem Polyacrylamidgel, der Blotting Membran, wiederum mind. drei Whatman 3 MM Filterpapierblättern und einem zweiten Schwamm. Das Übereinanderschichten der einzelnen Bestandteile geschieht am besten in einer Plexiglaswanne, die mit Transferpuffer (50 mM Tris, 50 mM Borsäure) gefüllt ist, um Luftblasen zwischen den verschiedenen Schichten zu vermeiden. Das fertige Sandwich wurde - zusammengehalten durch einen speziellen Gelhalter- in die gefüllte Transferkammer einer Bio-Rad Transblot-Cell mit der Membran zur Anode

orientiert eingelegt. Der Elektro-Transfer wurde für mind. 8 h bei 35 V durchgeführt (Bauw et al., 1989).

Die transferierten Proteine wurden anschließend - nach kurzem Spülen der Membran mit dest. H₂O - angefärbt durch 5minütiges Eintauchen der Membran in Amido-black-Lsg. (0.1 % Amido black, 45 % Methanol, 7 % Essigsäure) und anschließendes Entfärben mit dest. H₂O.

Dabei war es nötig, von jeder Probe jeweils vier Parallel-Gele zu blotten, um für die anschließende Mikrosequenzierung ausreichende Mengen einzelner Proteine zu erhalten.

13.4. Enzymatischer *in situ* Verdau von Membran-gebundenen Proteinen

Interessante Proteinbanden wurden ausgeschnitten und in Eppendorf-Reaktionsgefäßen gesammelt. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurden die Membranstücke zunächst mit 80 µl Triton X-100 (1 % in Digestion-Puffer: 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5) mind. 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zur Stabilisierung des Enzyms 2 µl CaCl₂ hinzugefügt und der enzymatische Verdau in einem minimalen Volumen von 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5 - Puffer (50-150 µl) mit 1 µg Protease bei 37°C für 4 h durchgeführt. Trypsin (aus Schweine-Pankreas, Sigma) wurde als Enzym verwendet. Anschließend wurden die Membranstücke in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und einmal mit 200 µl 6 % TFA (Trifluoressigsäure), dann zweimal mit jew. 100 µl H₂O dest. gewaschen. Alle Waschlösungen wurden mit der Digestion-Lsg., die die eluierten Peptide enthält, vereinigt und bei -20°C bis zur weiteren HPLC-Analyse gelagert.

13.5. Auftrennung der Peptide mittels Reversed-Phase HPLC

Die HPLC-Trennungen werden mit einer Varian 5000 Pumpe (einschließl. Pumpen-Controller) sowie einem Varichrom Detektor (Varian Associates, USA) durchgeführt. Die Peptid-Mischungen wurden auf eine Vydac C₄ Reversed-Phase Säule (4.6 x 25 mm; Vydac Separations Group, USA), die in 0.1 % TFA äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Peptide wurden eluiert mit Hilfe eines ansteigenden Gradienten von 0.1 % TFA in 70 % Acetonitril über eine 60-Minuten Periode bei einer Flußrate von 1ml/min. Eluierte Peptide wurden bei 214 nm detektiert und manuell in Eppendorfreaktionsgefäßen gesammelt. Auf der Basis von Peak-Höhe und -Auflösung wurden die Hauptpeptide für eine Aminosäuresequenzanalyse ausgewählt, ausgehend von den am meisten hydrophoben Peptiden. Diese selektierten Peptide wurden in einer Speed-Vac (Savant Instruments, USA) getrocknet und bei -20°C gelagert.

13.6. Aminosäuresequenz-Analyse

Die Aminosäuresequenzierung wurde nach Bauw et al. (1989) im Laboratorium Genetika (Universität Gent, Belgien) durchgeführt. Dazu wurde ein Gas-Phasen Protein-Sequenzierer (Modell 470 A, Applied Biosystems, Weiterstadt) nach den Angaben des Herstellers benutzt. Die Peptide wurden in 0.1 % TFA, 30 % Acetonitril aufgenommen und auf sog. precycled Polybrene-coated Glasfilter aufgetragen.

Die ermittelten Aminosäuren wurden folgendermaßen abgekürzt:

A (Alanin), C (Cystein), D (Asparaginsäure), E (Glutaminsäure),
F (Phenylalanin), G (Glycin), H (Histidin), I (Isoleucin), K (Lysin),
L (Leucin), M (Methionin), N (Asparagin), P (Prolin), Q (Glutamin),
R (Arginin), S (Serin), T (Threonin), V (Valin), W (Tryptophan), Y (Tyrosin).

III. Ergebnisse

1. *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und Bel B:**Kultivarspezifische Unterschiede in der Entwicklung Ozon-abhängiger Blattschäden**

Die beiden Tabakkultivare *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und Bel B reagieren unterschiedlich auf Ozon. Während cv. Bel W3 äußerst Ozon-empfindlich ist, erweist sich cv. Bel B als ausgesprochen Ozon-tolerant. Aufgrund dieser kultivarspezifischen Unterschiede eignen sie sich als Biomonitoringpflanzen für Ozonbelastungen im Freiland, wobei cv. Bel W3 bei ambienten Konzentrationen Blattschäden entwickelt, und cv. Bel B als Kontrolle ohne sichtbare Schäden dient (Heggstad, 1991). Im Klimakammerversuch kann die zeitabhängige Entwicklung von Blattsymptomen beobachtet werden. Die Blattschädigung bestand in der ersten Phase 3 h nach Behandlungsbeginn mit 150 nl/l O_3 in der Ausprägung silbrig glänzender Stellen auf der Blattoberseite entlang der Leitgefäße (Elstner, 1988). Bei Bel W3 waren ca. 8 h nach Beginn einer fünfstündigen Behandlung mit 150 nl/l O_3 „water soaked areas“ (Rich, 1964) zu erkennen. Dabei handelte es sich um dunklere Gewebestellen, deren (Palisadenparenchym-) Zellen z.T. plasmolysiert waren. Innerhalb von ca. 48 h nach Beginn der Ozonbehandlung entwickelten sich im weiteren Schadensverlauf bei Bel W3 bifaziale pergamentartige Nekrosen (Schraudner et al., 1992, s. Abb. 12).

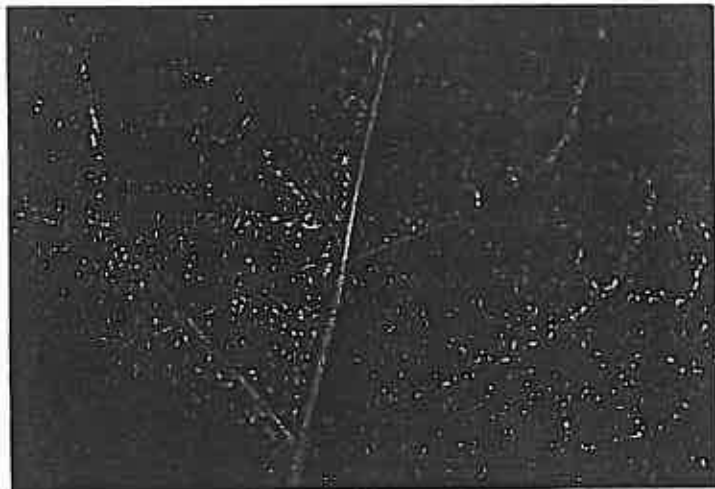


Abb. 12: Ozonbedingte Blattnekrosen (cv. Bel W3; 48 h nach Beginn einer fünfstündigen Behandlung von 9.00 bis 14.00 Uhr mit 150 nl/l O_3)

Nach Langebartels et al. (1991) führte eine Ozon-Pulsbehandlung (150 nl/l, 5 h) bei cv. Bel W3 zu einer Schädigung von 30 % der Gesamtfläche mittelalter Blätter. Bei cv. Bel B dagegen waren unter den von Langebartels et al. (1991) beschriebenen Bedingungen keine Blattschäden erkennbar. Die gleiche Ozon-Pulsbehandlung führte erst bei einem Schwellenwert von 350 nl/l bei cv. Bel B zu einer vergleichbaren (30 %igen) Schädigung mittelalter Blätter.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurden die Blätter von oben nach unten durchnummeriert (Länge von Blatt 1 > 8 cm) und die Blätter 3, 4, 5 und 6 als mittelalt gewertet. Die Blattnumerierung und die visuelle Einstufung der Blattschädigung in % zur Gesamtblattfläche (Langebartels et al., 1991, Schraudner et al., 1992) wurden im folgenden analog angewendet (s. z.B. 4.1., V 62, Abb. 34).

2. Proteinmuster der Tabakkultivare Bel W3 und Bel B (*Nicotiana tabacum* L.)

2.1. Proteinbanden der interzellulären Waschflüssigkeit (IWF)

Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) wurden unter kontrollierten Bedingungen in Klimakammern angezogen (Schraudner et al., 1992), bis sie ein Alter von acht bis zehn Wochen erreichten hatten (vegetatives Stadium). Diese unbehandelten Kontrollpflanzen wurden verwendet, um durch Unterdruckinfiltration interzelluläre Waschflüssigkeit (IWF) mittelalter Blätter zu gewinnen. Die Auftrennung der Proteine der IWF erfolgte mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Anschließend wurden die Proteine durch Coomassie-Blau Färbung sichtbar gemacht.

Es zeigte sich, daß das Proteinmuster der IWF von unbehandelten Kontrollpflanzen bei beiden Kultivaren ähnlich ist. In Abb. 13 sind die Proteinmuster der IWF von cv. Bel W3 und cv. Bel B vergleichend dargestellt. Aus dieser Abbildung gehen deutliche quantitative Unterschiede, jedoch nur ein wesentlicher qualitativer Unterschied, nämlich ein Kultivar-spezifisches Protein hervor. Dieses besitzt ein Molekulargewicht von ca. 21 kDa und kommt nur bei cv. Bel B vor. Es ist nach Coomassie-Blau Färbung (s. Abb. 13, 15, 20) und nach Silbernitratfärbung (Abb. 18) sichtbar.

Behandelt man Tabakpflanzen mit Ozon, so bleibt das Bel B spezifische Protein unbeeinflusst. Das 21 kDa-Protein ist in den Abbildungen 18 (Silbernitratfärbung) und 20 (Coomassie-Blau Färbung) bei O₃-behandelten Pflanzen des Kultivars Bel B im Vergleich zu entsprechenden unbehandelten Kontrollpflanzen erkennbar (s. 3.1.2.1.).

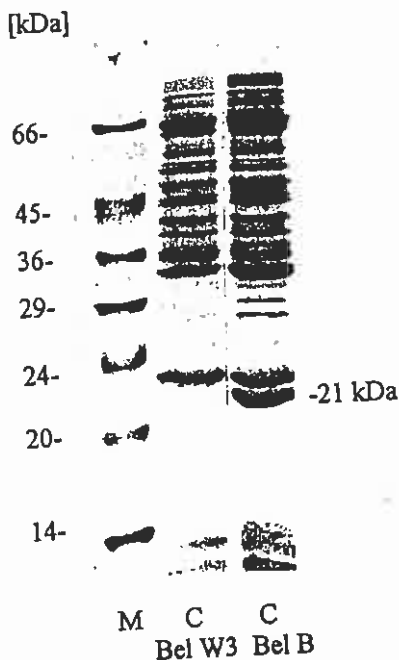


Abb. 13: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von Tabakblättern (cv. Bel W3 und cv. Bel B). Die Proteine stammen von mittelalten Blättern unbehandelter Kontrollpflanzen. Die Auftrennung erfolgte auf einem 13%igen SDS-Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden je 10 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; C, Kontrolle, cv. Bel W3 bzw. cv. Bel B; Bel B spezifische Proteinbande (21 kDa) markiert

2.2. Peptidsequenzen des Bel B spezifischen Proteins bei 21 kDa

Die durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine in der IWF (s. 2.1., Abb. 13) wurden elektrisch auf inerte Membranen transferiert (Elektro-Blotting). Anschließend wurden die Proteine auf den Membranen mit Amido-Black angefärbt. Die Bel B spezifische Proteinbande bei 21 kDa aus interzellulärer Waschflüssigkeit mittelalter Blätter von unbehandelten Kontrollpflanzen wurde ausgeschnitten. Anschließend wurde das Membran-gebundene Protein einem enzymatischen Verdau mit Trypsin unterzogen. Trypsin spaltet spezifisch nur Lysyl- und Arginyl-Bindungen (Allen, 1989). Dadurch entstehen Peptide, die Lysin oder Arginin als Carboxyendständige Aminosäure aufweisen. Allerdings gehen im allgemeinen einzelne Peptidaminosäuren

aufarbeitungsbedingt verloren (Allen, 1989). Die dadurch entstandenen Peptide wurden mittels Reversed-Phase HPLC aufgetrennt. Auf der Basis von Peak-Höhe und -Auflösung wurden die Hauptpeptide für eine Aminosäuresequenzanalyse ausgewählt. Die Aminosäuresequenzen dieser selektierten Peptide wurden nach Bauw et al. (1989) mit Hilfe eines Gas-Phasen-Sequenzierers analysiert. Für NH₂-terminale Sequenzanalysen wurden die Blot-Membranstücke direkt unmittelbar im Anschluß an Elektrotransfer und Amido-Black-Färbung in die Reaktionskammer des Sequenzierers gegeben. Die verwendeten Abkürzungen für Aminosäuren sind in II.13.6. (s. S. 46) beschrieben. Es wurden zwei Hauptpeptide (a und b) und zwei Mischungen aus zwei bzw. drei kleineren Peaks (c 1 und c 2 bzw. d 1-3) analysiert. Insgesamt liegen also sieben Peptidsequenzen des Bel B spezifischen Proteins vor (s. Abb. 14). Zusätzlich wurde die NH₂-terminale Sequenz ermittelt (Abb. 14).

a

Bel B .. G V L G G T N ..
spezifisch

b

Bel B .. F V V T F A F ..
spezifisch

c 1

Bel B .. A G N I M T F P Q Q A T ..
spezifisch

c 2

Bel B .. Q N S A V V - I V F - F ..
spezifisch

d 1

Bel B .. L N P L I I K ..
spezifisch

d 2

Bel B .. T F L - A K V S ..
spezifisch

d 3

 Bel B .. I A S D L A ..
 spezifisch

e

 Bel B .. A V L D F V G D L S V P D G P
 spezifisch

Abb. 14: Aminosäuresequenzen der durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide (a; b; c 1, c 2; d 1, d 2, d 3) des Bel B spezifischen Proteins (21 kDa). e, NH₂-terminale Sequenz

Homologievergleiche mit Hilfe des Blast P Computerprogramms (Altschul et al., 1990) ergaben, daß es sich bei dem Bel B spezifischen Protein vermutlich um ein noch nicht beschriebenes Protein handelt. Einzelne Peptidsequenzen wiesen Ähnlichkeiten zu Teilpeptiden eines Initiationsfaktors der Proteinsynthese bei *Nicotiana* L. und einer Ubiquitin-Protein-Ligase bei *Triticum* L. auf (Details s. Homologievergleiche, IV., Abb. 54). Die homologen Peptidsequenzen umfaßten ca. 16 % der Gesamtsequenz der Ubiquitin-Protein-Ligase (s. IV., Abb. 54). Eine weitere Charakterisierung dieses Proteins war nicht möglich, da die Sequenzdaten durch technische Defekte an dem Proteinsequenzierer erst unmittelbar vor Abgabe der Doktorarbeit eintrafen.

3. Ozonabhängige Veränderungen auf Proteinebene

Alle in den folgenden Expositionsversuchen eingesetzten Tabakpflanzen wurden in Reinluft angezogen (s.2.), wie von Langebartels et al. (1991) beschrieben.

Im Alter von acht bis zehn Wochen wurden die Pflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) einer fünfstündigen Standard-Behandlung mit 150 nl/l Ozon bzw. Reinluft in den Expositions-küvetten unterzogen. Die Behandlung erfolgte jeweils zwischen 9.00 und 14.00 Uhr. In allen Versuchen wurden gleichzeitig Kontrollpflanzen in Reinluft gehalten, die stets parallel mit den ozonbehandelten Pflanzen geerntet wurden, um eine optimale Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Neben diesen einmal fünfstündigen Behandlungen wurden Versuche mit zweimaliger bzw. dreimaliger fünfstündiger O₃-Exposition an aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt (s. 3.2.1., Abb. 25 bzw. 4., V62, Abb. 33).

3.1. Proteinmuster der IWF

Durch Unterdruckinfiltration gewonnene interzelluläre Waschflüssigkeiten mittelalter Blätter von cv. Bel W3 und cv. Bel B Tabakpflanzen wurden SDS-gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnten im Vergleich zu in Reinluft gehaltenen Kontrollpflanzen die im folgenden beschriebenen Veränderungen im Proteinmuster der IWF beobachtet werden. Die auf Ozon reagierenden Proteine wurden als O₃-related (abgekürzt O₃R) bezeichnet und nach aufsteigendem Molekulargewicht durchnummeriert (z.B. O₃R-2, 25 kDa und O₃R-3, 26 kDa).

3.1.1. Charakterisierung von O₃-related Proteinen bei 25 kDa und 26 kDa

3.1.1.1. Proteinbanden

Nach Aufkonzentrierung der interzellulären Waschflüssigkeit durch Lyophilisierung waren zwei Proteinbanden von 25 kDa (O₃R-2) und 26 kDa (O₃R-3) bei cv. Bel B und cv. Bel W3 zu erkennen. Sie wurden durch Ozonbehandlung (160 n/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bzw. 150 n/l, 1x5 h) im Vergleich zu den Kontrollen repräsentiert (s. Abb. 15 und Abb. 19). Die Intensität der beiden Proteinbanden wurde jeweils in Bezug zur Gesamtproteinmenge densitometrisch ermittelt. Dabei betrug der Anteil dieser beiden Proteine an allen Proteinen bei Kontrollpflanzen ca. 3.3 %, nach Ozonbehandlung dagegen ca. 1.9 %, woraus sich eine ozonbedingte Hemmung von ca. 40 % ableiten läßt (Abb. 15). In der Abb. 19 sind die beiden Proteine von 25 kDa und 26 kDa bei cv. Bel W3 zu erkennen. Eine partielle Abschwächung durch Ozon ist z.B. unmittelbar nach Behandlungsende im Vergleich zu den Kontrollen sichtbar (s. Abb. 19).

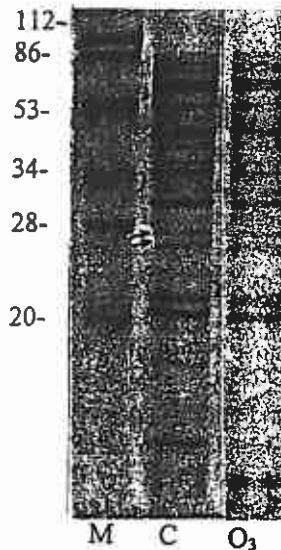


Abb. 15: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden je 10 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; C, Kontrolle; O₃, Ozonbehandlung (160 nl/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen); die Proteinbanden bei 25 und 26 kDa sind mit Pfeilen markiert.

3.1.1.2. Sequenzen

Die Mikrosequenzanalyse erfolgte nach Bauw et al. (1989) analog zu der in 2.2. beschriebenen Methodik. Dabei wurden von jeder Proteinbande (25 kDa, O₃R-2 und 26 kDa, O₃R-3) je zwei Peptidaminosäuresequenzen ermittelt. Diese sind in Abb. 16 dargestellt.

	43	58
O ₃ R-2	.. K P S A V T A N X F V F S G L A ..	
O ₃ R-3	.. K P S A V T A N D F V F G G L A ..	

	69	90
O ₃ R-2	.. A X V X P A F A P Q F P G L N ..	..
O ₃ R-3	 F A P Q F P G L N G L G I X M A ..	

Abb. 16: Aminosäuresequenzen der durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide der Ozone-Related Proteine 2 (O₃R-2, 25 kDa) und 3 (O₃R-3, 26 kDa). Grau sind Aminosäuren, die bei beiden Proteinen übereinstimmen.

Wie Abb. 16 zeigt, liegt eine sehr hohe Übereinstimmung der Peptidsequenzen von O₃R-2 (25 kDa) und O₃R-3 (26 kDa) vor. Datenbank-Vergleiche mit Hilfe des Blast P Computerprogramms (Altschul et al., 1990) ergaben für beide Proteine (O₃R-2, 25 kDa und O₃R-3, 26 kDa) eine hohe Homologie der Peptidaminosäuresequenzen zu Peptiden des Germin-ähnlichen Proteins von *Sinapis alba* L. (SaGLP, 22 kDa, Heintzen et al., 1994) (s. IV., Abb. 55). Die homologen Teilpeptide umfaßten ca. 15 % der Gesamtsequenz dieses Proteins. Von Dumas et al. (1993) und von Lane et al. (1993, 1994) wurde gezeigt, daß Germin Oxalatoxidase-Aktivität besitzt.

3.1.1.3. Enzymaktivität

Mit Hilfe eines spezifischen Farbtestes konnte die Aktivität von Oxalatoxidase (EC 1.2.3.4.) nachgewiesen werden. Das Enzym Oxalatoxidase aus Gerste (Sugiura et al., 1979; Pietta et al., 1982) katalysiert die Umsetzung von Oxalsäure und Sauerstoff zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoffperoxid.

Die H_2O_2 -Entwicklung wurde mit Hilfe einer Peroxidase-abhängigen Färbemethode nach Lane et al. (1993) detektiert. Der Aktivitäts-Nachweis erfolgte auf dem Blot durch Kombinieren einer „Substrat“-Lösung, die Oxalat und Succinat enthielt, und einer „Entwickler“-Lösung, die im wesentlichen aus Dimethylanilin (DMA) als Farbstoff und dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (-POD) (EC 1.11.1.7) bestand. Innerhalb von ca. 5 min wurde bei vorhandener Oxalatoxidase-Aktivität eine violette Bande auf der Membran sichtbar.

Für diese Untersuchungen wurden die interzellulären Waschflüssigkeiten durch Gefriertrocknung (bis fast zur Trockne) aufkonzentriert. Als Standard wurde gereinigte Oxalatoxidase aus Gerstenkeimlingen (Boehringer, Mannheim) verwendet (Abb. 17 a). Die IWF bzw. der Standard wurden mit 1 %igem SDS-Probenpuffer versetzt, jedoch keiner Hitzedenaturierung unterzogen. Die Proteine der IWF bzw. das Standard-Enzym wurden (mini-)gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann auf Nitrozellulose-Membranen gebロットet.

Zum ersten Mal konnte auf diese Weise in der interzellulären Waschflüssigkeit von Tabakpflanzen (cv. Bel B) eine Oxalatoxidase-Enzymaktivität nachgewiesen werden. Die Tabak-Oxalatoxidase trat in Form einer Oligomerbande im Bereich zwischen 86-112 kDa auf, die geringfügig höher lag als das Standard-Enzym aus Gerste (ca. 100 kDa).

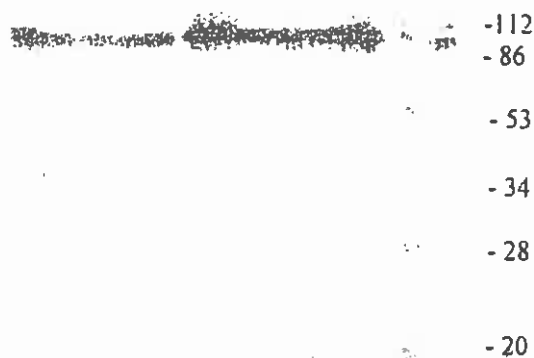
Tabakpflanzen wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils fünf Stunden lang mit Ozon (160 nl/l) behandelt. Die durch Vakuuminfiltration gewonnenen interzellulären Waschflüssigkeiten wurden wie beschrieben hinsichtlich der Aktivität von Oxalatoxidase überprüft. Es zeigte sich, daß Ozon die Enzymaktivität der Oxalatoxidase unterdrückt (Abb. 17 b).

Aus immunologischen Nachweisen ist das Problem der Kreuzreaktion von Antikörpern gegen Oxalatoxidase mit Peroxidasen bekannt (Domon et al., 1995). Um ausschließen zu können, daß die zur Farbdetektion der Oxalatoxidase-Aktivität hinzugegebene Meerrettich-POD bereits selbst reagierte, wurde zunächst die „Entwickler“-Lösung (mit POD und DMA) allein zugegeben und erst nach einigen Minuten auch die „Substrat“-Lösung (mit Oxalat und Succinat). Erst nach Zugabe des Substrates war bei vorhandener Oxalatoxidase-Aktivität eine Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 86 und 112 kDa detektierbar. Im Molekulargewichtsbereich der Meerrettich-POD (ca. 48 kDa; Domon et al., 1995) dagegen trat keine Bande auf.

III. Ergebnisse

[kDa]

a



E1

E2

M

b

[kDa]

112-

86-

53-

34-

28-

20-



E

C

O₃

Abb. 17: Nachweis von Proteinen mit Oxalatoxidase-Aktivität auf Nitrozellulose-Membranen. (a) E, gereinigtes Enzym aus Gerste (Boehringer, Mannheim): E 1, 5 μ g; E 2, 7.5 μ g; M, Molekulargewichtsmarker; (b) IWF aus mittelalten Tabakblättern (cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet; jeweils 60 μ g Protein): C, Kontrolle (Reinluft); O₃, Ozonbehandlung (160 n/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen); E, Gereinigtes Enzym aus Gerste (Boehringer, Mannheim; 5 μ g)

3.1.2. Charakterisierung von O₃-related Proteinen bei 4 kDa, 28 kDa und 35 kDa

Im Proteinmuster der interzellulären Waschflüssigkeit war eine Proteinbande bei 4 kDa (O₃R-1) zu beobachten, die nur bei cv. Bel B durch Ozonbehandlung (150 n/l, 1x5 h) deutlich induziert wurde. Dieses Protein, das möglicherweise ein Abbauprodukt darstellt, trat im niedermolekularen Bereich erst bei Verwendung eines hochprozentigen Gradientengels (15-18 %) und Anfärbung der aufgetrennten Proteine mit Silbernitrat deutlich hervor (Abb. 18). Bei diesen Bedingungen war auch ein Protein bei ca. 18 kDa sichtbar, das bei Ozonbehandlung stets, bei den Kontrollen dagegen erst 24 h nach Beginn der Behandlung deutlich zu erkennen war. Unabhängig von der Behandlung ist in allen Spuren auch das in 2.1. beschriebene Bel B spezifische Protein bei 21 kDa zu beobachten. Dieses Protein wurde durch die Ozonbehandlung nicht beeinflusst.

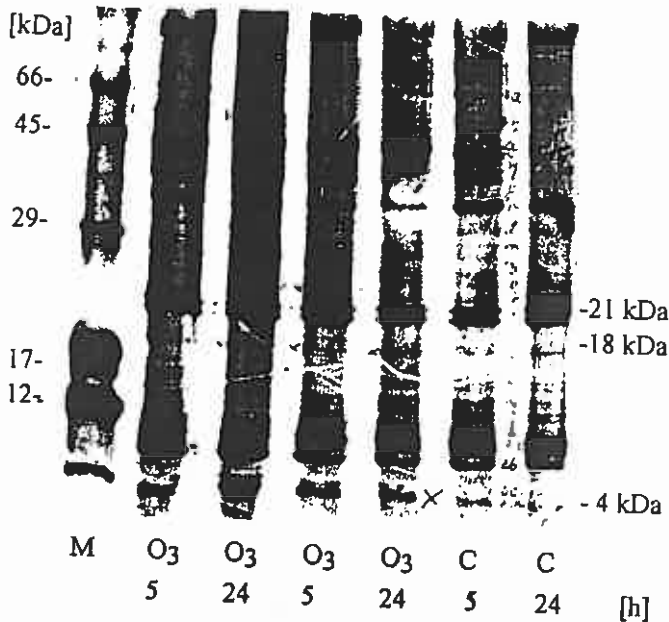


Abb. 18: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel B, 5 h bzw. 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15-18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel. Pro Spur wurden je 10 µg IWF-Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Silbernitrat angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; O₃, Ozonbehandlung (150 nl/l, 1x5 h); C, Kontrolle; 5, 5 h bzw. 24, 24 h nach Behandlungsbeginn; gleiche Beschriftung zweier Spuren bedeutet Proteinmuster von zwei gleich behandelten Parallelpflanzen; 21 kDa-, 18 kDa- und 4 kDa-Proteinbande markiert

Bei einer niedrigerprozentigen Gel-Auftrennung (12-15 %iges Gradientengel bzw. 15 zu beobachten, die bei den Kontrollen 5 h nach Behandlungsbeginn völlig fehlte, 24 h später schwach erkennbar war. Es wurde eine ozonbedingte Anreicherung um den Faktor 1.7 (5 h) bzw. 1.9 (24 h) im Vergleich zu den betreffenden Kontrollen densitometrisch ermittelt (Abb. 19, Bel B; Abb. 20, Bel W3). In Abb. 19 ist unabhängig von der Behandlung in allen Spuren auch das Bel B spezifische Prot%iges Gel mit konstantem Porendurchmesser) wurden die Proteine in der IWF anschließend mit Coomassie-Blau angefärbt. Dabei war nach Ozonbehandlung (150 nl/l, 1x5 h) eine Proteinbande bei ca. 35 kDa (O₃R-5) bei beiden Kultivaren ein bei 21 kDa zu erkennen. Bei cv. Bel W3 war durch Ozon-Exposition erstmals 24 h nach Behandlungsbeginn ein Protein bei 28 kDa (O₃R-4) induziert, das unmittelbar im Anschluß an die Ozonbehandlung (150 nl/l, 1x5 h) nicht zu beobachten war und bei den Kontrollen ebenfalls fehlte (Abb. 20). Bei den Kontrollen sind in Abb. 20 auch die bei 3.1.1. beschriebenen O₃-related Proteine von 25 kDa (O₃R-2) und 26 kDa (O₃R-3) zu erkennen.

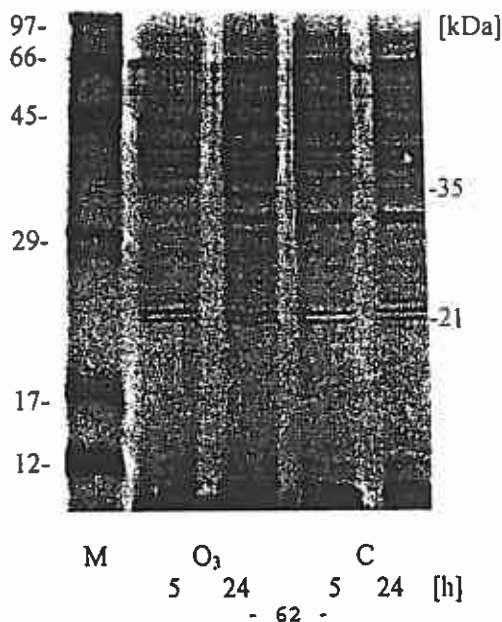


Abb. 19: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel B; 5 h bzw. 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden je 10 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; O₃, Ozonbehandlung (150 nI/l, 1x5 h); C, Kontrolle; 5, 5 h bzw. 24, 24 h nach Behandlungsbeginn; 35 kDa- und 21 kDa-Proteinbande markiert

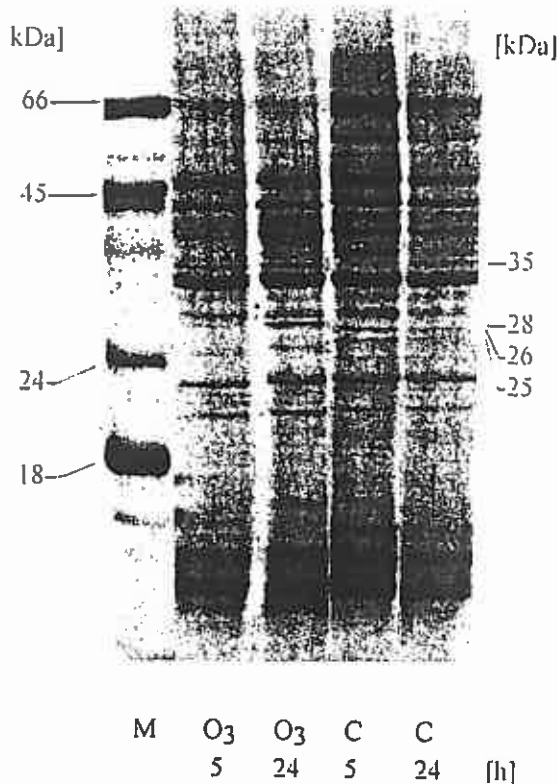


Abb. 20: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel W3; 5 h bzw. 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 12-15 %igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel. Pro Spur wurden je 10 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; O₃, Ozonbehandlung (150 nI/l, 1x5h); C, Kontrolle; 5, 5 h bzw. 24, 24 h nach Behandlungsbeginn; 35, 28, 26 und 25 kDa Proteinbande markiert

3.1.2.2. Sequenzierung des 28 kDa-Proteins und immunologischer Nachweis als saure Chitinase

Das 28 kDa Protein (O₃R-4) wurde durch Mikrosequenzanalyse charakterisiert. Dazu wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine der IWF (Abb. 18) elektrisch auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Amido-Black Färbung der membrangebundenen Proteine wurde die 28 kDa-Proteinbande möglichst exakt aus der Membran ausgeschnitten. Das membrangebundene Protein wurde anschließend einem enzymatischen *in situ* Verdau mit Trypsin unterzogen. Dadurch entstanden Peptide, die mittels Reversed-Phase HPLC aufgetrennt wurden. Nur die Hauptpeptide wurden für eine Aminosäuresequenzanalyse ausgewählt. Mit Hilfe eines Gasphasen-Sequenzierers (Bauw et al., 1989) ergaben sich die in Abb. 21 gezeigten Aminosäuresequenzen von zwei Hauptpeptiden des 28 kDa Proteins.

	136		152
O ₃ R-2	.. A G T A I G Q E L V N N P D L V A ..		

	186		195
O ₃ R-2	.. P S A A D Q A A N R ..		

Abb. 21: Aminosäuresequenzen von zwei durch Trypsin-Verdau erzeugten Peptiden des Ozone-related Proteins 4 (O₃R-4, 28 kDa).

Datenbank-Vergleiche mit Hilfe des Blast P Computerprogramms (Altschul et al., 1990) ergaben eine Übereinstimmung beider Peptidaminosäuresequenzen des 28 kDa Proteins mit durch Trypsin-Verdau erhaltenen Teilpeptiden einer sauren Chitinase [EC 3.2.1.] aus Tabak (Payne et al., 1990) (Homologievergleiche s. IV., Abb. 57). Die homologen Teilpeptide umfaßten ca. 11 % der Gesamtsequenz des Proteins.

Eine Bestätigung der Sequenzierungsergebnisse gelang durch Western blot-Analyse. Dazu wurden Proteine der interzellulären Waschflüssigkeit mittelalter Blätter (cv. Bel W3 und cv. Bel B) mit einem spezifischen Antikörper gegen saure Chitinase aus *Cicer arietinum* L. (Vogelsang und Barz, 1993) inkubiert.

Bei cv. Bel W3 war auf Ozonbehandlung (160 n/l, 1x5 h, 24 h nach Behandlungsbeginn) eine deutliche Bande bei 28 kDa zu erkennen, die bei der entsprechenden Kontrolle sowie bei cv. Bel B nicht auftrat (Abb. 22). Die bei 3.2.1. beschriebenen Antikörper gegen basische Chitinasen zeigten keine Reaktion mit Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit.

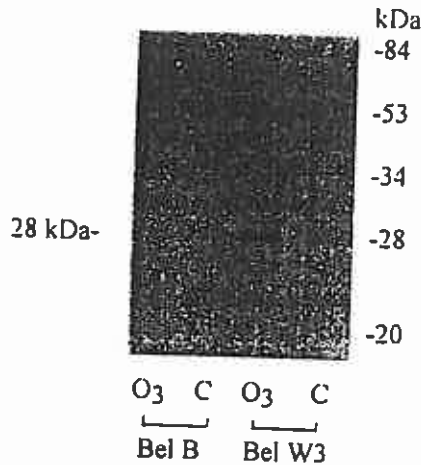


Abb. 22: Western blot Analyse mit Immunodetektion einer sauren Chitinase bei 28 kDa in interzellulärer Waschflüssigkeit mittelalter Tabakblätter (cv. Bel B und Bel W3, 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Der Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen saure Chitinase aus *Cicer arietinum* L. (Vogelsang und Barz, 1993). O₃, Ozonbehandlung (160 nI/l, 1x5 h); C, Kontrolle

3.2. Proteine in Gesamtblattextrakten

Neben den Proteinen in der interzellulären Waschflüssigkeit wurden auch die Proteine in Gesamtblattextrakten untersucht. Mit Hilfe von Antikörpern wurden zunächst spezifische Proteine hinsichtlich Ozon-abhängiger Veränderungen analysiert (3.2.1.). Dann wurde mittels zweidimensionaler Trennmethode und Mikrosequenzierung versucht, weitere Ozon-abhängige Proteine in Gesamtblattextrakten zu charakterisieren (3.2.2.).

3.2.1. Immunologischer Nachweis von Chitinase und β -1,3-Glucanase

Für den immunologischen Nachweis von Chitinase [EC 3.2.1.14] und β -1,3-Glucanase [3.2.1.39] wurden zwei verschiedene polyklonale Antikörper verwendet. Diese wurden selbst gewonnen, indem Kaninchen immunisiert und die

Seren mittels Protein G-affinitätschromatographischen Präparationsmethoden gereinigt wurden (s. II. 11.). Die Antigene (gereinigte Enzymfraktionen von β -1,3-Glucanase und Chitinase), die für die Immunisierung verwendet wurden, stammten aus einer Isolierung aus *Nicotiana tabacum* L. cv. Havanna 425 (Prof. F. Meins, Friedrich-Miescher-Institut, Basel). Mit Hilfe der entsprechenden Antigene produzierte Antikörper reagieren spezifisch nur mit basischen Isoformen der Chitinase bei 32 kDa und 34 kDa (Keefe et al., 1990). Das anti- β -1,3-Glucanase IgG erkennt neben der basischen Isoform bei 33 kDa auch die saure β -1,3-Glucanase bei 36 kDa (Neuhaus et al., 1992).

In einem Versuch mit verschiedenen Ozonkonzentrationen wurden sieben Wochen alte Tabakpflanzen (cv. Bel W3) mit 85 n/l, 165 n/l oder 250 n/l O_3 (2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) behandelt. Die Ozondosierung ist in Abb. 23 dargestellt. Ein Ziel des Versuchs war es, durch Variation der Ozonkonzentration eventuelle Unterschiede in den Proteinmengen der PR-Proteine β -1,3-Glucanase und Chitinase im Vergleich zu den Kontrollen zu detektieren.

Ozon

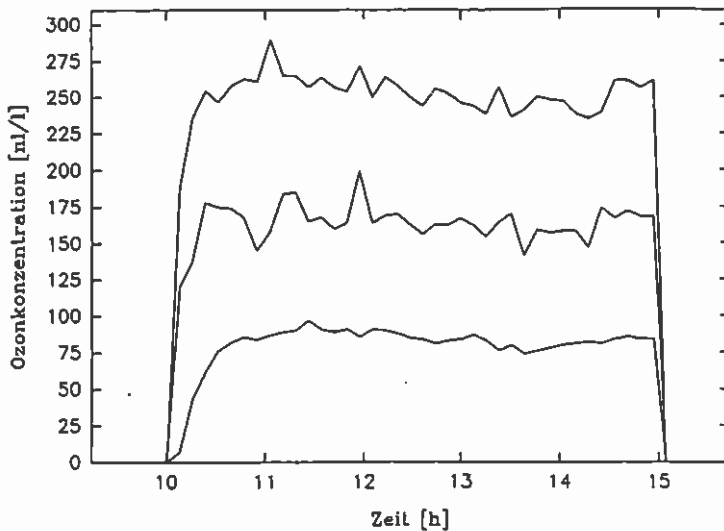


Abb. 23: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der computergesteuerten Ozondosierung (Anegg, 1995).

Blattmaterial aus diesem Versuch, das 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet worden war, wurde für Western-Blot-Analysen verwendet.

Die Gesamtblattextrakte wurden mittels SDS-PAGE (mini-)gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend elektrisch auf Membranen transferiert.

Die Membranen wurden nach der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit einem ersten Antikörper (aus Kaninchen) inkubiert, der spezifisch an Chitinase- oder β -1,3-Glucanase-Isoformen (s.o.) bindet. Um die Bindungsstellen des ersten (spezifischen) Antikörpers an die Membran identifizieren zu können, wurde ein zweiter Antikörper (aus Ziege) verwendet, der unspezifisch an Kaninchen-Antikörper bindet und mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist.

Mit Hilfe einer Farbreaktion mit der alkalischen Phosphatase wurden die Proteinbanden mit den gebundenen Antikörpern visualisiert.

Abb. 24 a zeigt bei der Kontrolle und bei Behandlung mit 85, 165 und 250 nI/l O_3 eine deutliche Proteinbande bei einem Molekulargewicht von etwa 33 kDa (β -1,3-Glucanase, basische Isoform), die sich mit ansteigender Ozonkonzentration verstärkte und bei der höchsten Ozonkonzentration am stärksten induziert war.

Die Resultate einer Inkubation derselben Blattextrakte mit Antikörpern gegen basische Isoformen der Chitinase sind in Abb. 24 b dargestellt.

Bei der Kontrolle und bei Behandlung mit 85, 165 und 250 nI/l O_3 traten zwei Banden bei 32 und 34 kDa auf, wobei die 32 kDa Bande in Kontrollpflanzen wesentlich stärker ausgeprägt war als die 34 kDa Bande. 85 nI/l Ozon bewirkte eine leichte Verstärkung der 34 kDa Isoform im Vergleich zur Kontrolle.

Bei 165 nI/l Ozon erfolgte eine Abschwächung vor allem der 32 kDa Isoform, während die Induktion bei 250 nI/l Ozon bei beiden Banden gleich deutlich und im Vergleich zur Kontrolle am stärksten ausgeprägt war.

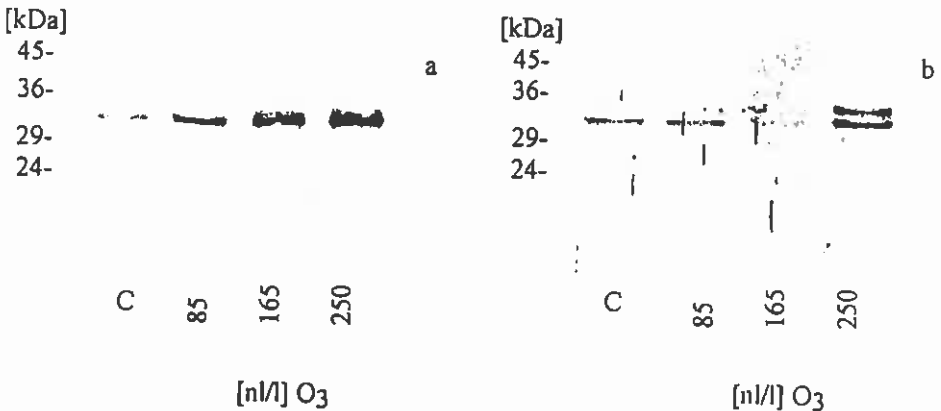
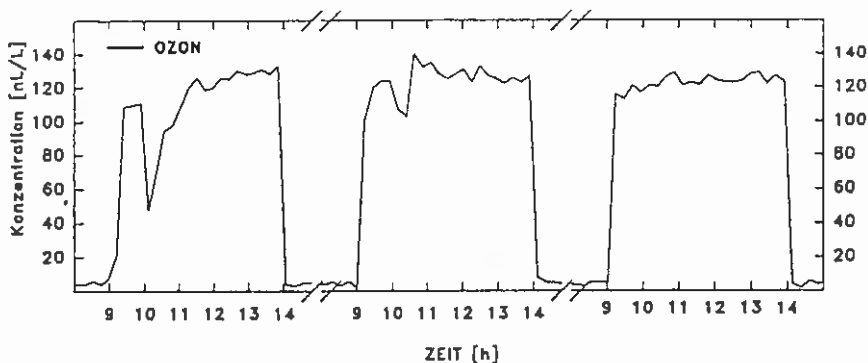


Abb. 24: Western blot Analyse von (a) β -1,3-Glucanase und (b) Chitinase aus Gesamtblattextrakten (Blattnummer 6) von Tabakpflanzen (cv. Bel W3, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Pro Spur wurden 30 μ g Protein aufgetragen. M, Molekulargewichtsmarker; C, Kontrolle; O₃, Ozonbehandlung (85, 165, 250 nL/l; 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen)

In einem vergleichenden Versuch mit O₃ und Ethylen wurden neun Wochen alte Tabakpflanzen (cv. Bel B) mit O₃ bzw. mit Ethylen (jeweils 120 nL/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) behandelt (s. Abb. 25). Ein Ziel des Versuchs war es, die Wirkung von Ethylen auf PR-Proteine wie z.B. Chitinase mit den Effekten einer O₃-Behandlung zu vergleichen.

Ozon



Ethylen

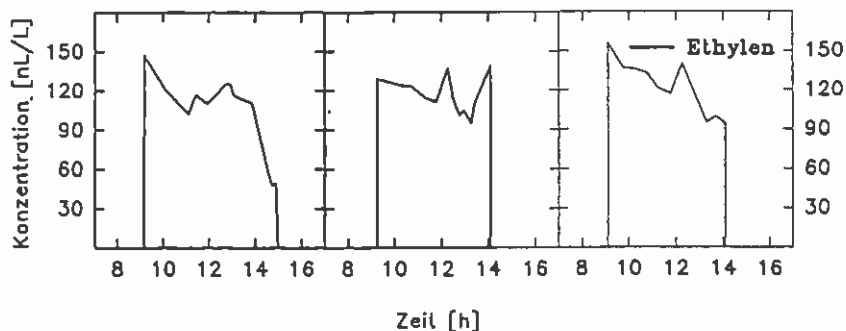


Abb. 25: Darstellung des Verlaufs der Schadgasdosierung von Ozon und Ethylen (120 nL/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen). Die Dosierung erfolgte computergesteuert (aus U. Graf, 1993)

Mit Hilfe der genannten Antikörper wurden Gesamtblattextrakte aus diesem Versuch auf ihren Gehalt an Chitinase-Protein untersucht.

Bei der 'Rocket'-Immunelektrophorese-Methode wandern Antigene in ein Agarosegel, das Antikörper enthält. Dabei wird von den Antikörpern im Gel so lange jeweils ein Antigen pro Antikörper gebunden, bis das Konzentrationsverhältnis dem Äquivalenzpunkt für den Immunkomplex entspricht. Dabei bilden sich Präzipitationslinien aus. Die eingeschlossenen Flächen sind proportional zu den Konzentrationen der Antigene in den Proben. Hierbei ist es in der Regel hinreichend genau, die Länge der „rockets“ zu bestimmen und auf eine entsprechende Eichreihe mit gereinigtem Enzym (Antigen) zu beziehen.

Unter Anwendung dieser immunologischen Methode konnte gezeigt werden, daß O_3 zu einer vierfachen, Ethylen zu einer fünffachen Induktion der Chitinase-Proteinmenge in mittelalten Blättern (cv. Bel B) führte (s. Abb. 26). Dabei wurden die Längen der 'rockets' vermessen, jeweils die Mittelwerte aus zwei Parallelproben für O_3 - bzw. Ethylen-Behandlung gebildet und auf die entsprechende Eichreihe (s. II. 12.3.b) bezogen. Der Induktionsfaktor berechnete sich im Vergleich zu den Mittelwerten der Kontrollen.

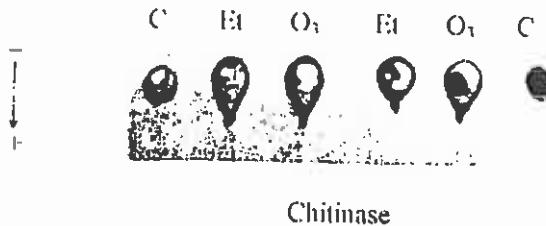


Abb. 26: Rocket-Immunelektrophorese Agarose-Gel (1%) mit 5 mg anti-Chitinase IgG. Es wurden jeweils 5 µg Protein aus Extrakten mittelalter Blätter (cv. Bel B, 78 h nach Behandlungsbeginn geerntet) aufgetragen; C, Kontrolle; Et, Ethylen-Behandlung (120 n/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen); O_3 , Ozon-Behandlung (120 n/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen)

Neben der Behandlung mit einzelnen Gasen wie O_3 bzw. Ethylen sollte auch untersucht werden, welche Effekte eine kombinierte Behandlung mit Schadgasen wie O_3 und NO_2 auf die Konzentrationen der PR-Proteine β -1,3-Glucanase und Chitinase hat. Hierzu wurden Tabakpflanzen (cv. Bel B) unter den gleichen

Bedingungen wie bei O₃- oder Ethylen-Exposition mit den Gasen O₃ und NO₂ in Kombination behandelt (je 120 nL/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen). Die Dosierung ist in Abb. 27 dargestellt.

Ozon + NO₂

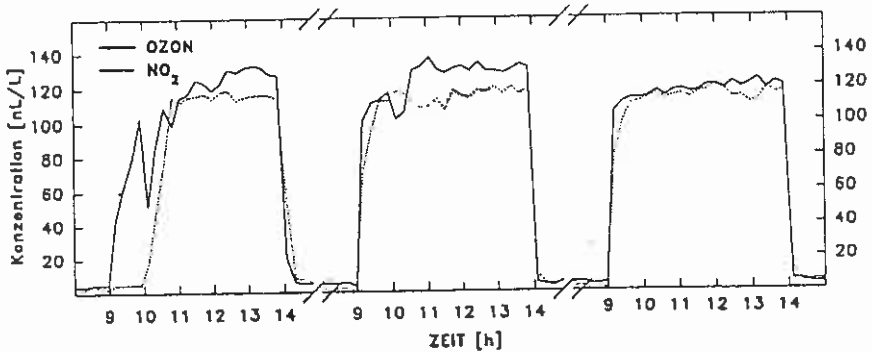


Abb. 27: Darstellung des Verlaufs der Schadgasdosierung von O₃ und NO₂ (120 nL/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen). Die Dosierung wurde computergesteuert eingeregelt (aus U. Graf, 1993)

Zur immunologischen Detektion der Proteinmengen von β -1,3-Glucanase und Chitinase wurde die „Sandwich“-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)-Technik verwendet. Bei dieser Methode wird prinzipiell ein erster spezifischer Antikörper an die Oberfläche der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte adsorbiert. Daran bindet das entsprechende Antigen, das wiederum von einem zweiten (spezifischen), biotinylierten Antikörper erkannt wird. Die Biotinylierung der selbst gewonnenen Antikörper (s.o.) ist in Teil II.11.4. beschrieben. An diesen zweiten Antikörper vermag über das Biotin-Molekül ein Streptavidin-gekoppeltes Enzym (z.B. alkalische Phosphatase) zu binden, das eine Farbreaktion katalysiert. Die Extinktion wurde photometrisch detektiert und ist ein Maß für die Konzentration des Antigens. Prinzipiell wurden bei Anwendung der ELISA-Technik hier und im folgenden jeweils drei Parallelmessungen pro Probe durchgeführt. Bei allen drei Behandlungen (mit O₃, mit Ethylen bzw. mit O₃ und NO₂) waren Induktionen der Proteinmengen beider Enzyme zu erkennen. In Abb. 28 sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von mittelalten Blättern jeweils dreier Parallelpflanzen dargestellt. Die entsprechenden Eichkurven sind der Abb. 8 (II. 12.2.) zu entnehmen.

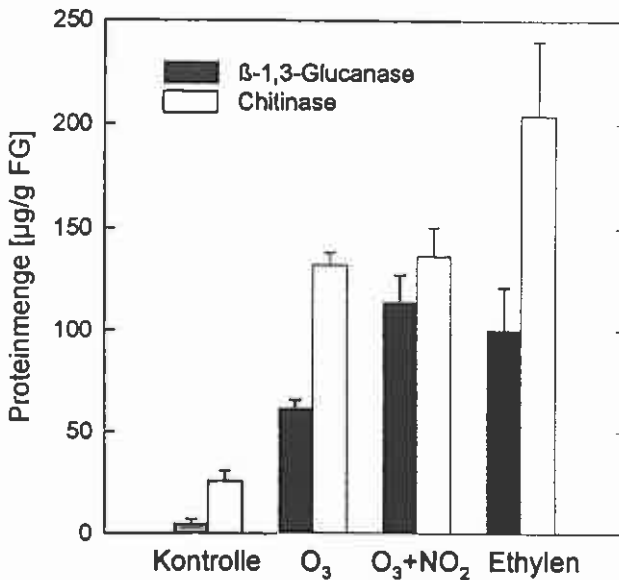


Abb. 28: β -1,3-Glucanase und Chitinase Proteinmenge (cv. Bel B) nach Behandlung mit O_3 , $\text{O}_3 + \text{NO}_2$ bzw. Ethylen (je 120 nl/l, 3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen). Dargestellt sind jeweils Mittelwerte $\pm$ s.e. aus mittelalten Blättern von jeweils drei Parallelpflanzen (n=3). Die Blätter wurden 78 h nach Behandlungsbeginn geerntet.

Auf O_3 -Behandlung wurde im Vergleich zu den Kontrollen eine fünffache Induktion der Chitinase bzw. dreizehnfache Erhöhung der β -1,3-Glucanase beobachtet. O_3 in Kombination mit NO_2 erhöhte die Chitinase-Proteinmenge etwas stärker als alleinige O_3 -Behandlung, nämlich 5,3fach. Der β -1,3-Glucanase-Gehalt wurde fünfundzwanzigfach erhöht. Ethylen führte zu einer achtfachen Erhöhung der Chitinase-Menge und einer zweiundzwanzigfachen Induktion der β -1,3-Glucanase. Die Standardfehler lagen jeweils zwischen 5 und 40 %, bei der Ethylenbehandlung zwischen 10 und 20 %. Vergleicht man die Induktionswerte für die Chitinase-Proteinmenge bei O_3 - bzw. Ethylen-

Behandlung unter Anwendung der ELISA-Technik mit den Resultaten bei der 'Rocket'-Immunelektrophorese-Methode (s.o.), so ergeben sich bei beiden Techniken unter Berücksichtigung der Meßgenauigkeit der 'rockets' (innerhalb von ca. 15 %) ähnliche Werte. Da sich jedoch die ELISA-Technik u.a. durch eine extrem hohe Empfindlichkeit (ng-Bereich, s. Eichkurven, II.12.2.) auszeichnet, wurde sie im weiteren für die Quantifizierung eingesetzt.

3.2.1.1. Effekte des Fungizids Epoxiconazol auf die Proteingehalte von Chitinase und β -1,3-Glucanase

Die Wirkung des Getreidefungizids Epoxiconazol (BAS 480 F; Ammermann et al., 1990) auf die Enzyme β -1,3-Glucanase und Chitinase wurde bei Weizen untersucht. Epoxiconazol ist ein „Breitbandfungizid“, das durch Störung der Biosynthese von Ergosterol, einer Hauptkomponente pilzlicher Zellwände, u.a. auf das Myzelienwachstum von Pilzen einen stark inhibierenden Effekt ausübt (Akers et al., 1990). Die Anzucht und Behandlung der Weizenpflanzen (*Triticum aestivum* L. cv. Star) erfolgten in Zusammenarbeit mit K. Grossmann (BASF, Limburgerhof) und sind bei Siefert et al. (1996) beschrieben. Nach Zusatz von Epoxiconazol (10^{-4} M) zum Nährmedium junger Weizenpflanzen (*Triticum aestivum* L., Sorte „Star“) wurden drei bzw. acht Tage nach der Behandlung die Proteingehalte von Chitinase und β -1,3-Glucanase im Sproß untersucht. Zur Messung der Proteingehalte wurde die ELISA-Technik verwendet, die ausführlich mit Abbildungen der entsprechenden Eichkurven bei II. 12.2. (Abb. 9 a und b) beschrieben ist. Es wurden die gleichen Antikörper verwendet, die bei 3.2.1. beschrieben sind. Dabei konnte ein signifikanter Anstieg der Proteinmengen beider Enzyme durch Epoxiconazol-Behandlung beobachtet werden (s. Abb. 29). Die Chitinase-Proteinmenge war am dritten Tag um 45 %, am achten Tag um 184 % im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen erhöht (Abb. 29 a). Für die β -1,3-Glucanase-Proteinmenge betrugen die Induktionswerte 59 % am dritten bzw. 30 % am achten Tag (Abb. 29 b). Doch im Vergleich zur Stimulation dieser Hydrolasen durch Ozon in Tabak (s. 3.2.1., Abb. 28) wurden diese Proteine durch Epoxiconazol in Weizen nur moderat akkumuliert.

Insgesamt wurde hier erstmalig für einen fungiziden Wirkstoff gezeigt, daß Epoxiconazol Phytopathogene nicht nur direkt bekämpft, sondern auch als Stimulans der pflanzeigenen, enzymatischen Abwehrreaktionen fungieren kann. Diese Ergebnisse wurden bereits publiziert (Siefert et al., 1996).

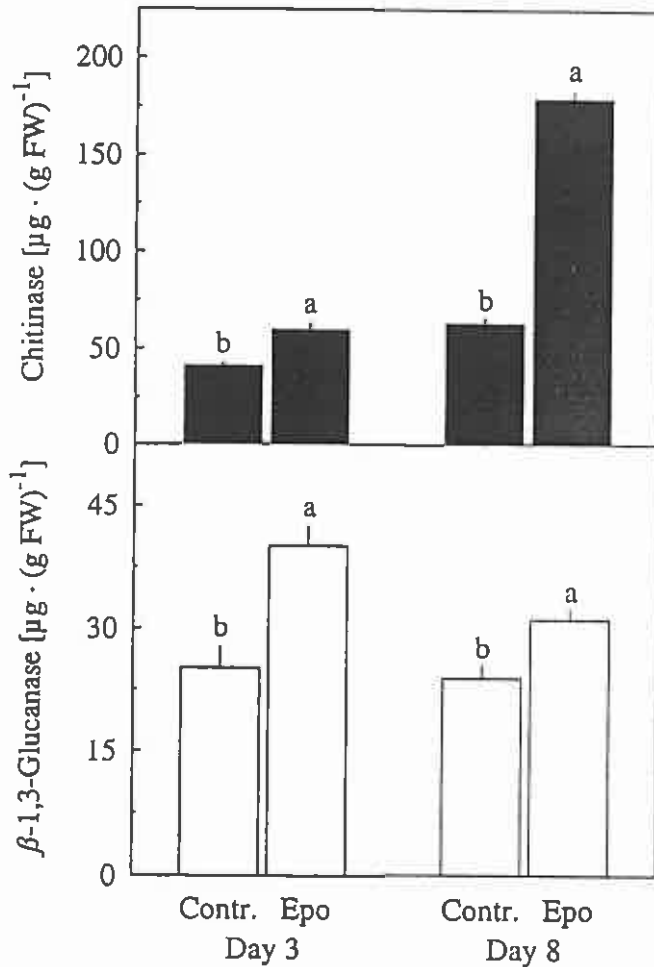


Abb. 29: Effekt von Epoxiconazol auf die Proteinmengen von (a) Chitinase und (b) β -1,3-Glucanase im Weizensproß. Contr., Kontrolle; Epo, 10^{-4} M Epoxiconazol. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von vier bis sechs Parallelmessungen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($P < 0.05$; Duncan's Multiple Range Test) (Siefert et al., 1996)

3.2.1.2. Vergleich der Effekte von O₃-Behandlung und *Botrytis cinerea*-Infektion auf die Proteingehalte an Chitinase und β -1,3-Glucanase

Da Ozonbelastung eine Induktion der hydrolytischen Enzyme β -1,3-Glucanase und Chitinase bewirkt (s. 3.2.1.), und *Botrytis cinerea* β -1,3-Glucane und Chitin als Zellwandbestandteile enthält (Rosenberger, 1976), wurde die Beteiligung dieser Enzyme an einer möglichen Dispositionsänderung auf Proteinebene untersucht.

Dazu wurden Tabakpflanzen (cv. Bel W3) zunächst mit O₃ (85 nl/l; 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) vorbehandelt. Kontrollpflanzen wurden in Reinluft gehalten. Jeweils die Hälfte der mit O₃ vorbehandelten Pflanzen bzw. der Kontrollpflanzen wurde anschließend mit *Botrytis cinerea* beimpft. Durch *Botrytis cinerea* Befall verursachte Blattnekrosen sind bei Anegg (1995) abgebildet. Extrakte aus Blättern unbehandelter, mit 85 nl/l O₃ behandelter und/oder mit *Botrytis cinerea* infizierter Pflanzen wurden durch Western-Blot-Technik auf Proteinebene verglichen. Dabei wurden Antikörper gegen β -1,3-Glucanase und Chitinase verwendet. Diese reagieren spezifisch nur mit basischen Isoformen der Chitinase bei 32 kDa und 34 kDa (Keefe et al., 1990) bzw. mit der basischen 33 kDa- und der sauren 36 kDa-Isoform der β -1,3-Glucanase (Neuhaus et al., 1992).

Abb. 30 a zeigt die Auswirkungen der verschiedenen Behandlungen auf die Menge an β -1,3-Glucanase-Protein. In Kontrollpflanzen war bei 33 kDa eine Proteinbande (basische Isoform der β -1,3-Glucanase) konstitutiv vorhanden.

In *Botrytis cinerea*-infizierten Pflanzen war diese Bande wesentlich stärker ausgeprägt. Bei 85 nl/l Ozon trat sie gegenüber der Kontrolle verstärkt, gegenüber *B. cinerea*-infizierten Blättern abgeschwächt hervor. Bei 85 nl/l Ozon und *B. cinerea*-Befall war die 33 kDa Bande stärker als bei alleiniger *B. cinerea*-Infektion ausgeprägt.

Aus Abb. 30 b sind die Effekte auf die Menge an Chitinase-Protein zu ersehen. Behandlung mit *B. cinerea* allein (ohne Ozon) und Ozonbehandlung (85 nl/l) kombiniert mit anschließender *B. cinerea*-Infektion führten zum Auftreten von zwei gleich stark ausgeprägten Proteinbanden bei 32 und 34 kDa (basische Isoformen der Chitinase). Bei nur mit 85 nl/l Ozon behandelten bzw. völlig unbehandelten Blättern trat jeweils die 32 kDa-Bande stark, die 34 kDa-Isoform etwas schwächer hervor. Die stärksten Banden waren bei Kombination von Ozonbehandlung (85 nl/l) und *B. cinerea*-Infektion zu erkennen.

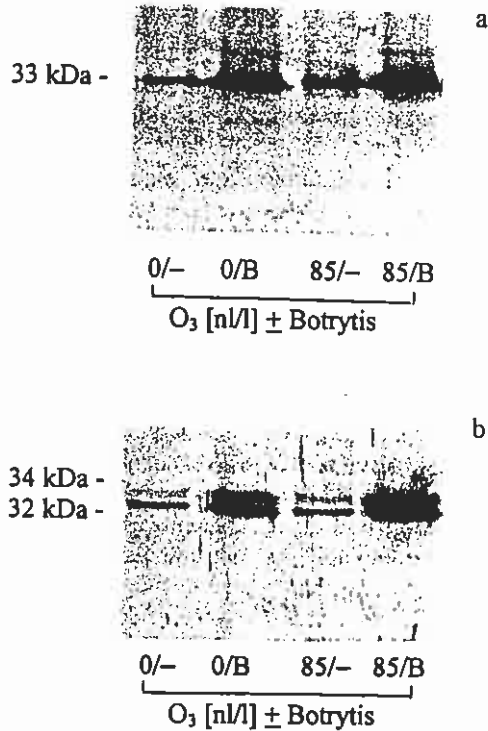


Abb. 30: Western blot Analyse von (a) β -1,3-Glucanase und (b) Chitinase in Gesamtblattextrakten von Tabakpflanzen (cv. Bel W3, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet, jeweils Blattnummer 6). Es wurden je 30 μ g Protein eingesetzt. Die Pflanzen waren folgendermaßen behandelt worden: 0/-, nicht mit O_3 vorbehandelt (0 nl/l O_3) und nicht mit *Botrytis cinerea* infiziert; 0/B, nicht mit O_3 vorbehandelt (0 nl/l O_3), aber mit *B. cinerea* beimpft; 85/-, mit 85 nl/l O_3 vorbehandelt, jedoch nicht mit *B. cinerea* infiziert; 85/B, mit 85 nl/l O_3 vorbehandelt und mit *B. cinerea* beimpft

3.2.2. Ozonabhängige Veränderungen des Proteinmusters bei ein- und zweidimensionaler Auftrennung

Um möglichst alle in Blättern enthaltenen Proteine vollständig zu erfassen und anschließend vergleichend auftrennen zu können, wurde folgende

Extraktionsmethode gewählt, die sich auch für zweidimensionale Auftrennungen eignet (Hurkman und Tanaka, 1986). Dabei handelt es sich um eine phenolische Protein-Extraktion. Die Details der Extraktionsmethode sind in II. 13.1.1. beschrieben. Das gefrorene Blattmaterial wurde in einer vorgekühlten Reibschale solange gemörsert, bis ein feiner Puder vorlag. Nach Zugabe von Extraktionspuffer wurde weiter homogenisiert, bis die nunmehr feine Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurde. Hier wurde sie bei 4°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und das Pellet ein zweites Mal mit Extraktionspuffer versetzt. Nach einer Inkubationsphase bei 4°C wurden die Überstände vereinigt und Wasser-gesättigtes, (4°C-) kaltes Phenol hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurden die Extrakte bei 4°C inkubiert und anschließend die beiden Phasen durch Abzentrifugieren getrennt. Die (obere) Phenol-Phase wurde danach vorsichtig abgenommen, die (untere) Extraktionspuffer-Phase nochmals mit Phenol versetzt und wiederum bei 4°C inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurden die Phenol-Phasen vereinigt und mit Präzipitationspuffer versetzt. Die Proteine wurden über Nacht bei -20°C präzipitiert und durch Zentrifugation isoliert. Das Pellet wurde anschließend in H₂O dest. resolubilisiert und mit Aceton versetzt („gewaschen“), dann nach gründlichem Mischen bei -20°C inkubiert und schließlich abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in Probenpuffer aufgenommen, gemischt und bei -20°C bis zum Einsatz eingefroren.

Zunächst wurde durch eindimensionale SDS-PAGE (Abb. 31) versucht, Ozon-abhängige Unterschiede im Proteinhinmuster der beiden Kultivare zu entdecken. Wie aus Abb. 31 hervorgeht, enthielten die Gesamtblattextrakte -wie zu erwarten- wesentlich mehr Proteine als die interzellulären Waschflüssigkeiten (s. z.B. 2.1.). Prominent war vor allem die Bande bei ca. 53 kDa. Dabei handelt es sich um die große Untereinheit des Chloroplasten-Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase (Rubisco), das charakteristisch für Gesamtblattextrakte ist (Strasburger, 1991). Auffällig ist, daß die Proteinhinmuster der Gesamtblattextrakte von cv. Bel W3 und Bel B große Ähnlichkeiten aufweisen (vgl. 2.1., IWF). Ozonabhängige Unterschiede wurden bei eindimensionaler Auftrennung nicht entdeckt.

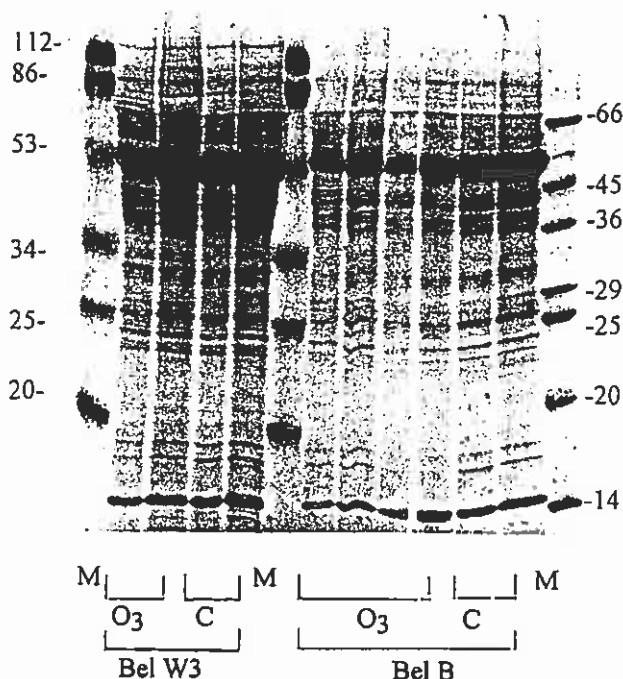


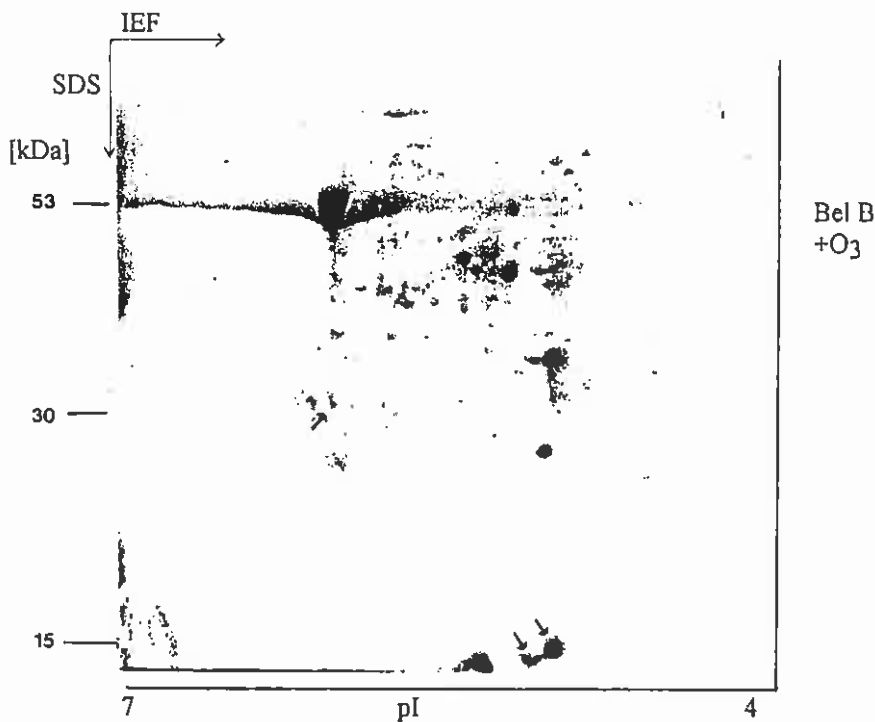
Abb. 31: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen in Gesamtblattextrakten von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel W3 und cv. Bel B, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 14 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Es wurden abwechselnd pro Spur je 10 µg bzw. 20 µg Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. M, Molekulargewichtsmarker; O₃, Ozonbehandlung (150 n/l, 1x5h); C, Kontrolle

Um eventuell nur durch zweidimensionale Auftrennung erkennbare Ozonabhängige Unterschiede zu erfassen, wurden phenolische Gesamtextrakte (II.1.1.1.) in der 1. Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (IEF) und in der 2. Dimension nach ihrem Molekulargewicht (SDS-PAGE) aufgetrennt.

Dabei ist zu betonen, daß der gewählte Auftrennungsbereich von ca. pH 4-7 die basischen Proteine ausklammert, z.B. die basischen Isoformen der PR-Proteine β -1,3-Glucanase und Chitinase. Daß diese durch Ozon induziert werden, wurde bereits immunologisch gezeigt (s. 3.2.1., Western blot-Analysen). Von jeder Probe wurden zunächst zweidimensionale Gele angefertigt, die mit Coomassie-Blau gefärbt wurden, um die Proteinmengen abschätzen zu können. Denn für eine erfolgreiche Mikrosequenzierung sind Proteinmengen im Coomassie-Färbereich von 0.2-0.5 µg erforderlich. Die große Untereinheit des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase (Rubisco) von ca. 53 kDa diente als „Molekulargewichtsmarker“ für die 2. Dimension (s. Abb. 32 a). Quantitative Veränderungen von Proteinen wurden densitometrisch erfaßt.

Abb. 32 zeigt 2D-Auftrennungen von Extrakten mittelalter Blätter von cv. Bel B. Zwei eng benachbarte Proteine von 15 kDa (p15a und p15b, Nomenklatur nach van Loon et al., 1994; IEP ca. 5.0) wurden durch Ozon-Behandlung (160 nl/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) im Vergleich zu den Kontrollen induziert (Anreicherung um den Faktor 2).

Ein 30 kDa Protein (IEP ca. 6.0) wurde durch O_3 reprimiert (um ca. 80 %; O_3 R-6). Die Mikrosequenzanalyse (Bauw et al., 1989) ergab nur ein sehr kurzes Peptid von fünf Aminosäuren, welches zusammen mit UV-induzierten Proteinen diskutiert wird (s. IV., Abb. 58).



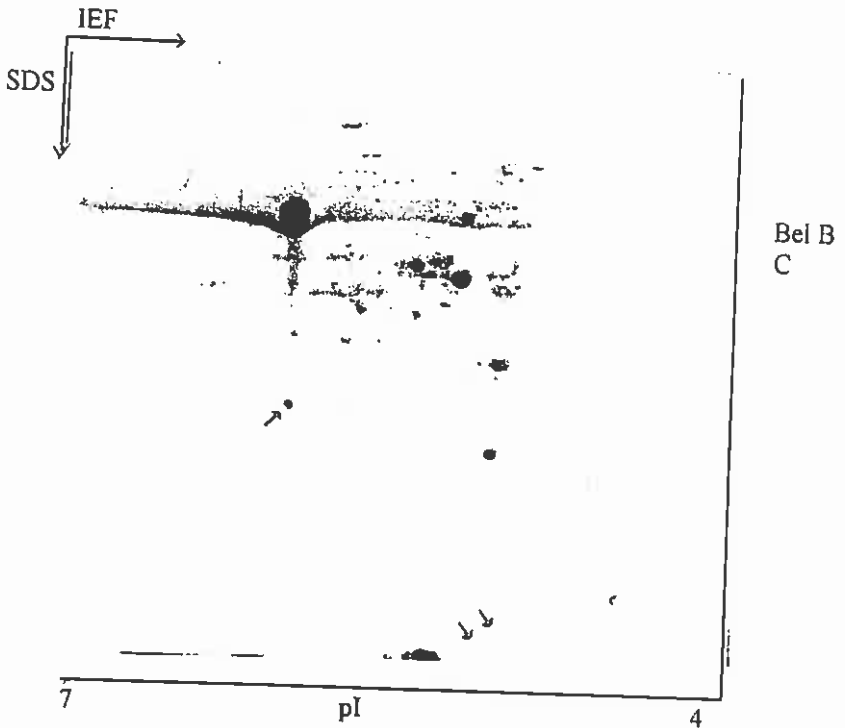


Abb. 32: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in Gesamtblatt-extrakten mittelalter Blätter (cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. (a) O₃, Ozonbehandlung (160 nL/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen), (b) C, Kontrolle

Abb. 33 zeigt eine 2D-Auftrennung von Blattextrakten des Kultivars Bel W3. Die Proteinmuster von ozonbehandelten und unbehandelten Pflanzen waren bei diesem Kultivar identisch.

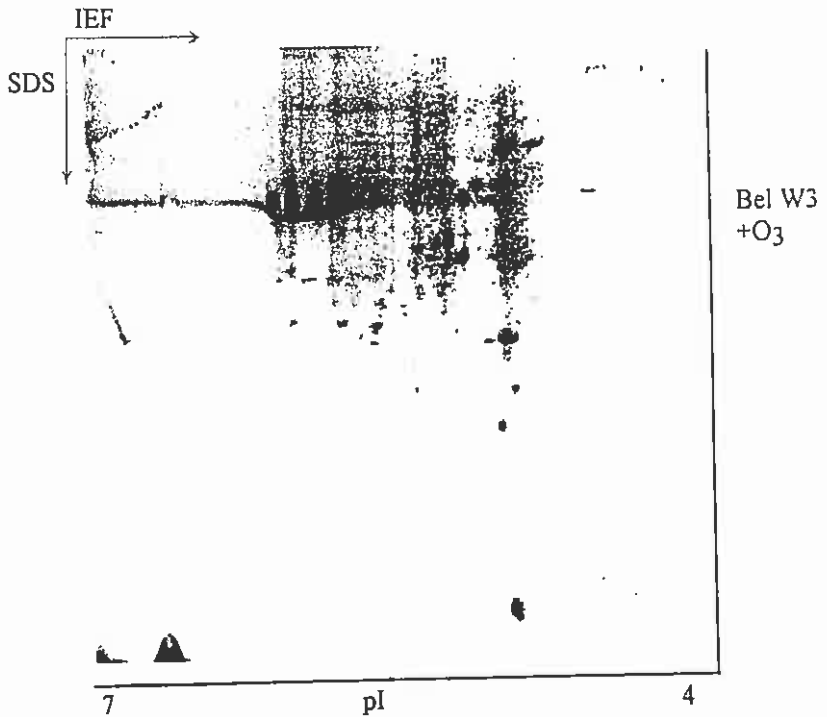


Abb. 33: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in Gesamtblatt-extrakten mittelalter Blätter (cv. Bel W3, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. O₃, Ozonbehandlung (160 nL/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen)

3.2.3. Sequenzierungsergebnisse

Um für Mikrosequenzierungszwecke (Bauw et al., 1989) ausreichende Proteinmengen zu gewinnen, wurden von repräsentativen Proben mindestens vier zweidimensionale Auftrennungen parallel durchgeführt. Anschließend folgten die in III. 2.2. und in II. 13. ausführlich beschriebenen Arbeitsschritte. Die Tab. 5 faßt die Ergebnisse der Mikrosequenzanalyse von Proteinen in Gesamtblattextrakten mittelalter Blätter (cv. Bel W3 und cv. Bel B) zusammen (s. auch 3.2.2.). Zu berücksichtigen ist jedoch, daß bei kurzen Peptiden wie z.B. dem Peptid von O₃R-6, das nur ca. 2 % der Gesamtsequenz umfaßt, ein Homologievergleich (s. IV. Abb. 58) generell sehr problematisch ist (s. Allen, 1989). Er wurde erst durchgeführt, als ein UV-induziertes Protein Übereinstimmungen mit Peptiden einer Carboanhydrase zeigte (s. 5.4., UVR-1). Da das Protein O₃R-6 bezüglich seiner Lage im 2D-Proteinmuster dem Protein UVR-1 sehr ähnlich war, wurde die kurze Peptidsequenz von O₃R-6 auf mögliche Homologien zu Peptiden der Carboanhydrase (CA) untersucht und eine völlig identische CA-Peptidsequenz gefunden (s. Abb. 58 und IV., Abb. 58).

Tab. 5: O₃-related Proteine in Gesamtblattextrakten mittelalter Tabak-Blätter (cv. Bel W3 und cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet) MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt; p15, Polypeptid bei 15 kDa (Nomenklatur nach van Loon et al., 1994); O₃R, O₃-related; Aminosäureabkürzungen, s. II.13.6.; Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase

Abkürzung (für das jeweilige Protein)	Kultivar	MG [kD]	IEP	identifizierte Peptidsequenzen	Sequenzhomologien zu
p15a	Bel W3; Bel B	15	5.0	1.) I I G F D N V R 2.) Y W T M W K 3.) Q V Q - I S F	Rubisco (kleine Untereinheit)
p15b	Bel W3, Bel B	15	5.0	1.) I I G F D N V R 2.) Y W T M W K 3.) V Q M A K/S F 4.) S P G Y Y D G R	Rubisco (kleine Untereinheit)
O ₃ R-6	Bel B	30	6.0	L M - L P A	Carboanhydrase (?)

4. Ozon und UV-B -bedingte morphologische und biochemische Effekte

Im Versuch V62 in den Expositions-kammern der GSF-Phytotronanlage (Payer et al., 1994) wurden Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) an zwei aufeinanderfolgenden Tagen (2x5 h, jeweils 9.00-14.00 h) mit Ozon, mit UV-B oder mit Ozon und UV-B behandelt (s Abb. 34 a). Die Ozonkonzentration lag bei maximal 160 nM. Die minimale Erythem-wirksame Dosis der UV-B Strahlung war ca. 0.67 MED h⁻¹. Unter Berücksichtigung des (geringen) UV-B Anteils des Weißlichtes, das auch vor (6.00-9.00 h) und nach (14.00-20.00 h) der UV-B Behandlung angeschaltet war, ergab sich eine UV-B -Gesamtdosis von 7.5 MED. Die spektrale Verteilung der Strahlung auf Pflanzenniveau war mit einer cut-off Wellenlänge von 293 nm (bei 0.1 mW m⁻² nm⁻¹) besonders im UV-B Bereich dem Sonnenspektrum sehr ähnlich (Abb. 34 b).

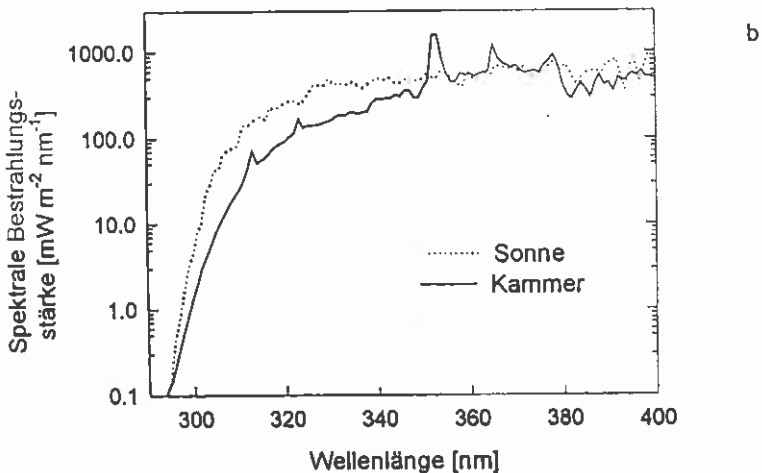
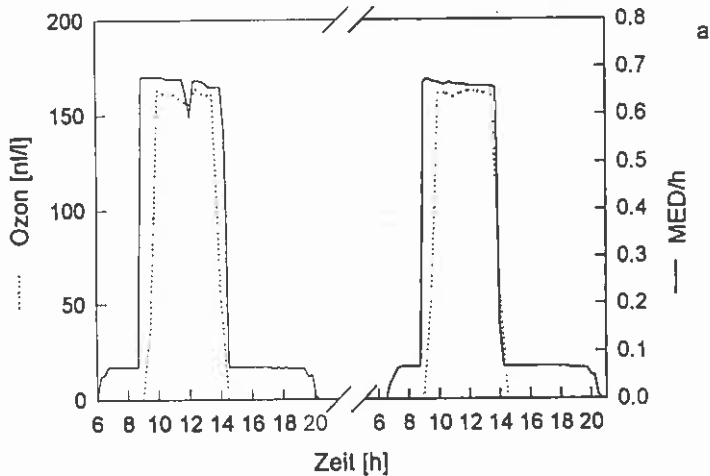


Abb. 34: Expositionsprofile für Ozon und UV-B Strahlung. (a) Darstellung des Verlaufs der Dosierung von Ozon (gepunktete Linie) bzw. der minimalen Erythem-wirksamen Dosis (MED; durchgezogene Linie). Die Dosierung erfolgte jeweils computergesteuert. (b) Mittlere spektrale Strahlung für die Versuchsfläche der Expositions-kammern (auf Pflanzenhöhe gemessen) im Vergleich zum Sonnenspektrum (Sonne 60°, 298 Dobson Units Gesamt-Ozonsäule, < 2 Oktas Bewölkung, Albedo 0.05) (nach Thalmair et al., 1996)

4.1. Symptome nach O₃- und UV-B-Behandlung

Die folgende Tabelle (Tab. 6) zeigt die Ozon-Konzentrationen bzw. Ozondosis-Werte im Versuch V62. Daraus geht hervor, daß die beiden Expositions-kammern (EKB 2, Ozon+UV-B; EKB 4, Ozon) hinsichtlich der Ozondosierung weitgehend identisch waren und jeweils vergleichbare Ozonkonzentrationen aufwiesen.

Tab.6: Ozon-Konzentrationen und Ozon-Dosis-Werte (V62); EKB, Expositions-kammerbereich

Erntezeitpunkt [h]	Ozon-Konzentration [nI/l]	Ozon-Dosis [nI/l·h]
EKB 2 (Ozon + UV-B)		
	<i>1. Periode (1x5 h)</i>	
2		320
8	160.7 ± 0.9	830
24		830
	<i>2. Periode (2x5 h)</i>	
32	161.0 ± 0.3	1670
EKB 4 (Ozon)		
	<i>1. Periode (1x5 h)</i>	
2		340
8	168.7 ± 1.4	850
24		850
	<i>2. Periode (2x5 h)</i>	
32	168.1 ± 1.0	1700

Der Ozon-tolerante Kultivar Bel B zeigte keine Symptome auf Ozon- bzw. Ozon- und UV-B-Behandlung hin. Die nekrotischen Blattschäden der Pflanzen des Kultivars Bel W3 als Folge von Ozon bzw. von Ozon und UV-B sind der Abb. 35 zu entnehmen. Ozon-Behandlung allein (160 nI/l, 2x5 h, 32 h nach Behandlungsbeginn) führte zu typischen Pergament-ähnlichen Läsionen an mittelalten Blättern des Ozon-sensitiven Tabakkultivars Bel W3. Ozon- und

gleichzeitige UV-B -Exposition hatten signifikant höhere Blattschäden (der Blätter 5 und 6, bis zu 2.7fach) zur Folge (s. Abb. 35 und Abb. 36 c, d).

Die Einstufung der Blattschädigung erfolgte nach Langebartels et al. (1991) prozentual zur Gesamtblattfläche. Die Schäden stiegen mit zunehmendem Alter der mittelalten Blätter von 15 % (Blatt 4) auf 43 % (Blatt 6) nach Ozon-Behandlung bzw. von 20 % (Blatt 4) auf 73 % (Blatt 6) nach kombinierter Behandlung mit Ozon und UV-B an (s. Abb. 35). UV-B Strahlung allein führte in beiden Kultivaren zu keiner sichtbaren Blattschädigung.

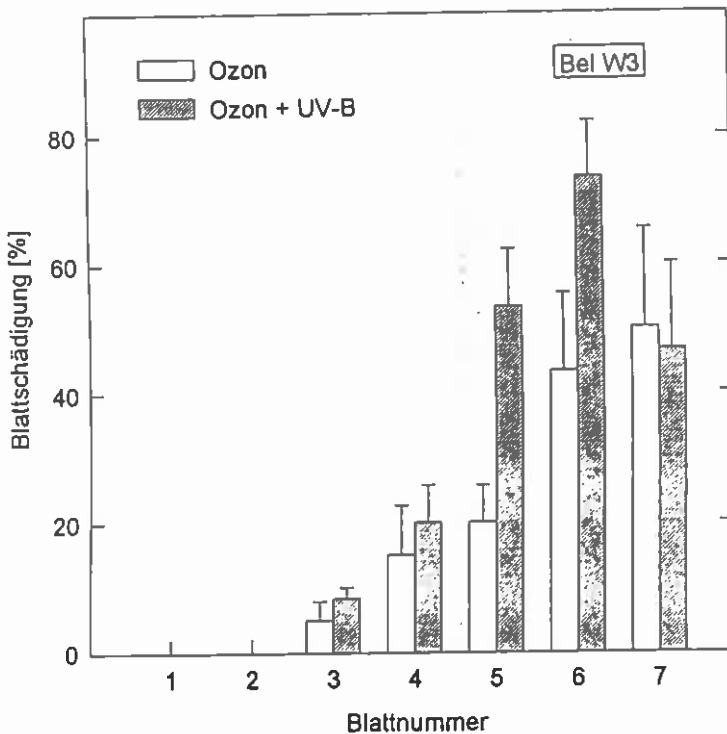
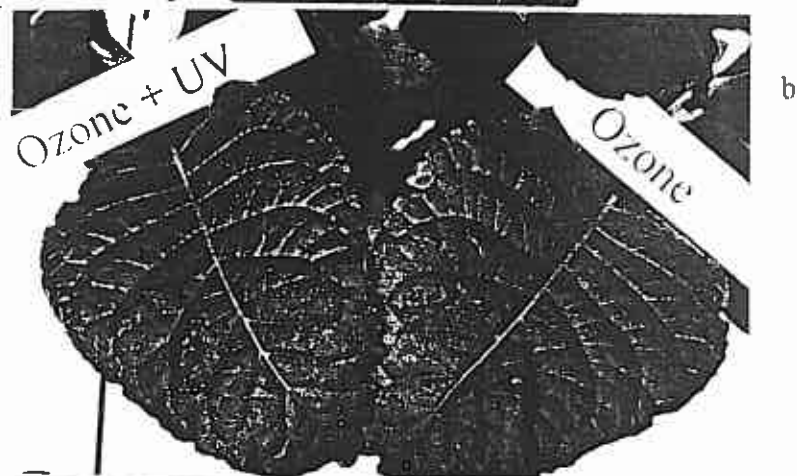
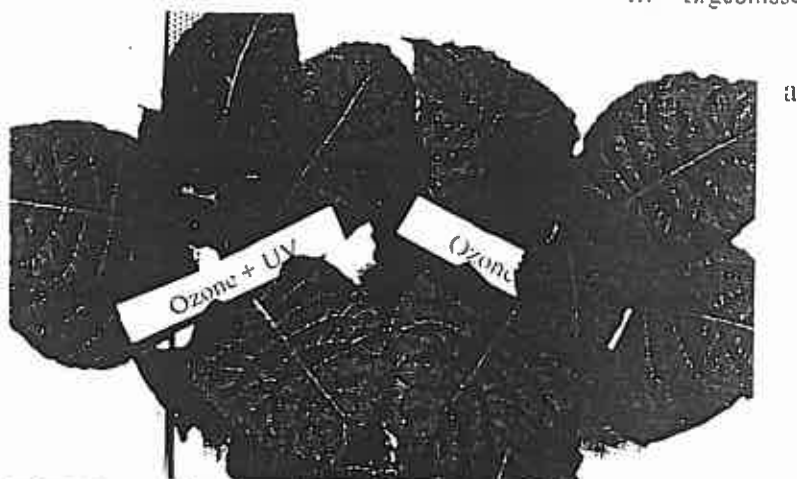
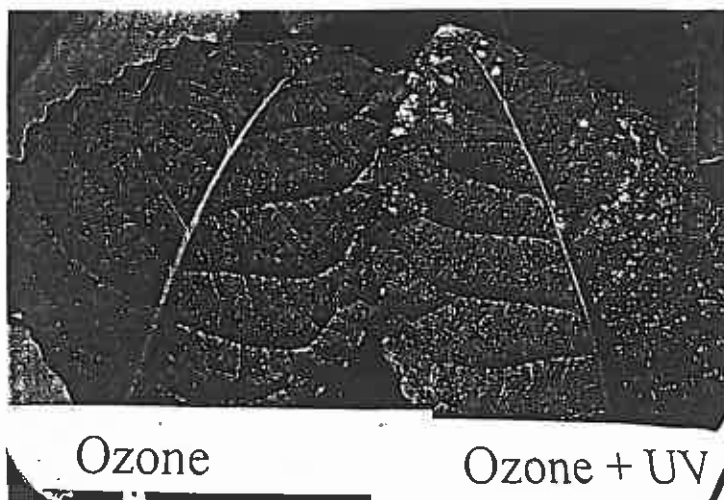


Abb. 35 Blattschädigung bei *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3, 32 h nach Behandlungsbeginn mit Ozon (160 n/l, 2x5 h) (weiße Balken) bzw. mit Ozon (160 n/l, 2x5 h) und UV-B (7.5 MED Gesamtdosis, 2x5 h) (schraffierte Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von jeweils drei Parallelpflanzen.



d



e



Abb. 36: Blattnekrosen (cv. Bel W3, 32 h nach Behandlungsbeginn). Ozone, Ozonbehandlung (160 nI/l, 2x5 h); Ozone + UV, kombinierte Behandlung mit Ozon (160 nI/l, 2x5 h) - und UV-B (7.5 MED Gesamtdosis, 2x5 h); (a) Aufsicht auf eine mit Ozon bzw. mit Ozon und UV-B behandelte Pflanze; (b)+(c)+(d), Einzelblätter der in (a) gezeigten Pflanzen im Vergleich: (b) Blatt 4; (c) Blatt 5; (d) Blatt 6; (e) Gesamt-Ansicht der Versuchspflanzen; in der Bildmitte sind die in (d) gezeigten Einzelblätter zu erkennen.

4.2. Enzymatische Aktivität der β -1,3-Glucanase

Die Aktivität des Enzyms β -1,3-Glucanase wurde nach Behandlung von Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) mit Ozon (160 nI/l), mit UV-B (0.67 MED/h) bzw. mit Ozon (160 nI/l) und UV-B (0.67 MED/h) untersucht (s. Abb. 34, V62). Die Details der Enzymaktivitätsbestimmung sind in II.8.2. beschrieben. Als enzymatisches Substrat diente Laminarin, ein Reservepolysaccharid der Braunalge *Laminaria digitata* (Strasburger, 1991). Die enzymatische Reaktion erfolgte während einer 30minütigen Inkubationsphase bei 37°C und wurde durch Zugabe von NaOH und anschließendes Erhitzen abgestoppt. Als Färbereagenz wurde Anilin-Blau verwendet, was zur Ausbildung eines fluoreszierenden Sirofluor-Laminarin Komplexes führte (Evans und Hoyne, 1984). Die Messung erfolgte nach Siefert et al. (1994) fluoreszenzphotometrisch. Von jedem Extrakt wurden drei Parallelansätze und ein vierter Ansatz, in dem durch sofortige NaOH-Zugabe der Laminarinabbau verhindert wurde, untersucht. Aus der Differenz der vor Beginn der Reaktion abgestoppten Probe und dem Mittelwert der drei anderen Proben ergab sich die enzymatisch abgebaute Laminarinmenge. Nach Schraudner et al. (1992) wurde die resultierende β -1,3-Glucanase Aktivität berechnet und in ng^{-1} FG ausgedrückt, da das Verhältnis Proteinmenge / FG konstant blieb. Es wurde die β -1,3-Glucanase-Aktivität bei den Blättern 1-7 zu verschiedenen Erntezeitpunkten ermittelt, nämlich 0 h, 24 h und 32 h nach Behandlungsbeginn (s. Abb. 37).

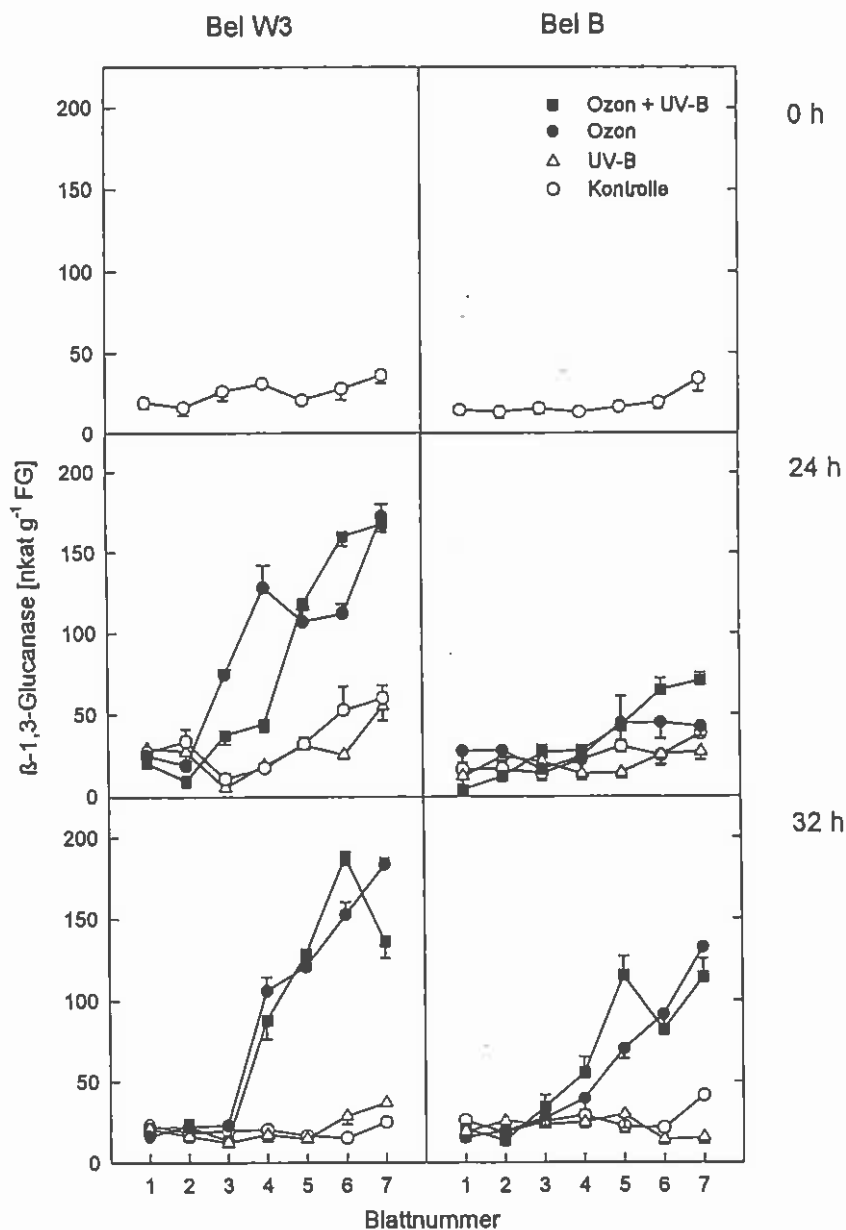


Abb. 37: Enzymatische Aktivität der β -1,3-Glucanase zu verschiedenen Zeitpunkten, nämlich 0 h, 24 h und 32 h nach Behandlungsbeginn. Die Tabakpflanzen wurden mit Ozon (160 nI/l), mit UV-B (0.67 MED/h), mit Ozon (160 nI/l) und UV-B (0.67 MED/h) bzw. mit Reinluft behandelt; links: cv. Bel W3, rechts: cv. Bel B. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von Blättern jeweils dreier Parallelpflanzen (n=3)

Wie aus Abb. 37 hervorgeht, zeigten die Kontrollpflanzen zum Zeitpunkt 0 h für cv. Bel W3 und Bel B ein vergleichbar niedriges Aktivitätsniveau der β -1,3-Glucanase, das mit zunehmendem Blattalter entwicklungsbedingt geringfügig anstieg (Schraudner et al., 1992; Ernst et al., 1996). Die β -1,3-Glucanase Aktivität war 8 h nach Beginn der ersten fünfstündigen Behandlungsperiode bei cv. Bel W3 auf O_3 -Behandlung hin geringfügig erhöht. Bei cv. Bel B war nach 8 h ein leichter Anstieg der β -1,3-Glucanase-Aktivität durch O_3 + UV-B-Behandlung zu beobachten (s. Tab. 7).

Tab. 7: β -1,3-Glucanase Aktivitäten [nkat/g FG], 8 h nach Beginn der ersten fünfstündigen Behandlungsperiode. Mittelwerte $\pm$ s.e. (n=3)

Behandlung	5. Blatt	
	Bel W3	Bel B
O_3 +UV-B	33.09 ± 0.98	23.09 ± 1.91
O_3	40.67 ± 0.55	14.96 ± 2.72
UV-B	33.20 ± 1.68	18.51 ± 1.59
Kontrolle	32.81 ± 0.78	18.94 ± 2.53

24 h nach Behandlungsbeginn bzw. 19 h nach Beendigung der ersten fünfstündigen Behandlungsperiode waren bei cv. Bel W3 sowohl nach Ozon als auch nach Ozon- und UV-B -Behandlung stark erhöhte Aktivitäten der β -1,3-Glucanase zu beobachten (s. Abb. 37). Die deutliche Induktion war mit ca. siebenfach erhöhten Werten bei den Blättern 3 und 4 auf Ozonbehandlung hin noch stärker ausgeprägt wie nach kombinierter Exposition mit Ozon und UV-B (ca. 2.5 bis 3.5fache Erhöhung). Ab Blatt 5 waren die Induktionswerte bei einfacher bzw. kombinierter Exposition weitgehend identisch (ca. dreifache Induktion im Vergleich zu den Kontrollen). Für cv. Bel B ergab sich nach 24 h ab Blatt 5 eine Erhöhung der β -1,3-Glucanase Aktivität um das 2-2.5fache durch Ozon bzw. durch Ozon und UV-B bedingt. Auf alleinige UV-B -Behandlung hin wurden Aktivitäten bei cv. Bel W3 und Bel B ermittelt, die in etwa mit den Kontrollwerten übereinstimmten. Dabei ist zu berücksichtigen, daß der UV-B Anteil in den Expositionskammern mit ca. 0.67 Wm^{-2} im Vergleich zu Freilandbedingungen ($2,8 \text{ Wm}^{-2}$, Sonne 60°) relativ gering ist (Döhning et al.,

1994). 32 h nach Behandlungsbeginn bzw. 3 h nach Beendigung der zweiten fünfständigen Behandlungsperiode war bei cv. Bel W3 ab Blatt 4 sowohl nach Ozonbehandlung wie auch nach kombinierter Behandlung mit Ozon und UV-B eine starke (vier- bis zwölffache) Induktion der β -1,3-Glucanase zu beobachten. Eine Aktivitätssteigerung ergab sich auch bei cv. Bel B (maximal fünffach). Bei Kombination von Ozon und UV-B war sie bei den Blättern 4 und 5 etwas stärker ausgeprägt als nur auf Ozon hin. UV-B allein führte zu keinen bzw. nur zu geringfügigen Effekten, so z.B. bei den älteren Blättern (6 und 7) des Kultivars Bel W3 zu einer leichten Aktivitätserhöhung der β -1,3-Glucanase (bis zu 1.9fach).

4.3. Immunologischer Nachweis von β -1,3-Glucanase und Chitinase

Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern (vgl. 3.2.1.) wurde untersucht, welchen Einfluß Expositionen mit Ozon, mit UV-B bzw. mit Ozon und UV-B (s. Abb. 34, V 62) auf die Konzentrationen der Proteine Chitinase (basische Isoformen, 32 und 34 kDa) und β -1,3-Glucanase (basische Isoform bei 33 kDa und/oder saure Isoform bei 36 kDa) haben. Die Proteinmengen der Enzyme wurden mit Hilfe der „Sandwich“-ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)-Technik ermittelt, die bei II. 12.2. detailliert mit Abbildungen der entsprechenden Eichkurven (II.12.2., Abb. 9 a und b) beschrieben ist.

Abb. 38 zeigt, daß das Verhalten der β -1,3-Glucanase-Proteinmengen 32 h nach Beginn der verschiedenen Behandlungen deutliche Parallelen zu den entsprechenden Aktivitätswerten (Abb. 37) aufweist. Dies spricht für die Induktion einer de-novo Synthese des Enzyms β -1,3-Glucanase, die durch Ozon ausgelöst und durch UV-B modifiziert wird. Dabei ergab sich 32 h nach Behandlungsbeginn bei cv. Bel W3 durch Ozon allein sowie durch Ozon und UV-B eine drastische Erhöhung der β -1,3-Glucanase Proteinmenge (bis zu 70fach). Bei cv. Bel B war eine bis zu 11fache Erhöhung der β -1,3-Glucanase Proteinmenge durch Ozon bzw. durch Ozon und UV-B zu verzeichnen. Die kombinierte Behandlung von Ozon und UV-B führte generell zu keinen wesentlichen Veränderungen der Ozon-abhängigen Induktion der β -1,3-Glucanase. UV-B allein bewirkte nur in den älteren Blättern (Blatt 6 und 7, cv. Bel W3) eine Steigerung der β -1,3-Glucanase Proteinmenge (bis zu 19fach).

Wie in Abb. 38 gezeigt, wurden die Chitinase Proteinkonzentrationen nur bei ozonbehandelten cv. Bel W3 Pflanzen deutlich (bis zu siebenfach) erhöht.

Im Gegensatz zur β -1,3-Glucanase wurde die Chitinase Proteinmenge bei kombinierter Behandlung mit Ozon und UV-B im Vergleich zu alleiniger Ozonbehandlung signifikant (Blätter 4-7, $P < 0.05$) reduziert. Es war jedoch immer noch zwei- bis dreifach soviel Chitinase-Protein vorhanden wie bei den Kontrollen.

Bei cv. Bel B war keine Reaktion der Chitinase Proteinmenge auf Ozon, UV-B bzw. Ozon und UV-B zu erkennen.

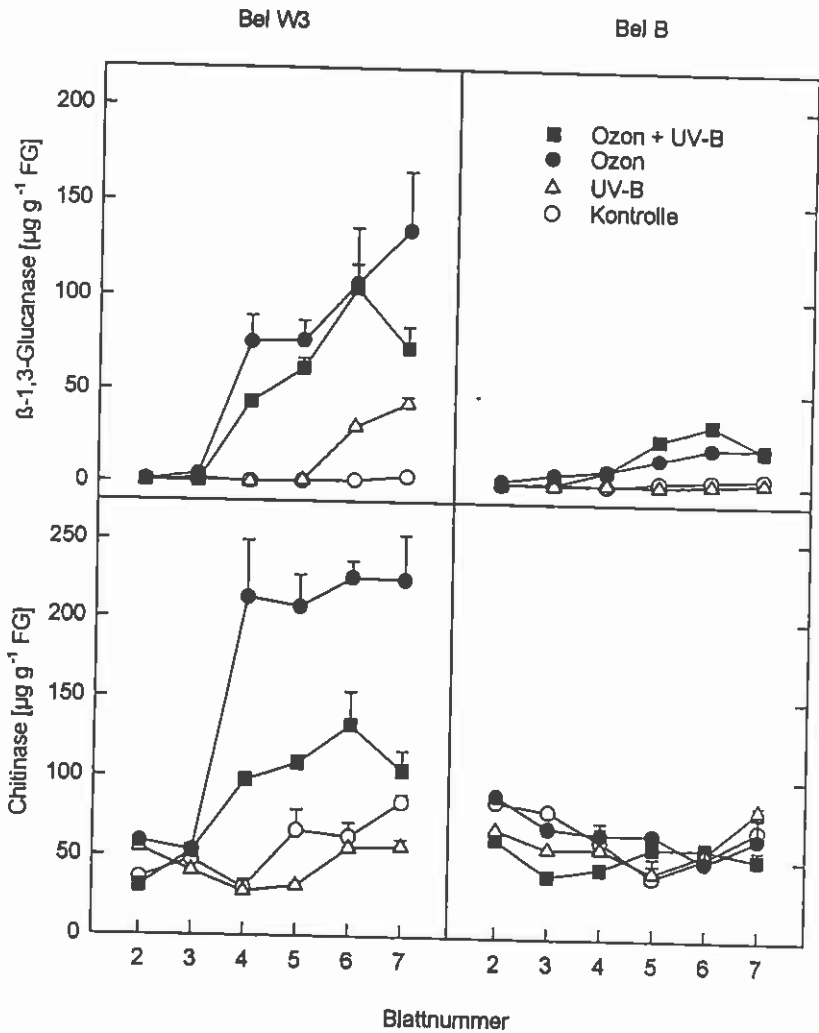


Abb. 38 β -1,3-Glucanase- und Chitinase-Proteingehalt, 32 h nach Behandlungsbeginn. Die Tabakpflanzen wurden jeweils 2x5 h an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit Ozon (160 nl/l), mit UV-B (0.67 MED/h), mit Ozon (160 nl/l) und UV-B (0.67 MED/h) bzw. mit Reinluft behandelt; links: cv. Bel W3; rechts: cv. Bel B. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von Blättern jeweils dreier Parallelpflanzen ($n=3$)

Western blot Analysen mit den erwähnten Antikörpern gegen Chitinase und β -1,3-Glucanase (s. 3.2.1.) bestätigten diese Ergebnisse.

Dabei konnte auf Ozonbehandlung hin bei cv. Bel W3 eine deutliche Induktion der beiden basischen Chitinase Isoformen von 32 und 34 kDa (Keefe et al., 1990) beobachtet werden (Abb. 38). Zusätzliche UV-B Behandlung führte zu einer Abschwächung vor allem der 34 kDa Bande. Bei alleiniger UV-B Behandlung und bei der Kontrolle waren keine Chitinase-Banden sichtbar.

Bei cv. Bel B war bei keiner Behandlung eine Chitinase Isoform zu detektieren.

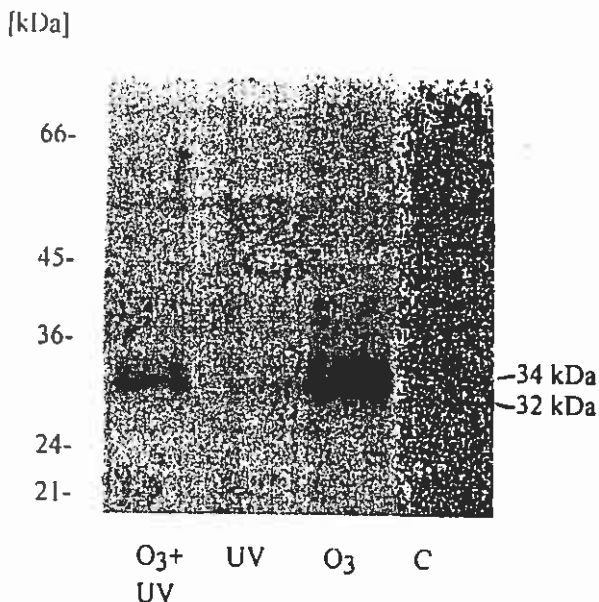


Abb. 39: Western blot Analyse von basischen Chitinase Isoformen in Gesamtblattextrakten (Blattnummer 5) von Tabakpflanzen (cv. Bel W3, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Es wurden je 30 μ g Protein eingesetzt; M, Molekulargewichtsmarker; O₃, Ozonbehandlung (160 nl/l, 2x5 h); UV, UV-B Behandlung (0.67 MED/h, 2x5 h); O₃ + UV, Ozon (160 nl/l, 2x5 h) - und UV-B (0.67 MED/h, 2x5 h) -Behandlung; C, Kontrolle

Die Resultate einer Inkubation von Gesamtblattextrakten mit Antikörpern, die mit der basischen Isoform der β -1,3-Glucanase bei 33 kDa und der sauren Isoform bei 36 kDa reagieren (Neuhaus et al., 1992), sind in Abb. 40 dargestellt.

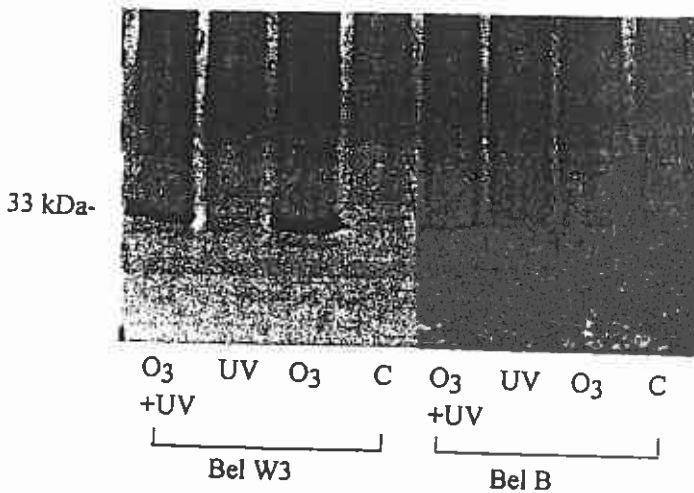


Abb. 40: Western blot Analyse des Enzyms β -1,3-Glucanase in Gesamtblattextrakten (Blattnummer 5) von Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Es wurden je 30 μ g Protein eingesetzt; O₃, Ozonbehandlung (160 nl/l, 2x5 h); UV, UV-B -Behandlung (0.67 MED/h, 2x5 h); O₃ + UV, Ozon (160 nl/l, 2x5 h)- und UV-B (0.67 MED/h, 2x5 h) - Behandlung; C, Kontrolle

Die Ergebnisse passen wiederum gut mit den gemessenen Proteinmengen zusammen (Abb. 38). Auf kombinierte Behandlung mit Ozon und UV-B sowie auf Behandlung mit Ozon allein war bei cv. Bel W3 jeweils eine stark ausgeprägte Bande bei 33 kDa zu erkennen. Diese war bei Ozonbehandlung noch etwas stärker ausgeprägt als bei Ozon- und UV-B- Exposition (vgl. Proteinmenge, Abb. 38). Nur UV-B behandelte Pflanzen wiesen genauso wie die Kontrollpflanzen keine induzierte 33 kDa Bande auf. Bei cv. Bel B war die Induktion wesentlich schwächer (vgl. Proteinmenge, Abb. 38). Nur bei gleichzeitiger Ozon- und UV-B Behandlung war eine deutliche β -1,3-Glucanase-Bande bei 33 kDa zu erkennen. Bei alleiniger Ozonbehandlung war nur eine sehr geringe Proteinmenge der β -1,3-Glucanase Isoform von 33 kDa detektierbar. UV-B - sowie Reinluftbehandlung hatten keinen Einfluß auf die Menge an basischem β -1,3-Glucanase Protein (33 kDa).

4.4. Effekte von erhöhtem CO₂ auf die Enzymaktivität der β -1,3-Glucanase

Um die Wirkungen von erhöhtem CO₂ mit den Effekten von erhöhtem Ozon und UV-B vergleichen zu können, wurden Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) 24 h lang kontinuierlich mit $1820 \pm 5 \mu\text{l/l}$ CO₂ behandelt, während entsprechende Kontrollpflanzen in Reinsluft ($370 \pm 2 \mu\text{l/l}$ CO₂) gehalten wurden (s. Abb. 41).

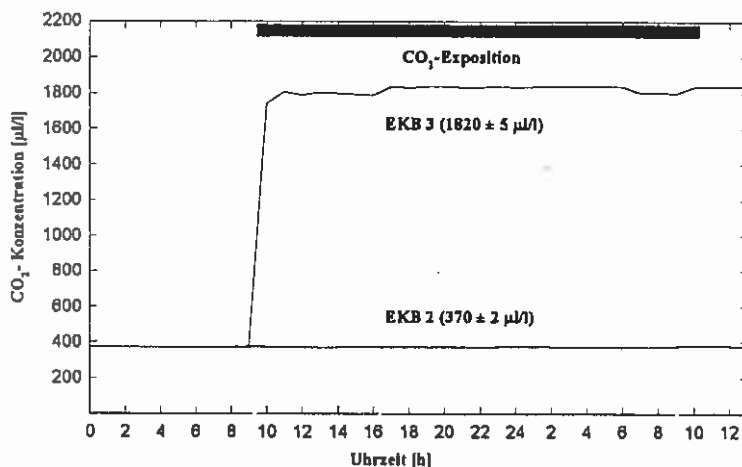


Abb. 41: CO₂-Dosierung in EKB 3 (erhöhtes CO₂) und EKB 2 (Kontrolle). EKB, Expositions-kammerbereich

Unmittelbar nach Behandlungsende wurde die Aktivität der β -1,3-Glucanase bei den Blättern 1-5 im Vergleich zu den Kontrollen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abb. 42 dargestellt. Bei beiden Tabakkultivaren (cv. Bel W3 und Bel B) beeinflussten erhöhte CO₂-Konzentrationen ($1820 \mu\text{l/l}$) die Enzymaktivität der β -1,3-Glucanase nicht bzw. reprimierten sie sogar geringfügig im Vergleich zu den Kontrollen ($370 \mu\text{l/l}$) (s. Abb. 42).

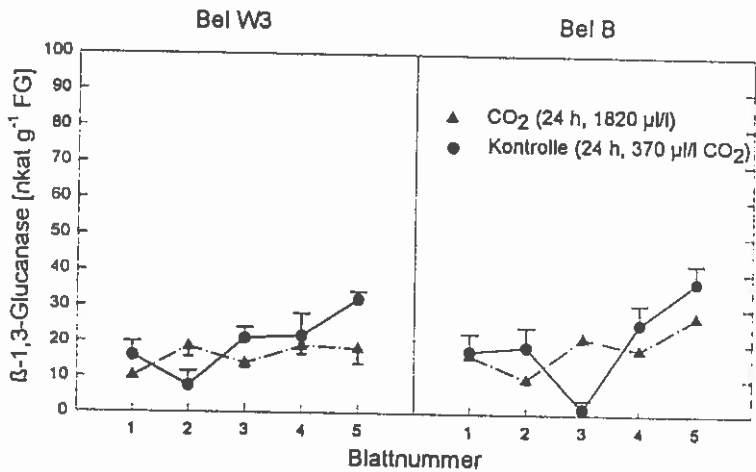


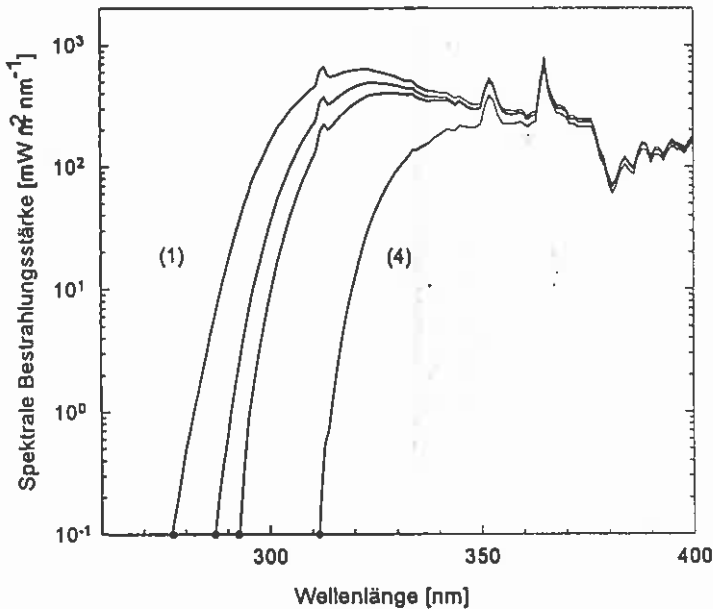
Abb. 42: Enzymatische Aktivität der β -1,3-Glucanase (cv. Bel W3 und Bel B) 24 h nach Behandlungsbeginn mit erhöhtem CO_2 (1820 $\mu\text{l/l}$) im Vergleich zu Kontrollpflanzen (370 $\mu\text{l/l}$). Es wurden von jeder Probe drei Parallelmessungen vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von insgesamt neun Parallelmessungen von jeweils drei Parallelpflanzen.

5. UV-B abhängige Veränderungen (Morphologie, Biochemie)

5.1. Variation der spektralen Bestrahlungsstärke

Bei UV-B Behandlungen von Pflanzen und der Einschätzung ihrer Wirkung ist grundsätzlich die spektrale Bestrahlungsstärke [$\text{mW m}^{-2} \text{nm}^{-1}$] im UV-B Bereich zu berücksichtigen. Diese wurde in einem Versuch im Sonnensimulator der GSF-Phytotronanlage (Payer et al., 1994) mit Hilfe von vier verschiedenen Filteranordnungen (Sanalux + Plexiglas, Sanalux + Sanalux, Sanalux + Pyran, Sanalux + Fensterglas) variiert, was sich in unterschiedlichen cut-off Wellenlängen widerspiegelte. Darunter versteht man die Schnittpunkte der Spektren bei $10^{-1} \text{mW m}^{-2} \text{nm}^{-1}$ Bestrahlungsstärke mit der Abszisse (Wellenlänge) (Döhning et

al., 1996). Diese lagen bei 277 nm, 287 nm, 293 nm und 312 nm (s. Abb. 43). Sechs Wochen alte Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B) wurden im Sonnensimulator (Seckmeyer und Payer, 1993) zunächst vier Tage lang an höhere Lichtintensitäten adaptiert, bevor die UV-Behandlung gestartet wurde. Dann wurden sie für 3x5 h (jeweils von 9.00 bis 14.00 h) an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit UV-Licht behandelt. Die entsprechenden Strahlungsspektren sind in Abb. 43 dargestellt.



Filteranordnungen:

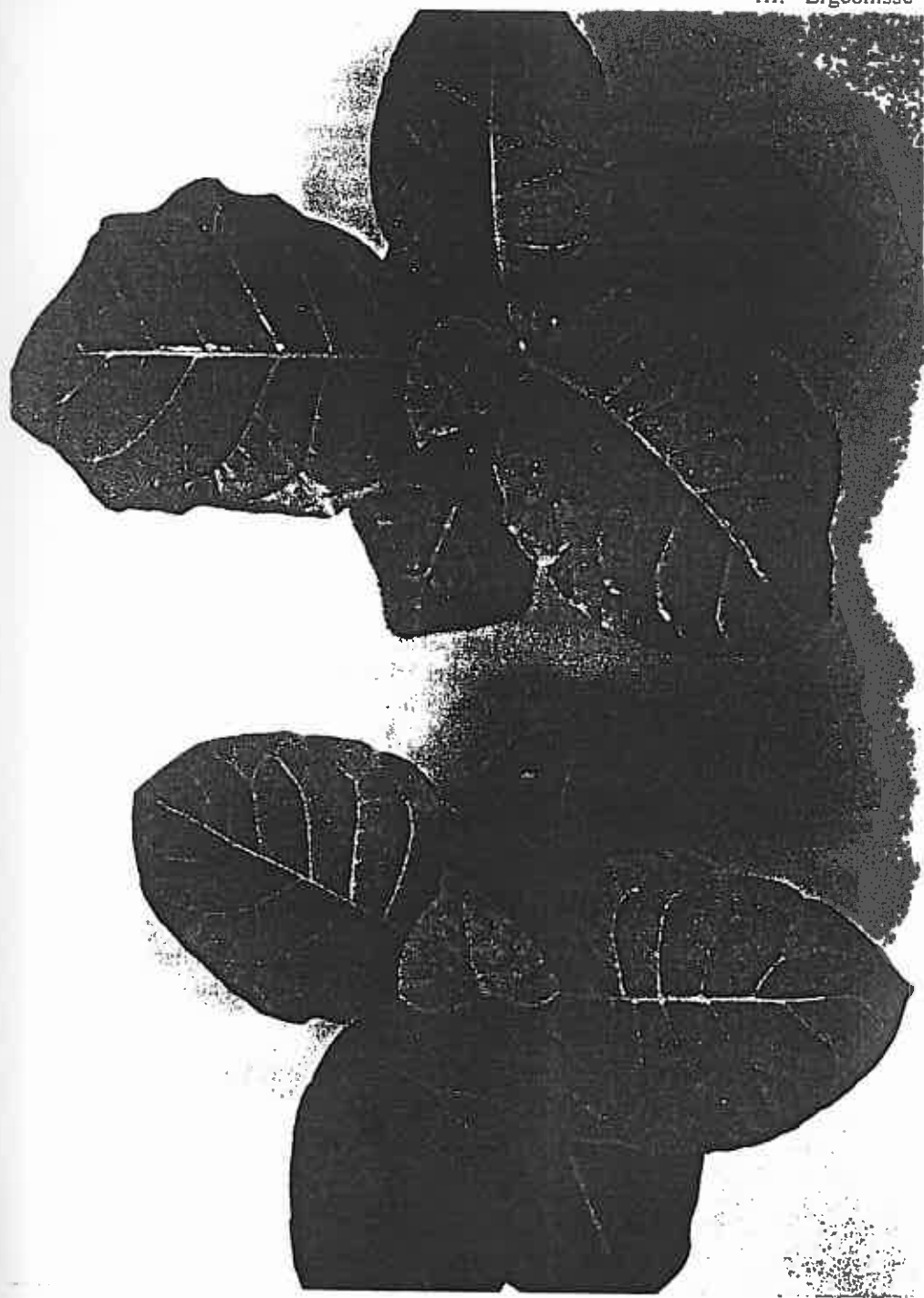
- (1) Sanalux + Plexiglas (cut-off bei 277 nm)
- (2) Sanalux + Sanalux (cut-off bei 287 nm)
- (3) Sanalux + Pyran (cut-off bei 293 nm)
- (4) Sanalux + Fensterglas (cut-off bei 312 nm)

Abb. 43: Strahlungsspektren bei Einsatz verschiedener Kantenfilter (1-4). Die Spektren wurden mit Hilfe eines Bentham Doppel-Monochromator Spektroradiometers gemessen (Thiel et al., 1996). Die Schnittpunkte bei $10^{-1} \text{ mW m}^{-2} \text{ nm}^{-1}$ Bestrahlungsstärke sind bei den verschiedenen Kantenfiltern unterschiedlich und als „cut-off“-Wellenlängen angegeben (Döhning et al., 1996).

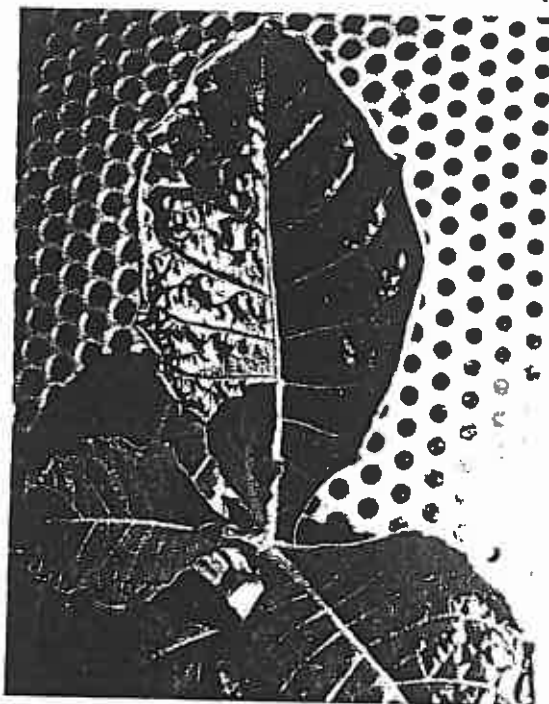
5.2. Symptome bei verschiedenen UV-B Bestrahlungsstärken

Symptome wurden bei beiden Kultivaren nur bei 287 nm und 277 nm beobachtet. Diese äußerten sich nach UV-Exposition (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) in glänzenden Blattoberflächen, aufgewölbten Interkostalfeldern und eingerollten Blatträndern (s. Abb. 44). Der bei allen Blättern zu beobachtende ausgeprägte Blattglanz nach Behandlung mit 287 nm oder 277 nm ist besonders gut im Vergleich zu den matten Blättern von Pflanzen, die bei 312 nm exponiert wurden, zu erkennen (Abb. 44 a). Er ist vermutlich auf Veränderungen der zellulären Wasserverteilung und damit der Licht-Reflexions-Eigenschaften der Blattoberfläche zurückzuführen. Das Einrollen der Blattränder verstärkte sich von einer Wellung unmittelbar nach Behandlungsende bis hin zum vollständigen Einrollen bei Weiterkultivierung UV-behandelter Pflanzen (48 h später) (s. Abb. 44 b). Etwas ältere Blätter (ab Blatt 3) entwickelten außerdem eine dunkle netzartige Pigmentierung (s. Abb. 44 c).

Geerntet wurden von den nach der Behandlung sieben Wochen alten Tabakpflanzen die Blätter 2 und 3, die sich kurz vor der maximalen Expansion befanden. Die Symptome traten bei dem jüngeren Blatt 2 intensiver auf als bei Blatt 3 (s. Tab. 8). Blattglanz und Aufwölbung der Interkostalfelder waren bei 277 nm öfter zu beobachten als bei den bei 287 nm exponierten Pflanzen (s. Tab. 8). Die beiden Kultivare zeigten hinsichtlich der Symptome Blattglanz, aufgewölbte Blattränder und Interkostalfelder keine gravierenden Unterschiede. Während bei 277 nm auch der Prozentsatz der dunkel pigmentierten Blattflächen bei beiden Kultivaren annähernd gleich war, wies Bel W3 bei 287 nm im Vergleich zu Bel B mehr pigmentierte Stellen auf (Tab. 8).



b



c



Abb. 44: Symptome nach UV-Behandlung (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) von Tabak (cv. Bel W3). (a), (b), (c) 287 nm; (a) Aufsicht auf zwei Pflanzen, die mit 287 nm (oben) bzw. 312 nm (unten) behandelt wurden, $\pm$ Blattglanz, unmittelbar nach Behandlungsende; (b) Blatt 4 (Mitte), 48 h nach Behandlungsende ($\cong$ Blatt 2 unmittelbar zu Behandlungsende) mit glänzender Blattoberfläche, aufgewölbten Interkostalfeldern und eingerollten Blatträndern; (c) Blatt 3 (Mitte), unmittelbar nach Behandlungsende mit dunkler netzartiger Pigmentierung

Tab. 8: Blatt-Symptome nach UV-Behandlung (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) von Tabak (cv. Bel W3 und cv. Bel B) in Abhängigkeit von der spektralen Bestrahlungsstärke. Es wurden jeweils drei Pflanzen parallel exponiert. Die Symptome wurden unmittelbar nach Behandlungsende bonitiert; Häufigkeit: Angabe in % der Parallelpflanzen mit Symptom

Cut-off Wellen- länge [nm]	Kultivar	Blatt-Glanz		aufgerollte Blattränder		aufgewölbte Interkostalfelder		Pigmentierung [% der Blatt- fläche; Mittelwert]	
		[Häufigkeit]		[Häufigkeit]		[Häufigkeit]		[Häufigkeit]	
		Blatt 2	Blatt 3	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 2	Blatt 3	Blatt 2	Blatt 3
277	Bel W3	100	33	100	0	100	0	43	20
	Bel B	100	100	100	0	100	0	48	15
287	Bel W3	66	66	100	0	100	0	57	16
	Bel B	66	0	66	0	100	0	8	0
293	Bel W3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bel B	0	0	0	0	0	0	0	0
312	Bel W3	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bel B	0	0	0	0	0	0	0	0

5.3. Aktivität der Enzyme β -1,3-Glucanase und Chitinase

Welche Effekte eine Behandlung von Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und cv. Bel B) mit UV-B (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) unter Einsatz verschiedener Glasfiltertypen (s. Abb. 43) auf die Enzyme β -1,3-Glucanase und Chitinase hat, wurde durch Messung der entsprechenden Enzymaktivitäten untersucht. Die Details der Aktivitätsbestimmung der β -1,3-Glucanase sind in II.8.2. und in III.4.2. beschrieben.

UV-B Behandlung (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) führte zu einer ausgeprägten, in etwa gleich starken Induktion der β -1,3-Glucanase bei cut-off Wellenlängen von 287 nm und 277 nm, aber zu keiner Reaktion bei 293 nm und darüber (cv. Bel W3 und Bel B, s. Abb. 45). Die Induktion war bei Blatt 3 genauso wie bei Blatt 2 zu beobachten und war unabhängig davon, daß das 3. Blatt wesentlich weniger häufig Symptome zeigte (vgl. Tab. 8).

Die β -1,3-Glucanase Aktivität war bei 287 nm bei den Blättern 2 und 3 von cv. Bel W3 ca. 4.5fach erhöht im Vergleich zu 293 nm. Bei cv. Bel B ließ sich eine 10fache (Blatt 2) bzw. 5fache (Blatt 3) Induktion der β -1,3-Glucanase-Aktivität beobachten.

Die Aktivitätsbestimmung des Enzyms Chitinase ist in II. 8.3. ausführlich beschrieben. Als Substrat wurde eine Lösung von Carboxymethylchitin-Remazol-Brilliant-Violett verwendet. Die enzymatische Reaktion erfolgte während einer 10minütigen Inkubationsphase bei 37°C. Sie wurde durch Zusetzen von HCl abgestoppt. Durch den enzymatischen Abbau entstanden wasserlösliche Chitin-Oligomere, die photometrisch nach Wirth und Wolf (1990) und Vogelsang und Barz (1993) detektiert wurden. Von jedem Extrakt wurden drei Parallelansätze gemessen. Aus der optischen Dichte mit Enzym und ohne Enzym (Nullwert) wurde die Differenz gebildet ($\Delta OD_{550 \text{ nm}}$). Die Chitinase-Aktivität wurde nach Vogelsang und Barz (1993) berechnet, wobei 1 Unit als $\Delta OD_{550 \text{ nm}} \text{ ml}^{-1} \text{ min}^{-1}$ definiert wurde.

Die Chitinase-Aktivitätswerte ließen ebenfalls eine Induktionsschwelle erkennen, die bei 287 nm lag (s. Abb. 46). Bei Behandlung mit UV-Strahlung der cut-off Wellenlängen 287 nm und 277 nm war bei beiden Kultivaren eine deutliche Aktivitätserhöhung zu beobachten, bei 293 nm und darüber erfolgte keine Reaktion.

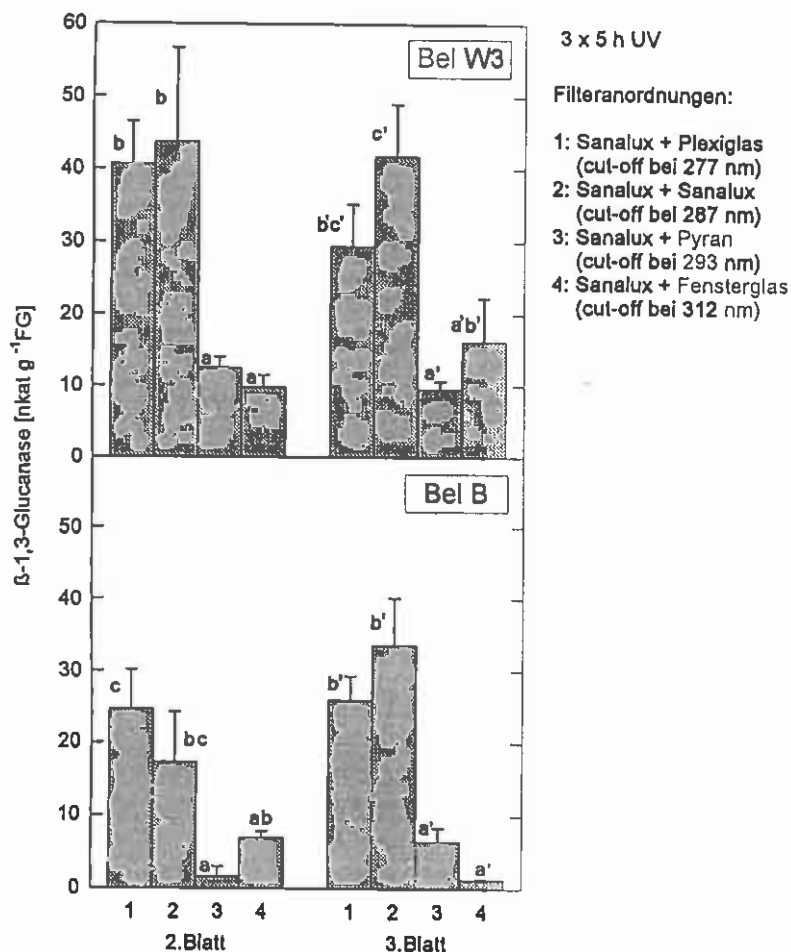


Abb. 45: Enzymaktivität der β -1,3-Glucanase nach UV-Behandlung (3x5 h) von Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B). Es wurden verschiedene Kantenfilter eingesetzt (1-4). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von Blättern dreier Parallelpflanzen (n=3). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($P < 0.05$; Duncan's Multiple Range Test).

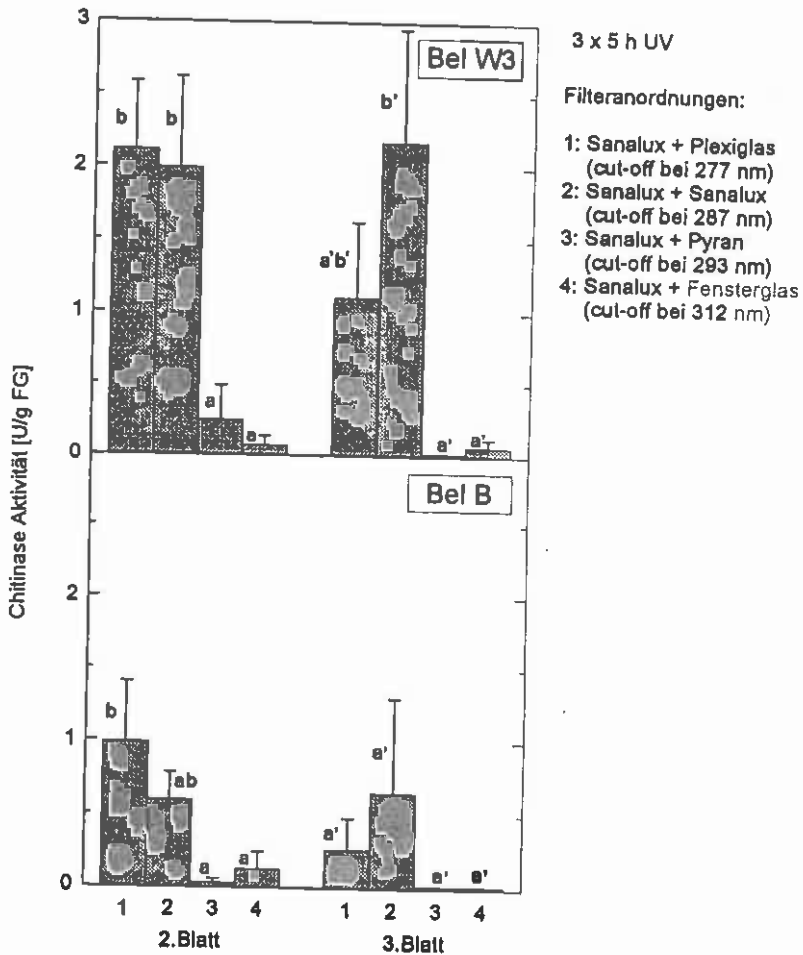


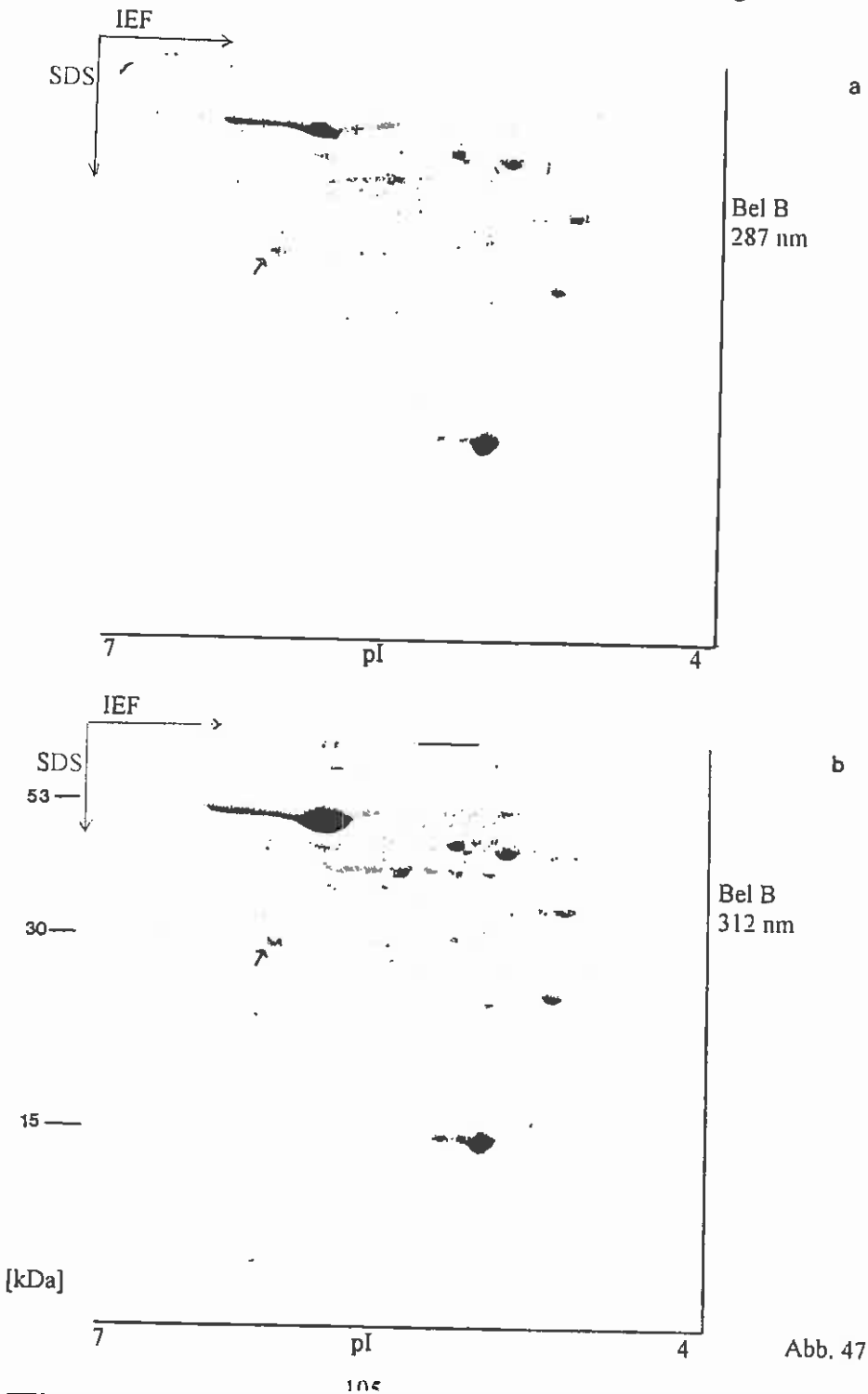
Abb. 46: Enzymaktivität der Chitinase nach UV-Behandlung (3x5 h) von Tabakpflanzen (cv. Bel W3 und Bel B). Es wurden verschiedene Kantenfilter eingesetzt (1-4) Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. von Blättern dreier Parallelpflanzen (n=3). Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($P < 0.05$; Duncan's Multiple Range Test).

5.4. Proteinmuster und Sequenzierungsergebnisse von Gesamtblattextrakten nach UV-B Behandlung verschiedener Bestrahlungsstärke

Um einen Einfluß verschiedener spektraler Bestrahlungsstärken (s. 5.1.) auf das Proteinmuster von Gesamtblattextrakten detektieren zu können, wurde pulverisiertes Blattmaterial phenolisch extrahiert und zweidimensional (Isoelektrische Fokussierung in der 1. Dimension, SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese in der 2. Dimension) aufgetrennt (vgl. 3.2.2.). Von jeder Probe wurden vier 2D-Auftrennungen parallel durchgeführt, um für Sequenzierungszwecke ausreichende Proteinmengen zu erhalten. Der Bereich zwischen pH 4-7 wurde analog zu den 2D-Auftrennungen von Proteinen ozonbehandelter Pflanzen (s. 3.2.2.) gewählt. Die Proteine auf den 2D-Gelen wurden mit Coomassie-Blau angefärbt und quantitative Unterschiede densitometrisch erfaßt. Als „Molekulargewichtsmarker“ diente die große Untereinheit des Enzyms Rubisco (s. z.B. Abb. 47 b). Die Ergebnisse sind in Abb. 47 und Abb. 48 dargestellt. Die Proteinmuster von cv. Bel B bei 287 nm und 312 nm waren äußerst ähnlich und wiesen im für Sequenzierungszwecke bedeutsamen Coomassie-Färbereich keine qualitativen Unterschiede auf (Abb. 47, S. 100). Bei cv. Bel W3 war ein Protein von 30 kDa (IEP ca. 6.0) bei der cut-off Wellenlänge 287 nm im Vergleich zu 312 nm induziert (Anreicherung um den Faktor 2, Abb. 48 a und b, S. 101). Der gleiche Proteinspot war auch bei Behandlung mit UV-Strahlung der cut-off Wellenlänge 293 nm detektierbar (Abb. 48 c, S. 102) und wurde in Analogie zu den O₃-related Proteinen als UV-related bezeichnet (UVR-1). Das gleiche Protein war bei cv. Bel B unabhängig von der Behandlung stets in gleicher Intensität vorhanden. Der Proteinspot wies hinsichtlich seiner Lage (IEP ca. 6, 30 kDa) innerhalb des 2D-Proteinmusters große Ähnlichkeit zu dem Protein O₃R-6 auf (s.3.2.2. und 3.2.3.), das bei unbehandelten cv. Bel B Pflanzen (im Gegensatz zu cv. Bel W3 Pflanzen) auftrat und durch Ozon reprimiert wurde (vgl. Abb. 32).

Abb. 47: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in Gesamtblattextrakten mittelalter Blätter (cv. Bel B, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung der Proteine erfolgte auf einem 18 %igen SDS-Polyacrylamidgel. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. pI, isoelektrischer Punkt. Die Tabakpflanzen waren mit UV-Strahlung unterschiedlicher cut-off Wellenlängen behandelt worden (3x5 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen); cut-off Wellenlänge (a) 287 nm, (b) 312 nm

Abb. 48: Zweidimensionale Auftrennung von Proteinen in Gesamtblattextrakten mittelalter Blätter (cv. Bel W3, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Übrige Parameter s. Abb. 46; (a) cut-off Wellenlänge 287 nm, (b) cut-off Wellenlänge 312 nm, (c) cut-off Wellenlänge 293 nm



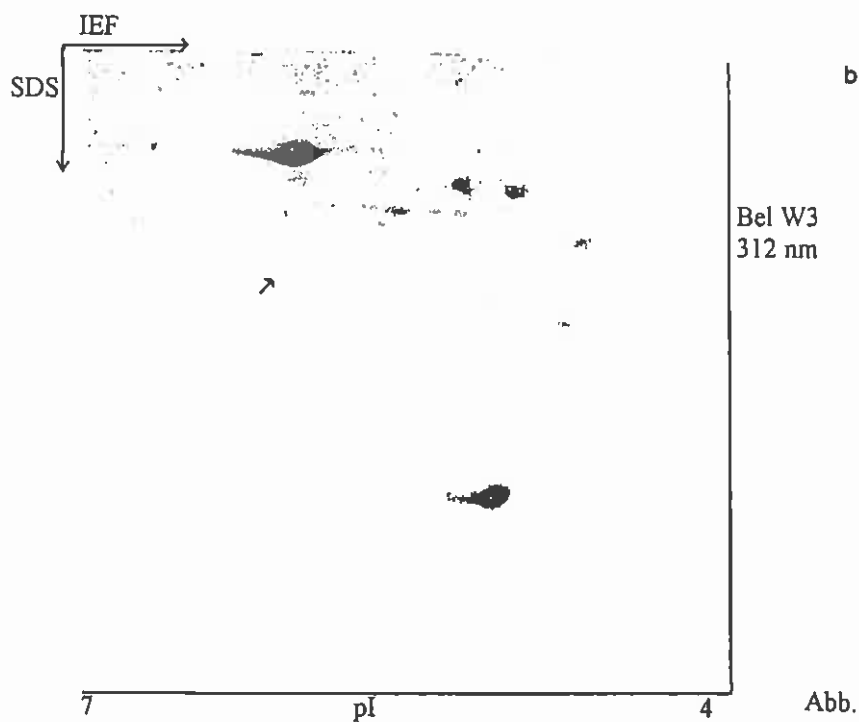
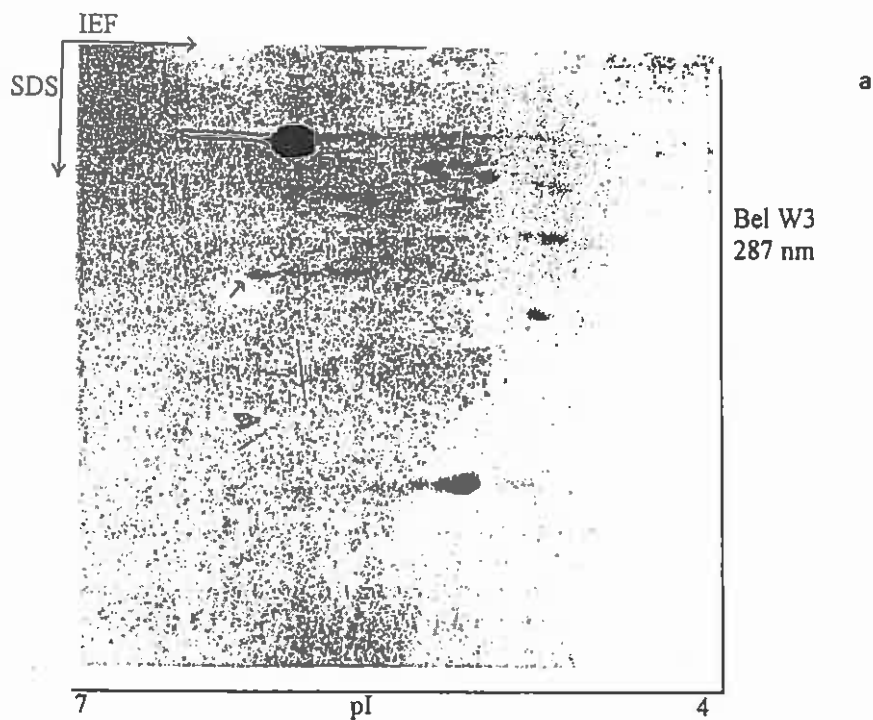


Abb. 48

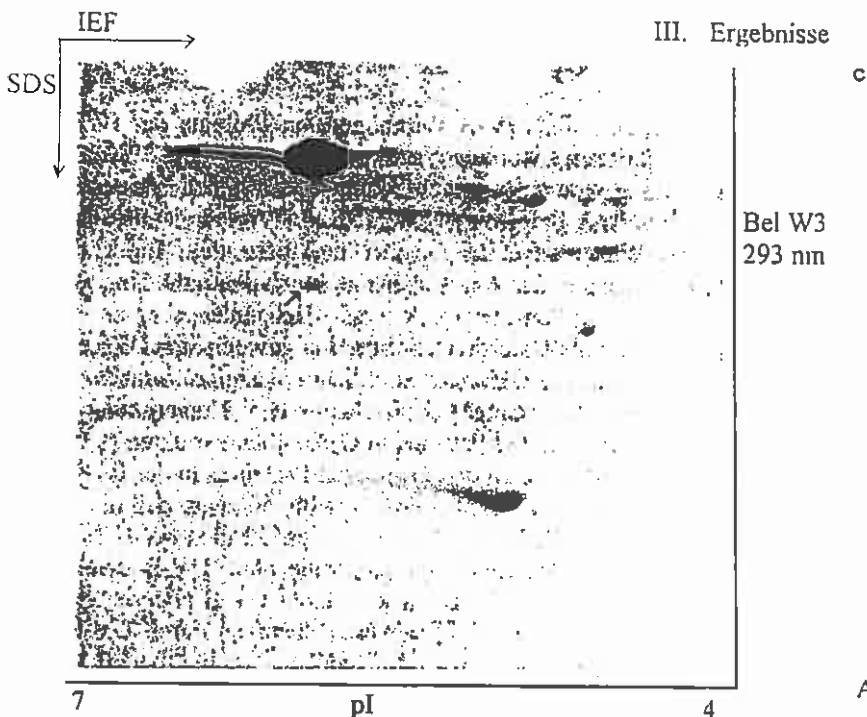


Abb. 48

Die Ergebnisse der Mikrosequenzanalyse des UVR-1 Proteins sind in Abb. 49 dargestellt. Es wurden insgesamt vier Peptidaminosäuresequenzen (a-d) ermittelt. Die identifizierten Peptidsequenzen des UVR-1 Proteins stimmen mit Teilpeptidsequenzen (ca. 9 % der Gesamtsequenz) der Carboanhydrase [4.2.1.1.] aus *Nicotiana tabacum* L. (Majeau und Coleman, 1992) völlig überein (Homologievergleiche s. IV., Abb. 58).

a

	132	139
UVR-1	.. N P A L Y G E L ..	

b

	204	211
UVR-1	.. V E N I V V I G ..	

c

	241	246
UVR-1	.. I G L P A K ..	

d

	312	319
UVR-1	.. E F G L S P S L ..	

Abb. 49: Aminosäuresequenzen der durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide (a-d) des UVR-1 Proteins

5.5. Proteinmuster der IWF

Um Starklichteffekte und UV-B Wirkungen auf Proteine der IWF differenziert betrachten zu können, wurden Tabakpflanzen (cv. Bel W3) einerseits im Sonnensimulator unter Starklichtbedingungen nach einer neuntägigen Adaptationsphase mit bzw. ohne UV-B (3x6 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen; cut-off Wellenlänge bei ca. 291 nm) behandelt. Ein anderer Teil der Tabakpflanzen wurde in der Anzuchtskammer gehalten und dann gleichzeitig mit den Sonnensimulatorpflanzen 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet. Die Auftrennung der mittels Unterdruck-Infiltration gewonnenen IWF erfolgte mittels SDS-PAGE. Proteine, die UV- oder Starklicht-abhängige Veränderungen zeigten, wurden als UVR (UV-related) bezeichnet. Die Numerierung wurde unter Einbeziehung des UV-related Proteins in Gesamtblattextrakten (s. 5.4., Abb. 48) fortgeführt und in Analogie zu den O₃-related Proteinen in der IWF (s. 3.1.) nach aufsteigendem Molekulargewicht geordnet. Abb. 50 zeigt, daß die Proteinbanden in der IWF mittelalter Blätter im Bereich von ca. 33 kDa bis 42 kDa nach 3x6 h UV-B Behandlung im Vergleich zur Kontrolle ohne UV-B deutlich reprimiert waren. Ein Protein von ca. 42 kDa wurde durch UV-B abgeschwächt (UVR-3). Ein anderes Protein bei ca. 33 kDa wurde ebenfalls durch UV-B Behandlung reprimiert (UVR-2). Es wurde jedoch auch bereits durch die Starklichtbedingungen im Sonnensimulator im Vergleich zur Anzuchtskammer abgeschwächt. Eine Proteinbande bei ca. 26 kDa trat nur unter den Starklichtbedingungen des Sonnensimulators auf und fehlte bei Anzuchtskammerbedingungen. Ähnlich verhielt sich ein Protein bei ca. 20 kDa, das bei Versuchspflanzen, die in der Anzuchtskammer kultiviert wurden, nur sehr schwach ausgeprägt war, während es im Starklicht des Sonnensimulators deutlich hervortrat. Durch UV-B Behandlung wurde es nicht beeinflusst. Dies war ein Hinweis dafür, daß Proteine bereits Reaktionen auf erhöhte Lichtverhältnisse (ohne UV-B Behandlung) zeigen können.

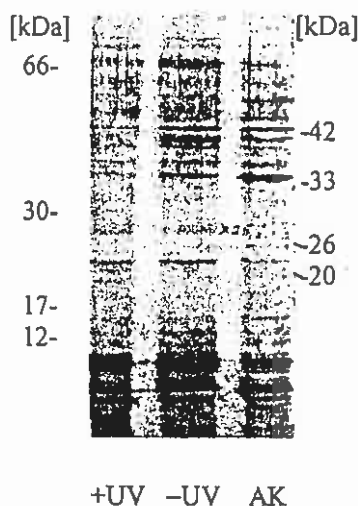


Abb. 50: SDS-PAGE-Auftrennung von Proteinen der interzellulären Waschflüssigkeit von mittelalten Tabakblättern (cv. Bel W3, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet). Die Auftrennung erfolgte auf einem 15 -18 %igen SDS-Polyacrylamid-Gradientengel. Pro Spur wurden je 10 µg IWF-Protein aufgetragen. Die Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. + UV / - UV, Pflanzen aus dem Sonnensimulator, die mit bzw. ohne UV-B (3x6 h, an drei aufeinanderfolgenden Tagen) behandelt wurden, AK, Pflanzen aus der Anzuchtskammer; UV-related Proteine markiert

6. Freilandversuche (Fürth/Odenwald)

In Ergänzung der Kammerexperimente wurden Freilandversuche in Kooperation mit der Universität Gießen (L. Grünhage und H.J. Jäger, Institut für Pflanzenökologie) durchgeführt. Dabei wurden Tabakpflanzen (cv. Bel W3) aus dem gleichen Samenmaterial wie bei den Klimakammerversuchen (1.-5.) verwendet (s. II.1.4.) und von Mai bis September 1994 für jeweils 14 d auf dem Versuchsfeld der Universität Gießen in Fürth/Odenwald unter Standard-Bedingungen für Bioindikatorpflanzen exponiert (s. Abb. 51). Bei diesem Kooperationsversuch war aus Platzgründen nur eine Exposition von Pflanzen des Kultivars Bel W3 möglich.



Abb. 51: Exposition von Tabakpflanzen (cv. Bel W3) im Freiland (Fürth/Odenwald)

Die Perioden überlappten sich um jeweils eine Woche, so daß insgesamt 15 Perioden à 14 d untersucht wurden (s. II.5., Abb. 6). Am Ende jeder Expositionsperiode wurden die Blattschäden bonitiert, die Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C für Analysezwecke gelagert. Für die biochemischen Analysen wurden nur mittelalte Blätter (4-6) verwendet. Es wurde die Aktivität des Enzyms β -1,3-Glucanase für alle Blätter bestimmt. Die Details der Aktivitätsbestimmung der β -1,3-Glucanase sind in II.8.2. und in III.4.2. beschrieben. Die Konzentrationen von ACC (1-Aminocyclopropan-1-Carboxylat) und MACC (N-malonyl-ACC) wurden für alle Expositionsperioden gemessen. Die Bestimmung erfolgte, wie bei Langebartels et al. (1991) beschrieben. Blattmaterial wurde unter flüssigem N_2 homogenisiert und mit Ethanol extrahiert. Das Pellet wurde nach Zentrifugation noch zweimal reextrahiert. Die Überstände wurden vereinigt und aufkonzentriert. Der Rest wurde in H_2O aufgenommen und mit CHCl_3 extrahiert. Die wäßrige Phase wurde *in vacuo* aufkonzentriert (bis zur Trockne) und in H_2O aufgenommen. Der ACC-Gehalt wurde nach Lizada und Yang (1979) bestimmt. Der MACC-Gehalt wurde nach einer sauren Hydrolyse der Ethanolextrakte mit HCl bestimmt, indem der ACC Wert der nicht-hydrolysierten Probe von dem ACC-Gehalt der hydrolysierten abgezogen wurde. Alle Bestimmungen wurden in mindestens drei Parallelansätzen durchgeführt. Die visuelle Einstufung der Blattschädigung erfolgte nach Langebartels et al. (1991) und Schraudner et al. (1992) in % zur Gesamtblattfläche. Die Pflanzen des Kultivars Bel W3 erwiesen sich im Freiland als sehr empfindlich gegenüber Ozon und zeigten während bestimmter Perioden Blattschäden von bis zu 60 % (der Gesamtblattfläche) (s. Abb. 52). Enzymaktivitäten der β -1,3-Glucanase wurden erstmals in mittelalten Blättern von Freilandpflanzen nachgewiesen. Sie waren (in Abhängigkeit von der Expositionsperiode und vom Blattalter) im Freiland deutlich induziert. Die Aktivitätswerte waren im Vergleich zu Klimakammerexperimenten bis zu dreifach erhöht (vgl. III.3.2.). Sie zeigten einen ähnlichen Verlauf wie die Blattschäden (s. Abb. 52). Die ACC- und MACC-Werte waren gegenüber Kammerversuchen ebenfalls erhöht. Die ACC-Gehalte verhielten sich nur in einer hochsommerlichen Peak-Episode Ende Juli/Anfang August wie die MACC-, β -1,3-Glucanase- und Blattschädigungs-Werte, ansonsten wiesen sie jedoch deutliche Unterschiede in Induktionsmaxima/minima auf (s. Abb. 52). In Abb. 52 sind die biochemischen Meßergebnisse zusammenfassend für die gesamte Freilandexpositionsphase 1994 (17.5.-6.9.94, Fürth/Odenwald) dargestellt. Es wurde jeweils das Datum in der Mitte der betreffenden 14tägigen Expositionsperiode angegeben. Über den gesamten Zeitraum von Mai bis September 1994 betrachtet waren Unterschiede der analysierten Parameter in Abhängigkeit von der Expositionsperiode zu beobachten (Abb. 52). Die Peak-Phasen traten nahezu simultan auf (s. z.B. 6., 9., 13. Expositionsperiode). Auch die Zeitpunkte der minimalen Werte stimmten oft überein (s. z.B. 4., 8., 11. Expositionsperiode).

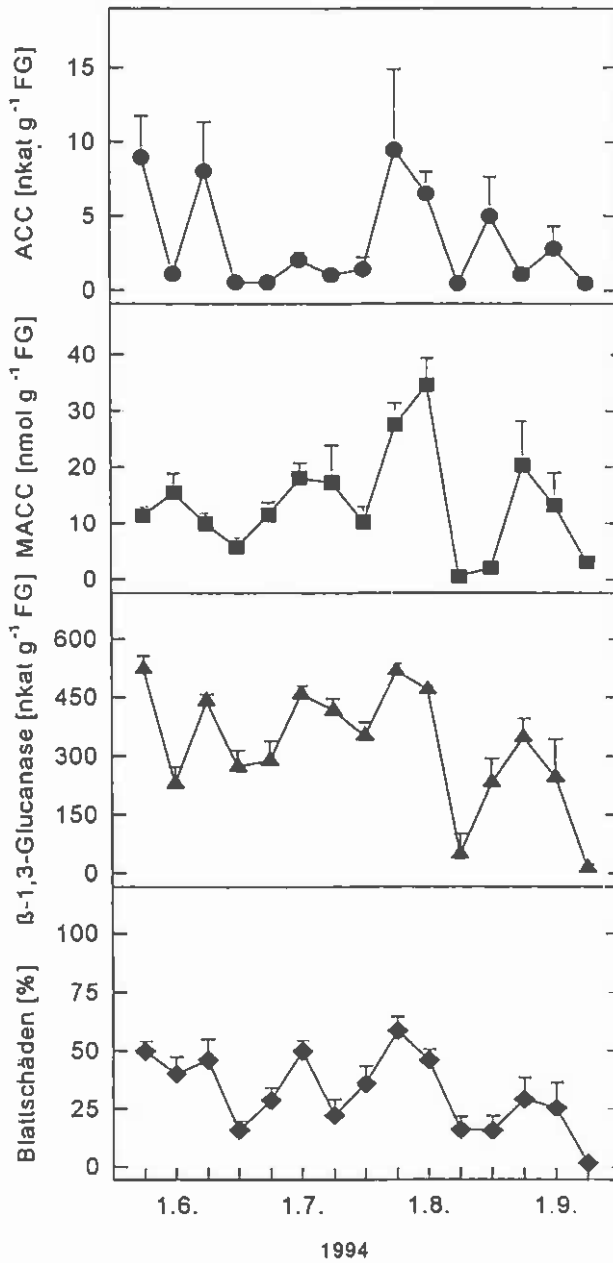
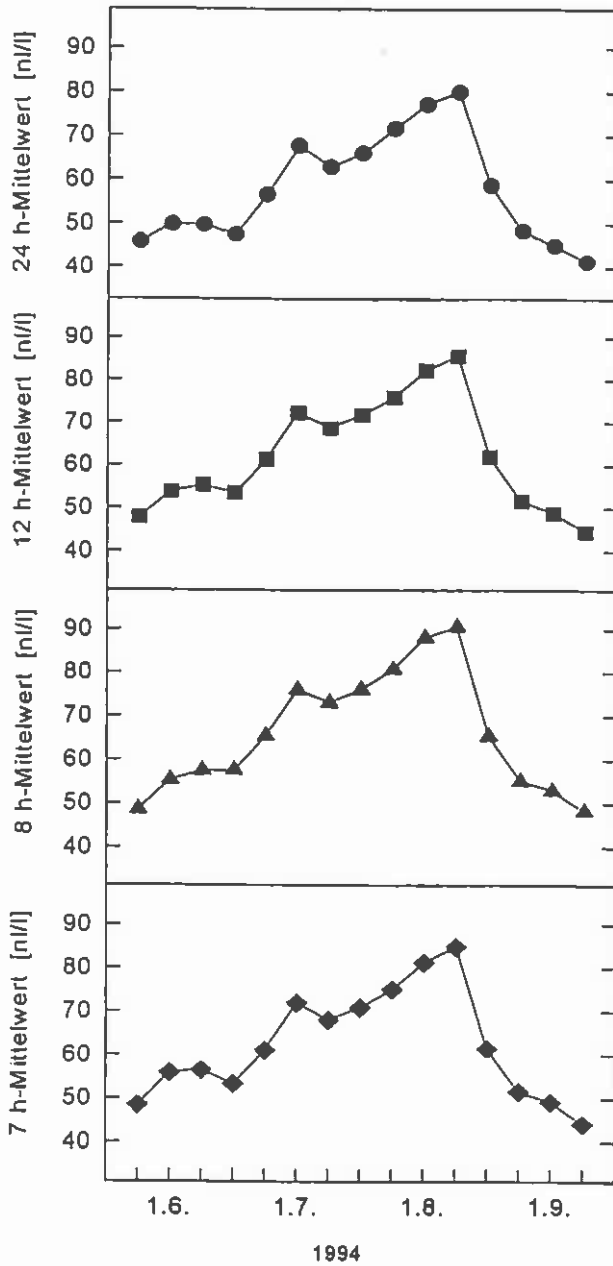


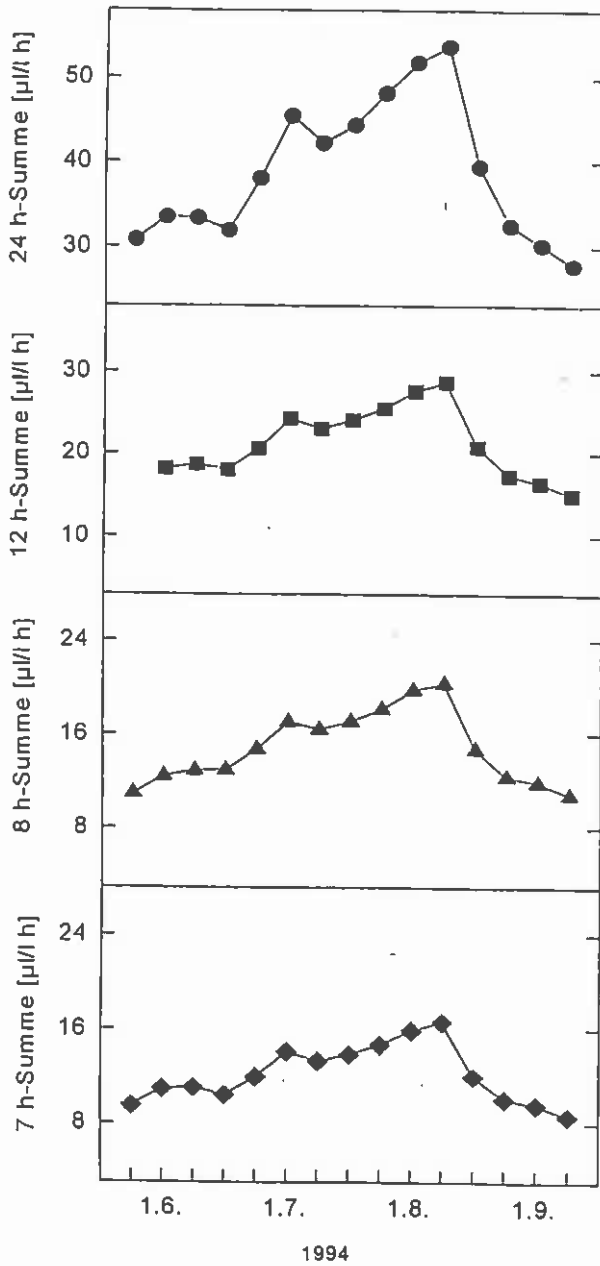
Abb. 52: Biochemische Meßergebnisse (ACC-, MACC-Konzentrationen, β -1,3-Glucanase Aktivitäten, bonitierte Blattschäden) während der Freilandexpositionsphase 1994 (Fürth/Odenwald). Von jeder Probe wurden drei Parallelmessungen vorgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ s.e. der mittelalten Blättern 4, 5 und 6 von jeweils drei Parallelpflanzen pro Periode. Zwei hochsommerliche Peak-Phasen sind gelb hinterlegt.

Die an der Freilandstation Fürth während der gesamten Expositionsphase gemessenen Ozonkonzentrationen wurden von Prof. H. J. Jäger und Dr. L. Grünhage (Institut für Pflanzenökologie, Universität Gießen) zur Verfügung gestellt. In Abb. 53 ist der Verlauf der Ozonwerte (24 h, 12 h, 8 h und 7 h - Mittelwerte und -Dosiswerte für jede 14tägige Expositionsperiode) von Mai bis September 1994 analog zur Abb. 52 dargestellt, so daß sich biochemische Meßergebnisse und Ozonkonzentrationen unmittelbar vergleichen lassen. Bei den Ozonmittelwerten (Abb. 53 a, S. 114) und den Ozondosis-Werten (Abb. 53 b S. 115) waren in den Sommermonaten zwei deutliche Ozon-Peak-Phasen (Juli, August) zu erkennen. Ein Vergleich des Verlaufs der gemessenen ambienten Ozonkonzentrationen mit dem Verhalten der biochemischen Meßparameter ergab, daß diese beiden Peak-Phasen auch im Verlauf der biochemischen Daten auftraten (Abb. 52, gelber Bereich). Deutliche Unterschiede traten aber z.B. bei den Expositionszeiträumen von ca. Mitte August bis Anfang September auf, bei denen biochemisch gesehen ein (bzw. zwei) Peak(s) zu erkennen ist (sind), während die Ozondaten sich im Minimum befanden. Umgekehrt waren in der Woche mit der höchsten Ozonbelastung (Anfang August) die biochemischen Parameter im Minimum. Dabei ist zu berücksichtigen, daß hohe Ozonkonzentrationen meist zusammen mit hohen Lufttemperaturen und niedrigen Luftfeuchtigkeitswerten auftraten (s. Tab. 9 und IV., S. 116).

Abb. 53: Ambiente Ozonkonzentrationen während der gesamten Freiland-expositionsphase 1994. Die Ozonwerte wurden an der hessischen Freilandstation in Fürth/Odenwald im Abstand von jeweils 30 min gemessen. Graphisch dargestellt sind (a) die Ozon-Mittelwerte, (b) die Ozon-Summen/Dosis-Werte für die einzelnen Expositionsperioden (jeweils 14 Tage); Die 12 h- bzw. 24 h-Werte beziehen sich auf Messungen zwischen 8.00 und 20.00 Uhr bzw. 8.00 des einen Tages bis 8.00 des nächsten Tages; Die 7 h- bzw. 8 h-Werte umfassen die Ozonmessungen zwischen 9.00 und 16.00 bzw. 17.00 Uhr.



b



Tab. 9: Temperatur und Luftfeuchtigkeit während der Freilandexpositionsphase 1994 in Fürth/Odenwald (Meßwerte vom Institut für Pflanzenökologie, Universität Gießen). rF, relative Luftfeuchtigkeit; mT, mittlere Temperatur; 24, 12, 7: 24 h, 12 h und 7 h Mittelwerte; die 12 h- bzw. 24 h-Messungen begannen jeweils um 8.00 Uhr; die 7 h- Werte umfassen die Messungen von 9.00 bis 16.00 Uhr; -, Messungen konnten aus technischen Gründen nicht erfolgen

Exposition	rF 24	rF 12	rF 7	mT 24	mT 12	mT 7
1	78,44	73,24	71,38	12,24	13,56	13,89
2 (1.6.)	-	-	-	-	-	-
3	71,47	62,36	60,28	12,79	14,74	15,06
4	71,47	62,19	62,20	14,18	16,41	16,50
5	64,66	56,71	56,39	18,28	20,75	20,90
6 (1.7.)	-	-	-	-	-	-
7	67,06	59,34	59,20	20,39	22,77	23,14
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-
10 (1.8.)	61,28	56,99	56,38	22,46	24,51	25,13
11	62,14	56,27	55,90	23,13	25,50	26,00
12	69,06	61,74	61,50	19,22	21,24	21,58
13	70,84	63,99	62,61	15,99	17,80	18,20
14 (1.9.)	72,33	66,22	63,98	16,17	17,76	18,27
15	73,77	68,25	66,50	15,64	17,08	17,60

Insgesamt gesehen wurden durch diesen Versuch erste Anhaltspunkte gewonnen, daß Ozon auch im Freiland als abiotischer Induktor von biochemischen Antworten bei Tabak gewertet werden kann.

IV. Diskussion

In den letzten Jahren hat der Einsatz von Pflanzen, die unterschiedlich ozontolerant sind, zu großen Fortschritten in unserem Verständnis von pflanzlichen Antworten gegenüber oxidativem Streß geführt. Es konnte beobachtet werden, daß einige Antworten auf Ozon den Reaktionen von Pflanzen auf Pathogenbefall ähneln (Sandermann et al., 1994). Auf Genebene wurde gezeigt, daß in Ozon-behandelten Pflanzen eine Induktion von antioxidativen Enzymen (Willekens et al., 1994), Enzymen der Ethylen-Biosynthese (Schlagnhauser et al., 1995), PR-Proteinen (Ernst et al., 1992; Schraudner et al., 1992, 1994) und anderen Streß-bezogenen Proteinen (Eckey-Kaltenbach et al., 1994) erfolgt. Ozon kann also ähnliche Antworten wie Pathogenbefall auslösen. Als Modellsystem für Ozon-Effekte wurden in der vorliegenden Arbeit die Ozon-Biomonitor-Pflanzen *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 und Bel B (Heggstad, 1991) verwendet, die von Schraudner et al. (1996) detailliert biochemisch charakterisiert wurden. An ihnen wurden die Reaktionen von Streßproteinen und insbesondere von PR-Proteinen auf Ozon und UV-B einzeln bzw. in Kombination untersucht.

Proteine der interzellulären Waschflüssigkeit

Es wurde das Proteinmuster der interzellulären Waschflüssigkeit in Blättern von Ozon-behandelten Tabakpflanzen im Vergleich zu entsprechenden Reinluftkontrollen analysiert. Die Proteine im Apoplasten der Reinluftkontrollen waren bei beiden Kultivaren sehr ähnlich. Ein Protein bei ca. 21 kDa war Kultivar-spezifisch und trat nur bei cv. Bel B auf. Es wurde durch Ozon nicht beeinflusst.

Nach Kerner (1990) ist dieses Protein auch bei den Tabaksorten *N. tabacum* L. cv. Samsun und Samsun NN, nicht jedoch bei cv. Xanthi vorzufinden. Homologie-Vergleiche der mittels Mikrosequenzanalyse (Bauw et al., 1989) identifizierten Peptidsequenzen wurden mit Hilfe des Blast P Computerprogramms (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Wahrscheinlich handelt es sich um ein noch nicht beschriebenes Protein. Zwei der Peptide wiesen aber doch Homologien zu interessanten Proteinen auf. Das in Abb. 54 dargestellte Peptid c1 zeigt eine 64 %ige Homologie zu einem Teilpeptid des Initiationsfaktors EIF-52 der Proteinbiosynthese aus *Nicotiana plumbaginifolia* L. (Chamot und Kuhlemeter, 1992). Die NH₂-terminale Sequenz (Abb. 54 e) stimmte zu 43 % damit überein. Wenn auch die genaue Funktion dieses Initiationsfaktors nicht bekannt ist, so fördert er vermutlich die Bildung der ersten Peptidbindung in der Proteinbiosynthese (Chamot und Kuhlemeter, 1992). Aufgrund der intrazellulären Lokalisation des Initiationsfaktors und seines Molekulargewichtes

von 17.4 kDa (Chamot und Kuhlemeter, 1992) entspricht das extrazelluläre Bel B spezifische 21 kDa-Protein jedoch wahrscheinlich nicht diesem Protein. Das Peptid c 1 (Abb. 54) wies außerdem eine 71 %ige Ähnlichkeit zu einem Teilpeptid einer Ubiquitin-Protein-Ligase [EC 6.3.2.19] aus *Triticum aestivum* L. (Van Nocker und Vierstra, 1991) auf. Die NH₂-terminalen Sequenzen des 21 kDa-Proteins und der Ubiquitin-Protein-Ligase (UBC, ubiquitin-conjugating enzyme) stimmten zu 39 % überein (s. Abb. 54 e). Die homologen Teilpeptide umfaßten ca. 16 % der Gesamtsequenz der Ubiquitin-Protein-Ligase (s. Tab. 9). Das Molekulargewicht der Ubiquitin-Protein-Ligase von 20 kDa und ihre Funktion sind in Bezug auf das Bel B spezifische Protein sehr interessant. Die Ubiquitin-Protein-Ligase katalysiert die kovalente Bindung von Ubiquitin an andere Proteine (Jentsch, 1992). Ubiquitin (ca. 8 kDa) gehört zu den Hitzeschockproteinen und ist z.B. an dem ATP-abhängigen Proteinabbau durch Bildung von multiubiquitinierten Proteinen, die von Proteasen abgebaut werden können, beteiligt (Jentsch, 1992). Man vermutet, daß Ubiquitin auch Funktionen bei der Streßantwort von Pflanzen z.B. gegenüber Pathogenen, wie dem Tabakmosaikvirus (Becker et al., 1993) besitzt. Der abiotische Streßfaktor Ozon bewirkte bei *Pinus sylvestris* L. ebenfalls eine Akkumulation der mRNA verschiedener Ubiquitine (Wegener-Strake, 1995).

c1

	58	69
Bel B spez.	.. A G N I M T F P Q O A T	
IF 52-Nicotiana	.. A G A S K T Y P Q Q A ..	
UBC-Triticum	 A I M S F P Q	

e

	122	136
Bel B spez.	.. A Y L D F V G D I S V P D G P	
IF 52-Nicotiana	 G E Y S L I T	
UBC-Triticum	 Y L S I I S M L S S P N D ..	

Abb. 54: Homologie-Vergleich des durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptides c1 und der NH₂-terminalen Sequenz (e) des Bel B spezifischen Proteins (Bel B spez.) mit dem Initiationsfaktor 52 aus *Nicotiana plumbaginifolia* L. (IF 52 - *Nicotiana*; Chamot und Kuhlemeter, 1992) und dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym aus *Triticum aestivum* L. (UBC-*Triticum*; Van Nocker und Vierstra, 1991). Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die UBC-Gesamtsequenz. Schwarz sind in allen Vergleichssequenzen übereinstimmende Aminosäuren, grau sind in bestimmten Vergleichssequenzen homologe Aminosäuren dargestellt.

Um die Aussagekraft von Sequenzhomologien abschätzen zu können, werden im allgemeinen Zusatzinformationen über das betreffende Protein benötigt, z.B. in Bezug auf Molekulargewicht, isoelektrischen Punkt, Reaktion mit Antikörpern, Enzymaktivität etc. (Allen, 1989). Zu diesem Zweck sind hier und bei allen folgenden Proteinen diese zusätzlichen Kriterien tabellarisch (s. Tab. 10) aufgeführt. Im Falle des 21 kDa-Proteins konnten keine weiteren Informationen mehr gewonnen werden, da die Sequenzdaten durch technische Defekte am Proteinsequenzierer erst unmittelbar vor Abgabe der Doktorarbeit eintrafen.

Tab. 10: Charakteristische Eigenschaften des Bel B spezifischen Proteins; MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt ; n.b., nicht bestimmt; UBC, Ubiquitin-konjugierendes Enzym aus *Triticum aestivum* L. (s. Abb. 53)

Kultivar	MG [kDa]; IEP	Nachweis	Anteil [%] der sequenzierten Teilpeptide an der Gesamtsequenz der UBC	Stress-bedingte Regulation
Bel B	21; n.b.	n.b.	16	O ₃ -unabhängig Bel B spezifisch

Ozon-abhängige Veränderungen von Proteinen der IWF

In Tab. 11 sind die detektierten Unterschiede im Apoplasten-Proteinmuster nach einmal fünfständiger bzw. zweimal fünfständiger Ozonbehandlung im Vergleich zu den Kontrollen zusammenfassend dargestellt. Die Proteine wurden als O₃-related (O₃R) bezeichnet und nach steigendem Molekulargewicht geordnet.

Tab. 11: Apoplastidäre O₃-related Proteine in Tabak (cv. Bel W3, Bel B). Es wurden jeweils interzelluläre Waschflüssigkeiten aus mittelalten Blättern mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau bzw. Silbernitrat angefärbt (s. III. 3.1.). MG, Molekulargewicht; Oz, Ozonbehandlung, K, Kontrolle: (a) 150 nl/l O₃, 1x5 h; Oz_{5h}, unmittelbar im Anschluß an die Ozonbehandlung geerntet; Oz_{24h}, 24 h nach Behandlungsbeginn geerntet; K_{5h}, K_{24h}, entsprechende Kontrollen; (b) 160 nl/l O₃, 2x5 h (an zwei aufeinanderfolgenden Tagen); Oz_{32h}, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet; K_{32h}, entsprechende Kontrolle. Intensität der Proteinbanden: +++ , stark hervortretend; ++ , deutlich erkennbar; + , schwach/kaum sichtbar; - , nicht vorhanden

MG [kDa]; Abkürzung	Oz _{5h}	Oz _{24h}	K _{5h}	K _{24h}	Kultivar
4 (O ₃ R-1)	+	++	-	-	Bel B
25 (O ₃ R-2)	-	+	++	+(+)	Bel W3
26 (O ₃ R-3)	-	+	++	+(+)	Bel W3
28 (O ₃ R-4)	+	+++	-	-	Bel W3
35 (O ₃ R-5)	++	+++	-	+	Bel B, Bel W3
MG [kDa]; Abkürzung	Oz _{32h}		K _{32h}		Kultivar
25 (O ₃ R-2)	+		++		Bel B
26 (O ₃ R-3)	+		++		Bel B
28 (O ₃ R-4)	++		-		Bel W3

Zwei Proteine von 25 kDa (O₃R-2) und 26 kDa (O₃R-3) wurden durch Ozonbehandlung (160 nl/l, 2x5 h) bei beiden Kultivaren reprimiert. Mit Hilfe der Mikrosequenzierung (Bauw et al., 1989) wurden für beide Proteine aus dem cv. Bel B die Sequenzen von zwei Peptiden (a und b, s. Abb. 55) analysiert. Die Teilpeptidsequenzen der beiden Proteine O₃R-2 (25 kDa) und O₃R-3 (26 kDa) stimmten zu 88 % bzw. 100 % für Peptid a bzw. b überein (s. Abb. 55). Demnach handelte es sich wahrscheinlich um Isoformen des gleichen Enzyms. Für O₃R-2 (25 kDa) ergab sich eine 56 %ige Übereinstimmung des Peptides a bzw. eine 73 %ige des Peptides b mit Peptiden eines Germin-ähnlichen Proteins (GLP) von *Sinapis alba* L. (s. Abb. 55). Die homologen Teilpeptide umfaßten ca. 15 % der Gesamtsequenz des GLP von *Sinapis alba* L. (s. Tab. 12). Für O₃R-3 (26 kDa) war eine 56 %ige Homologie des Peptides a bzw. eine 63 %ige Übereinstimmung des Peptides b mit dem Germin-ähnlichen Protein von *Sinapis alba* festzustellen (s. Abb. 55). Im Vergleich zu Peptiden des Germin-ähnlichen Proteins von *Pharbitis nil* L. ergab sich für O₃R-2 (25 kDa) eine 63 %ige Homologie des Peptides a bzw. eine 60 %ige Übereinstimmung des Peptides b. Für O₃R-3 (26 kDa) zeigte sich eine 56 %ige

Homologie der Peptide a und b mit Peptiden des Germin-ähnlichen Proteins von *Pharbitis nil* L. (Abb. 55).

a

		43															58														
O ₃ R-2	..	K	P	S	A	V	T	A	N	X	F	V	F	S	G	L	A	..													
O ₃ R-3	..	K	P	S	A	V	T	A	N	D	F	V	F	G	G	L	A	..													
GLP- <i>Sinapis</i>	..	N	P	D	Q	V	T	E	N	D	F	A	F	S	G	L	G	..													
GLP- <i>Pharbitis</i>	..	N	T	A	K	V	T	A	A	D	F	V	Y	S	G	L	A	..													

b

		69																									90																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																															
O ₃ R-2	..	A	X	V	X	P	A	F	A	P	Q	F	P	G	L	N	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..	..

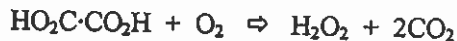
Abb. 55: Vergleich der durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide der Ozone-Related Proteine 2 (O₃R-2, 25 kDa) und 3 (O₃R-3, 26 kDa) aus Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) mit Germin-ähnlichen Proteinen (GLP). Es wurden zwei Peptide (a und b) sequenziert. Datenquellen: GLP-*Sinapis*, *Sinapis alba* L. GLP 1 Gen für das Germin-ähnliche Protein 1 (Heintzen et al., 1994); GLP-*Pharbitis*, *Pharbitis nil* L. cDNA (Ono et al., 1995, unveröffentlicht, EMBL/Genbank/DDBJ databases). Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Gesamtsequenz von GLP-*Sinapis*. Schwarz sind in allen Vergleichssequenzen übereinstimmende Aminosäuren, grau sind in bestimmten Vergleichssequenzen homologe Aminosäuren dargestellt.

In der Tab. 12 sind analytisch gewonnene Informationen über Eigenschaften des Proteins mit den Isoformen O₃R-2 (25 kDa) und O₃R-3 (26 kDa) zusammenfassend dargestellt.

Tab. 12: Charakteristische Eigenschaften der Isoformen O₃R-2 (25 kDa) und O₃R-3 (26 kDa); MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt; n.b., nicht bestimmt; GLP, Germin-ähnliches Protein von *Sinapis alba* L. (s. Abb. 55)

Kultivar	MG [kDa]; IEP	Nachweis	Anteil [%] der sequenzierten Teilpeptide an der Gesamtsequenz der GLP	Streß-bedingte Regulation
Bel B, Bel W3	25, 26; n.b.	Enzymaktivität	15	O ₃ -abhängige Hemmung

Das Germin-ähnliche Protein liegt in jungen Blättern von *Sinapis alba* L. Zellwand-assoziiert vor (Heintzen et al., 1994) und zeigt Homologie zu Germin. Germin wurde bei Weizen als Protease-resistentes, oligomeres, extrazelluläres Glykoprotein beschrieben, das zu Beginn der Keimung von Weizenembryonen (Hydrierungsphase) akkumuliert (Lane et al., 1992). Dumas et al. (1993) und Lane et al. (1993, 1994) zeigten, daß Germin Oxalatoxidase-Aktivität besitzt. Das Enzym Oxalatoxidase (EC 1.2.3.4.) (Sugiura et al., 1979; Pietta et al., 1982) katalysiert die Umsetzung von Oxalsäure und Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und Kohlenstoffdioxid:



Sowohl die Molekulargewichte als auch die Sequenzen der Peptide wiesen auf Isoformen von Oxalatoxidase-Untereinheiten (25 und 26 kDa) hin. Es wurde daher ein Test zur Detektion der Aktivität der Oxalatoxidase durchgeführt. Dabei wurde die H₂O₂-Entwicklung mit Hilfe einer Peroxidase-abhängigen Färbemethode nach Lane et al. (1993) detektiert. Der Aktivitäts-Nachweis ist detailliert bei II.8.1. beschrieben. Er erfolgte auf dem Nitrozellulose-Blot durch Kombinieren einer „Substrat“-Lösung, die Oxalat und Succinat enthielt, und einer „Entwickler“-Lösung, die im wesentlichen aus Dimethylanilin (DMA) als Farbstoff und dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (-POD) (EC 1.11.1.7) bestand. Innerhalb von ca. 5 min wurde bei vorhandener Oxalatoxidase-Aktivität eine violette Bande auf der Membran sichtbar.

Um zu überprüfen, ob bereits ohne Oxalat eine Reaktion z.B. durch die zur Farbdetektion der Oxalatoxidase-Aktivität verwendete POD auftrat, wurde zunächst die „Entwickler“-Lösung allein zugegeben und erst nach einigen Minuten auch die „Substrat“-Lösung (mit Oxalat) hinzugefügt. Da erst nach Zugabe von Oxalat eine

Bande im Molekulargewichtsbereich zwischen 86 und 112 kDa detektierbar war, während POD-Banden im Bereich von ca. 48 kDa (Domon et al., 1995) stets fehlten, ist davon auszugehen, daß dieser Test spezifisch die Oxalatoxidase-Aktivität detektiert. Oxalatoxidase wurde damit zum ersten Mal in Tabak nachgewiesen.

Oxalat kann in allen Zellkompartimenten sowie im Apoplasten auftreten. Oxalatoxidase vermag auch das schlecht lösliche Calciumoxalat, dessen Löslichkeitsprodukt 2.57×10^{-9} mol/l bei 25°C beträgt (Weast, 1972), umzusetzen (Chiriboga, 1966). Calciumoxalatkristalle kommen in über 240 Familien von Blütenpflanzen extrazellulär und vakuolär vor (Webb et al., 1995). Die Autoren vermuten, daß die Calciumoxalatbildung einen Regulationsmechanismus für cytosolisches Calcium darstellt, wodurch überschüssiges Calcium der aktiven Metabolisierung entzogen wird. Denn obwohl freies Calcium essentiell für biologische Wachstums- und Entwicklungsvorgänge ist, wirkt es in hohen Konzentrationen zelltoxisch (Webb et al., 1995). Insbesondere in Fichten (*Picea abies* L.) wurden große Calciumoxalat-Kristalle beobachtet (Fink, 1991). Durch Ozonbehandlung von Fichten wurde die Bildung von Calciumoxalatkristallen verstärkt und ihre Lokalisation verändert (Fink, 1991). Daß oxidative Signale bei Tabak (*Nicotiana glauca* L.) zu einer Erhöhung des cytosolischen Calciums führen, wurde z.B. von Price et al. (1994) gezeigt. Ein Anstieg der Calciumkonzentration könnte im Symplasten metabolische Veränderungen hervorrufen. Die Auslösung der Induktion einiger PR-Proteine ist Calcium-abhängig (Raz und Fluhr, 1992).

Die Akkumulation einer Germin-ähnlichen Oxalatoxidase wurde von Zhang et al. (1995) auf Pathogen-Befall (*Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*) bei *Hordeum vulgare* L. beschrieben. Dabei sehen die Autoren einen Zusammenhang der Oxalatoxidase-bedingten H₂O₂-Produktion mit Polymerisierungsprozessen (z.B. Lignifizierung). Wu et al. (1995) stellen eine direkte Verknüpfung zwischen H₂O₂-Produktion und Krankheitsresistenz von Pflanzen her. Dabei wurden transgene Kartoffelpflanzen eingesetzt, die ein pilzliches Gen für Glucoseoxidase enthielten, welche Glucose unter H₂O₂-Produktion oxidiert. Die Kartoffelknollen zeigten eine deutliche Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* und gegenüber *Phytophthora infestans*. Als Vermittler der Resistenz wurde das produzierte H₂O₂ erkannt, da die Resistenz durch Zugabe von H₂O₂ abbauender Katalase aufgehoben werden konnte (Wu et al., 1995). Im Gegensatz zu der nur bei Pilzen und Bakterien vorkommenden Glucoseoxidase (Frederick et al., 1990) ist die Oxalatoxidase ein pflanzliches Enzym und könnte bei zukünftigen Versuchen mit transgenen Pflanzen erfolgreich eingesetzt werden.

Ozonbehandlung bewirkte bei *Nicotiana tabacum* L. eine Hemmung der im Apoplasten lokalisierten Oxalatoxidase auf Protein- und Enzymebene. Damit ist die Oxalatoxidase bei *Nicotiana tabacum* L. neben der Diaminoxidase bei *Phaseolus*

vulgaris L. (Peters et al., 1989) und bei *Pisum sativum* L. (Reupold, 1991) das zweite apoplastische Enzym für H_2O_2 -Produktion, das durch Ozon gehemmt wird. Beide H_2O_2 -produzierenden Enzyme aus Solanaceae (Oxalatoxidase) sowie Fabaceae (Diaminoxidase) sind in der Abb. 56 zusammenfassend dargestellt.

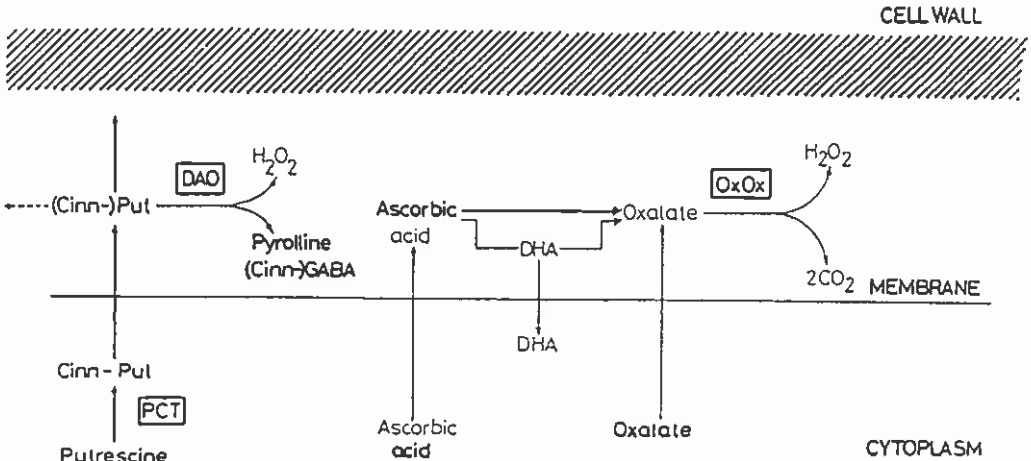


Abb. 56: Modellvorstellung zu Reaktionen und Lokalisation von Oxalatoxidase und Diaminoxidase. DAO, Diaminoxidase; Cinn-Put, Cinnamoyl-Putrescin; PCT, Putrescin-Cinnamoyltransferase; (Cinn-)GABA, (Cinnamoyl-) γ -Aminobuttersäure; DHA, Dehydroascorbat; OxOx, Oxalatoxidase

Eine Ozon-bedingte Oxalatoxidase-Hemmung führt vermutlich zu einer Akkumulation von Oxalat im Apoplasten (s. Abb. 56). Oxalat kann durch Abbau von Ascorbat (Saito, 1996) oder Dehydroascorbat (DHA) (McKersie und Leshem, 1994) entstehen. Durch Ozon-Behandlung wurde ein Anstieg der Ascorbatmenge im Apoplasten von Castillo und Greppin (1988) und von Luwe et al. (1993) gezeigt. Ascorbat besitzt antioxidative Eigenschaften (Nakano und Asada, 1981; Gillham und Dodge, 1986). Es wird aus dem Cytoplasma in den Apoplasten transferiert (Castillo et al., 1987; Eckey, 1992; Luwe et al., 1993). Nach Luwe und Heber (1995) wird Ascorbat im Apoplasten oxidiert, wodurch Dehydroascorbat (DHA) entsteht. DHA kann dann vermutlich in das Cytosol transportiert und dort wieder reduziert werden (Luwe und Heber, 1995). DHA könnte aber auch im Apoplasten abgebaut werden, wobei Oxalat (und Tartrat) entsteht (Abb. 56).

Im Apoplasten treten ferner freie und konjugierte Polyamine (wie z.B. Putrescin und Caffeoyle-Putrescin) auf (s. Abb. 56). Diaminoxidase (DAO) baut Putrescin und möglicherweise auch Putrescin-Konjugate um zu H_2O_2 und N-haltigen Verbindungen (Pyrollin, γ -Aminobuttersäure). Eine Diaminoxidase-Hemmung durch Ozon, wie von Peters et al. (1989) und von Reupold (1991) beschrieben, führt zu einer Hemmung des Putrescin-Abbaus und sollte eine Erhöhung von Putrescin im Apoplasten zur Folge haben (Abb. 56). Eine sehr deutliche Akkumulation erfolgt, weil die Biosynthese (durch Arginindecarboxylase-Aktivitätserhöhung, Langebartels et al., 1991) gesteigert und der Abbau (durch DAO) gehemmt ist. Ozonbedingt konnte ein Anstieg der Konzentration von Polyamin-Konjugaten, wie z.B. Monokaffeoyleputrescin im Apoplasten beobachtet werden (Langebartels et al., 1991). Diese werden aus dem Cytoplasma durch das Plasmalemma in den Apoplasten transferiert (Abb. 56). Daß Polyamin-Konjugate effektive Sauerstoffradikalfänger sind, wurde von Bors et al. (1989) gezeigt. Polyaminkonjugate im Apoplasten üben vermutlich eine Schutzfunktion gegenüber extrazellulären Sauerstoffradikalen aus (Langebartels et al., 1991). Nach Slocum und Furey (1991) könnte die Diaminoxidase H_2O_2 für die durch Peroxidasen katalysierten Quervernetzungsreaktionen in der Zellwand (Lignifizierung) liefern. Eine ähnliche Funktion könnte auch das durch die Oxalatoxidase produzierte extrazelluläre H_2O_2 ausüben.

Lane et al. (1993) vermuteten, daß die durch Oxalatoxidase freigesetzten Ca^{2+} - und H_2O_2 -Moleküle Signalfunktion besitzen („second messengers“). Assoziiert mit lokalisierendem Zelltod während der hypersensitiven Antwort (HR) wurde die Produktion von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und anderen aktivierten Sauerstoffspezies (AOS) wie z.B. Superoxidanionen (O_2^-) und Hydroxylradikalen (OH) beobachtet (Keen, 1992; Mehdy, 1994), was als oxidativer „Burst“ bezeichnet wurde (Lamb et al., 1989). Das im Rahmen des oxidativen Bursts produzierte H_2O_2 kann z.B. zu einer Verstärkung der Zellwand durch oxidatives „Cross-linking“ von (Hydroxy-)Prolinreichen Strukturproteinen führen (Bradley et al., 1992). Die Autoren sehen darin einen Schutzmechanismus der Pflanze z.B. gegenüber Pathogenen und anderen Streßfaktoren der Umwelt. Leicht erhöhte H_2O_2 -Konzentrationen können jedoch auch Signalfunktion für die Aktivierung systemischer Resistenzantworten besitzen (Apostol, 1989).

Ferner gibt es bestimmte pilzliche Pathogene, die Oxalat ausscheiden (Lane et al., 1993). *Phanerochaete chrysosporium* synthetisiert unter Bedingungen, die das Lignin-abbauende System induzieren, extrazelluläres Oxalat (Kuan und Tien, 1993). Dieses extrazelluläre Oxalat wurde mittels HPLC identifiziert und quantifiziert (ca. 60 μM Oxalat) und war durch Oxalatoxidase abbaubar. Es könnte von der pflanzlichen apoplastischen Oxalatoxidase genutzt werden, um H_2O_2 möglicherweise zur direkten Pathogenabwehr zu produzieren. Insgesamt gesehen wäre es sehr

interessant, transgene Pflanzen (z.B. Tabak) herzustellen, die das Enzym Oxalatoxidase überexprimieren, und diese hinsichtlich ihrer lokalen und systemischen Reaktionen auf Pathogenbefall und auf Ozon-Behandlung zu überprüfen.

Im Apoplasten von ozonbehandelten Tabakpflanzen des Kultivars Bel W3 war eine Hauptproteinbande bei 28 kDa (O_3R-4) erstmals 24 h nach Behandlungsbeginn induziert. Den Mikrosequenzierungsergebnissen zufolge könnte es sich um eine saure Chitinase (PR-3b (II), Nomenklatur nach van Loon et al., 1994) handeln. Dabei wurden die Aminosäuresequenzen von zwei Peptiden (a und b, s. Abb. 57) analysiert. Homologie-Vergleiche ergaben eine 100 %ige Übereinstimmung beider Sequenzen des 28 kDa-Proteins (O_3R-4) zu durch Trypsin-Verdau freisetzbaren Peptiden einer sauren Chitinase aus Tabak (PR-3b (II), Payne et al., 1990) (s. Abb. 57). Die homologen Teilpeptide umfaßten ca. 11 % der Gesamtsequenz saurer Tabak-Chitinasen (s. Tab. 13). Die Sequenzhomologie zu Peptiden der sauren Chitinase PR-3a (II) betrug 85 %, während die basischen Chitinasen PR-3c, 3d und 3e (Klasse I, Meins et al., 1992) Übereinstimmungen von 74 bis 81 % zeigten (Abb. 57).

a		136																152	
O ₃ R-4	..	A	G	T	A	I	G	Q	E	L	V	N	N	P	D	L	V	A	
PR-3b (II)	..	A	G	T	A	I	G	Q	E	L	V	N	N	P	D	L	V	A	
PR-3a (II)	..	A	G	N	A	I	R	Q	D	L	V	N	N	P	D	L	V	A	
PR-3c (I)	..	C	G	R	A	I	G	V	D	L	L	N	N	P	D	L	V	A	
PR-3d (I)	..	C	G	R	A	I	G	V	D	L	L	N	N	P	D	L	V	A	
PR-3e (I)	..	C	G	R	A	I	G	Q	N	L	L	N	N	P	D	L	V	A	

b		186	195									
O_3R-4	..	P	S	A	A	D	Q	A	A	N	R	..
PR-3b (II)	..	P	S	A	A	D	Q	A	A	N	R	..
PR-3a (II)	..	P	S	A	A	D	Q	S	A	N	R	..
PR-3c (I)	..	P	S	A	G	D	R	A	A	N	R	..
PR-3d (I)	..	P	S	S	A	D	R	A	A	N	R	..
PR-3e (I)	..	P	S	A	A	D	R	A	A	N	R	..

Abb. 57: Vergleich der Aminosäuresequenzen von zwei durch Trypsin-Verdau erzeugten Peptiden des 28 kDa Proteins (O_3R-4) mit Tabak-Chitinasen. Es wurden jeweils zwei Peptide (a und b) sequenziert. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Gesamtsequenz von PR-3 b (II). Datenquellen: PR-3b (II) und PR-3a (II), Tabak PR-P und PR-Q cDNA Klone (Payne et al., 1990); PR-3c (I), PR-3d (I), PR-3e (I), genomische Tabak-Klone λ CHN 17, λ CHN 200 bzw. λ CHN 14 (Shinshi et al., 1990; Van Buuren et al., 1992)

Das Molekulargewicht und die Sequenzen des O₃-related Proteins von 28 kDa (O₃R-4) wiesen auf eine saure Chitinase hin. Dies wurde durch immunologische Detektion mit Hilfe spezifischer Antikörper (aus *Cicer arietinum*; Vogelsang und Barz, 1993) bestätigt. In der Tab. 13 sind die Eigenschaften dieses Proteins im Überblick dargestellt.

Tab. 13: Charakteristische Eigenschaften des 28 kDa-Proteins (O₃R-4); MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt; PR-3 (II), saure Chitinase Isoformen (vgl. Abb. 56)

Kultivar	MG [kDa]; IEP	Nachweis	Anteil [%] der sequenzierten Teilpeptide an der Gesamtsequenz von sauren Tabak- Chitinasen (PR-3 (II))	Streß-bedingte Regulation
Bel W3	28; n.b.	Enzymprotein	11	O ₃ -abhängige Erhöhung

Da die Proteinbande erstmals 24 h nach Beginn einer fünfständigen Behandlungsperiode und 32 h nach Beginn von zwei fünfständigen Behandlungsintervallen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen beobachtet werden konnte, wird die Induktion der sauren Chitinase als sekundäre Antwort auf Ozon betrachtet, die gleichzeitig mit Gewebeschädigungen auftritt. Ähnliche Ergebnisse erhielten Ernst et al. (1992), die erst nach 14ständiger kontinuierlicher Ozonbehandlung in Tabak (cv. Bel W3) eine Induktion der mRNA für saure Chitinase beobachten konnten.

Hydrolytische Chitinasen findet man in vielen Pflanzen und pflanzlichen Zellkulturen nach Behandlung mit mikrobiellen Pathogenen, Elicitoren oder Chemikalien (Boller, 1988). Es sind basische und saure Isoformen beschrieben. Während die sauren Isoformen vorwiegend im Apoplasten lokalisiert sind, kommen die basischen Isoformen intrazellulär in der Vakuole vor (Keefe et al., 1990). Die basischen Isoformen werden z.B. bei Verwundung (Brederode et al., 1991), die sauren Isoformen durch TMV-Infektion (Legrand et al., 1987) induziert. Eine Chitinase mit 100 %iger Homologie zu Peptiden von O₃R-4 wurde von Payne et al. (1990) bei Virus-infiziertem Tabak als PR-Q (PR-3b (II)) beschrieben. Behandlung von Petersilienzellkulturen mit einem pilzlichen Elicitor verursachte eine deutliche

Steigerung der Aktivität von Chitinase, die vorwiegend auf extrazelluläre saure Isoformen zurückzuführen war (Kirsch et al., 1993). In embryonalen Karottenzellkulturen wurde eine neue saure Chitinase-Isoform entdeckt (De Jong et al., 1992). Durch Zugabe dieser sauren Chitinase war es möglich, eine Temperatursensitive Karottenmutante (ts11) auch bei ansonsten nicht-tolerierten und wachstumshemmenden Temperaturen weiterwachsen zu lassen. Dieser Effekt der Chitinase konnte durch Zugabe von Chitinbausteinen z.B. in Form von N-Acetylglucosamin-haltigen Lipooligosacchariden bakteriellen Ursprungs (Nodulationsfaktoren aus *Rhizobium*) nachgeahmt werden (De Jong et al., 1993). Saure Hydrolasen mit Chitinase- und Chitosanase-Aktivitäten wurden auch z.B. im Kallusgewebe von *Citrus sinensis* gefunden (Osswald et al., 1994). Man vermutet, daß diese Enzyme selbst antimikrobielle Wirkung besitzen, oder daß die produzierten Oligosaccharide als Elicitoren wirken (Meins et al., 1992; Kessmann et al., 1994). Die Freisetzung von Elicitoren aus der Pathogenzellwand (oder möglicherweise auch aus der pflanzlichen Zellwand) wurde von Van den Bulcke et al. (1990) als wichtige Funktion extrazellulärer Chitinasen und β -1,3-Glucanasen im Zusammenhang mit pflanzlichen Abwehrreaktionen herausgestellt. Daß β -Glucan- und Chitin-ähnliche Oligosaccharidmoleküle u.a. zur Induktion von Phytoalexinsynthese, Kalloseproduktion und Zellwandmodifikationen führen können, wurde z.B. von Ryan (1988) gezeigt. Nach Behandlung mit Ozon wurde früher eine schnelle Induktion basischer Chitinase- und β -1,3-Glucanase-Isoformen beobachtet (Ernst et al., 1992; Schraudner et al., 1992). Um welche basischen Isoformen es sich dabei handelt, wurde in der vorliegenden Arbeit auf Proteinniveau gezeigt (s. S. 128).

Ozonabhängig reagierte bei cv. Bel B auch ein Protein der IWF bei 4 kDa (O_3R-1), das unmittelbar nach einer fünfstündigen Behandlungsperiode im Vergleich zu den Kontrollen induziert war und möglicherweise ein Abbauprodukt von Proteinen darstellt. Bei beiden Kultivaren war eine deutliche Induktion einer Proteinbande bei 35 kDa zu beobachten, die bereits 5 h nach Behandlungsbeginn schwach hervortrat und nach 24 h deutlich induziert war. Das Molekulargewicht würde mit einer sauren Isoform von β -1,3-Glucanase (PR-2b (II)) übereinstimmen. Eine Induktion der sauren Isoformen von β -1,3-Glucanase (PR-2) wurde z.B. nach Salicylsäure-Behandlung beobachtet (Ward et al., 1991).

Ozon-bedingte Veränderungen im Proteinmuster von Gesamtblattextrakten

a) Induktion basischer Isoformen von β -1,3-Glucanase und Chitinase

Auf Enzym- und Proteinebene erfolgte in Gesamtblattextrakten durch Ozon eine Induktion der β -1,3-Glucanase bei beiden Tabakkultivaren (cv. Bel W3 und cv. Bel B). Aus Western-Blot Analysen ging hervor, daß dabei vorwiegend die basische Isoform der β -1,3-Glucanase bei 33 kDa (Neuhaus et al., 1992) induziert wurde. Die Induktion war bei dem ozonsensitiven Kultivar Bel W3 deutlicher ausgeprägt (70fach erhöhte β -1,3-Glucanasemenge im Vergleich zu den Kontrollen) als bei cv. Bel B (11fach). Die β -1,3-Glucanase-Akkumulation war auf mittelalte und ältere Blätter beschränkt, die die höchste stomatäre Leitfähigkeit besitzen (Langebartels et al., 1991) und deshalb die höchsten internen Ozondosen aufweisen. Das gilt ebenso für die Chitinase-Induktion. Die Chitinase-Proteinkonzentrationen nahmen nur bei dem ozonsensitiven Kultivar Bel W3 zu (bis zu siebenfache Induktion). Western-Blot Analysen mit Antikörpern für basische Chitinasen zeigten, daß in Gesamtblattextrakten die Isoformen bei 32 und 34 kDa (Keefe et al., 1990) induziert wurden.

b) Charakterisierung von weiteren ozonabhängigen Effekten auf Proteinniveau

Zweidimensionale Auftrennungen der Proteine von Gesamtblattextrakten zeigten eine große Ähnlichkeit des Proteinmusters von ozonbehandelten und unbehandelten Pflanzen. Dabei wurden die basischen Proteine nicht erfaßt. In Extrakten mittelalter Blätter von cv. Bel B wurden durch Ozon-Behandlung (160 nl/l, 2x5 h, an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) zwei eng benachbarte Proteine von 15 kDa (p15a und p15b; Nomenklatur nach van Loon et al., 1994; pI ca. 5) im Vergleich zu den Kontrollen induziert. In der Kontrolle waren bereits geringe Mengen der Proteine von 15 kDa vorhanden. Der Mikrosequenzanalyse zufolge liegen Homologien zu Peptidsequenzen der kleinen Untereinheit des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (Rubisco) vor. Bei cv. Bel W3 waren die zwei Proteine von 15 kDa (p15 a und p15 b) auch in Kontrollpflanzen gut erkennbar und wurden durch Ozonbehandlung nicht beeinflusst. Nach Pell et al. (1994) besteht die Wirkung von Ozon vor allem in einer schnelleren Alterung der Rubisco auf Proteinebene. Auf Ozon-Streß wurde bei einer Reihe von Pflanzenarten einschließlich Kartoffel, Rettich und Pappel ein Verlust der Aktivität und Proteinmenge der Rubisco festgestellt (Dann und Pell, 1989; Pell et al., 1992). Die Deaktivierung der Rubisco kann über einen post-translationalen Regulationsmechanismus erfolgen, der die Decarbamylierung eines Lysins im Reaktionszentrum des Enzyms beinhaltet

(Andrews und Lorimer, 1987). Die ozonbedingte Abnahme der Proteinmenge der Rubisco kann auf eine verminderte Biosynthese durch Hemmung der Transkription (Reddy et al., 1993) oder auf eine gesteigerte Proteolyse (Landry und Pell, 1993) zurückzuführen sein. Dann (1988) beobachtete, daß die Proteolyse von gereinigter Rubisco nach Ozon-Exposition und anschließender Behandlung mit Chymotrypsin im Vergleich zum Abbau nach einer Exposition mit Luft oder Sauerstoff erhöht war. Insgesamt wird ein Ozon-bedingter Verlust der Rubisco vermutlich die CO₂-Fixierung beeinflussen und - aufgrund der Prominenz der Rubisco unter den löslichen Blattproteinen (bis zu 50 % des Gesamtproteingehaltes bei C₃-Pflanzen, Strasburger, 1991) - möglicherweise die Seneszenz von Blättern beschleunigen (Pell et al., 1994).

Wie aus Tab. 14 hervorgeht, wurde bei cv. Bel B ein 30 kDa Protein (IEP ca. 6) durch O₃ reprimiert (O₃R-6). Dieses Protein fehlte bei cv. Bel W3 völlig (s. Tab. 14). Der Homologie-Vergleich des kurzen Peptids von O₃R-6 wird zusammen mit UV-induzierten Proteinen diskutiert, wobei UVR-1 bezüglich seines Molekulargewichtes und isoelektrischen Punktes mit dem Protein O₃R-6 übereinstimmte (s. Abb. 58 und Tab. 17).

Tab. 14: O₃-related Proteine in Gesamtblattextrakten mittelalter Tabak-Blätter (cv. Bel W3 und cv. Bel B, 32 h nach Behandlungsbeginn geerntet) MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt; +O₃, 2x5 h (an zwei aufeinanderfolgenden Tagen) mit 160 n/l Ozon behandelt; C, Kontrolle; p15, Polypeptid bei 15 kDa; O₃R, O₃-related; Aminosäureabkürzungen, s. II.13.6.; Rubisco, Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase aus *Nicotiana tabacum* L. (Mazur und Chui, 1985 eingereicht bei EMBL/Genbank/DDBJ databases); CA, Carboanhydrase aus *Nicotiana tabacum* L. (Majeau und Coleman, 1992 eingereicht bei EMBL/Genbank/DDBJ databases)

Abkürzung (für das jeweilige Protein)	MG [kD]	IEP	+O ₃ Bel W3	+O ₃ Bel B	C Bel W3	C Bel B	identifizierte Peptidsequenzen	Sequenzhomologien zu
p15a	15	5	+++	+++	+++	+	1.) I I G F D N V R 2.) Y W T M W K 3.) Q V Q - I S F	Rubisco (kleine Unter-einheit)
p15b	15	5	+++	+++	+++	+	1.) I I G F D N V R 2.) Y W T M W K 3.) ? V Q M A K / S F 4.) S P G Y Y D G R	Rubisco (kleine Unter-einheit)
O ₃ R-6	30	6	-	+	-	++	L M - L P A	Carboanhydrase (?)

Ozon- und UV-B-abhängige Reaktionen von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen

In kombinierten Expositionen mit Ozon und UV-B wurden die gleichen Ozonkonzentrationen wie bei alleiniger Ozonbehandlung verwendet (s. III. 4., Abb. 32). Die spektrale Verteilung der Strahlung auf Pflanzenniveau war während der Vorkultivierung und der Exposition besonders im UV-B Bereich der terrestrischen Strahlung sehr ähnlich (Thiel et al., 1996). Es wurden hohe Lichtintensitäten im sichtbaren Bereich (photosynthetische Photonenflußrate, PPFR $> 1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), ausgeglichene UV-B/PPFR Verhältnisse und eine cut-off Wellenlänge (Döhning et al., 1996) bei 293 nm verwendet, die der solaren sehr nahekommt (294 nm) (zur Definition des Begriffs cut-off Wellenlänge, s. III.5. Abb. 43, S. 97). UV-B Bestrahlung führte 32 h nach Beginn der zweimal fünfständigen Behandlung zu geringen Induktionen von Aktivität und Proteinmenge der β -1,3-Glucanase in älteren Blättern von Kultivar Bel W3, während bei cv. Bel B keine Reaktionen beobachtet werden konnten (s. III., 4.3., Abb. 38). Bei simultaner Behandlung von Tabakpflanzen mit Ozon und UV-B wurde die ozonbedingte Induktion der β -1,3-Glucanase (s. S. 105) nicht wesentlich verändert. Bei cv. Bel B war ein geringer Verstärkungseffekt im Vergleich zu alleiniger Ozonbehandlung nach 24 h und nach 32 h zu beobachten. Bei cv. Bel W3 kommt dieser anscheinend nicht zum Tragen, da hier bereits durch Ozon die maximale Aktivität erreicht wird, sodaß UV-B keine weitere Steigerung der Aktivität mehr zu bewirken vermag.

Dagegen wurde die ozonabhängige Akkumulation des Chitinase-Proteins (s. III. 4.3., Abb. 39, Blätter 4-7) signifikant ($P < 0.05$) um 50 - 70 % reduziert. Diese Ergebnisse weisen auf eine nichtkoordinierte Regulation von basischen Isoformen der Chitinase und β -1,3-Glucanase bei gleichzeitiger Behandlung mit Ozon und UV-B hin. Eine ausgeprägte Koordination von basischen Isoformen von β -1,3-Glucanase und Chitinase ist bei TMV-infiziertem Tabak (Vögeli-Lange et al., 1988) und bei Kartoffelblättern, die mit *Phytophthora infestans* infiziert wurden (Schröder et al., 1992), gezeigt worden. Sie wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit bei Infektion von Tabakpflanzen mit *Botrytis cinerea* beobachtet. Dabei wurden die gleichen Isoformen von β -1,3-Glucanase und Chitinase wie durch Ozon induziert. Andererseits wurde bei anderen Interaktionen auch eine unabhängige Regulation festgestellt, wie z.B. bei Tabak nach Infektion mit *Pseudomonas tabaci* (Meins und Ahl, 1989) oder nach Behandlung mit Salicylsäure (Bol, 1988).

Die Signalwege für die Induktion von PR-Proteinen bei Ozon- und UV-B-exponierten Pflanzen werden bis jetzt erst ansatzweise verstanden. Viele Faktoren weisen auf die Beteiligung von Ethylen und/oder aktivierten Sauerstoffspezies hin. Ethylen kontrolliert viele physiologische und entwicklungsbedingte Prozesse in Pflanzen, wie z.B. die Reifung von Früchten sowie die Seneszenz von Blättern und Blüten (Kende, 1993). Ethylen spielt aber auch bei der Reaktion von Pflanzen

gegenüber Verwundung, Pathogenbefall und anderen Streßfaktoren eine Rolle. Bei Pathogenbefall wie z.B. in TMV-infizierten Tabakpflanzen, die das Resistenzgen 'N' tragen, scheint der Beginn der hypersensitiven Reaktion an eine Stimulierung der Ethylenbiosynthese gekoppelt zu sein (De Laat und Van Loon, 1983).

1-Amino-cyclopropan-1-carbonsäure (ACC) ist der unmittelbare Vorläufer von Ethylen in der Ethylenbiosynthese und wird durch die Aktivität der ACC-Synthase aus S-Adenosyl-Methionin gebildet (Zarembinski und Theologis, 1994). Es wird durch ACC-Oxidase (früher EFE, „ethylene forming enzyme“ genannt) in Ethylen umgewandelt (Kende, 1993). Eine Induktion beider Enzyme der Ethylenbiosynthese wurde von Knoester et al. (1995) bei hypersensitiv reagierendem Tabak cv. Samsun NN auf TMV-Infektion und von Tuomainen et al. (1995) bei ozonbehandelten Tomaten gezeigt. Weiterhin ist die Bildung von N-malonyl-ACC (MACC) aus ACC durch Malonyltransferase möglich (Zarembinski und Theologis, 1994).

Die Synthese von „Streß-Ethylen“ (Yang und Hoffmann, 1984) ist mit der Ozonempfindlichkeit verschiedener Pflanzenarten positiv korreliert. Ethylen-Produktion gilt als eine der frühesten Antworten auf Ozon und wird auf die simultane Induktion der ACC-Synthase und der ACC-Oxidase zurückgeführt (Yin et al., 1994). Es wurde postuliert, daß Ethylen bei der Ausbildung von ozonbedingten Blattschäden bei Pflanzen eine Rolle spielt (Tingey et al., 1976; Langebartels et al., 1991; Kangasjärvi et al., 1994). Ozonbehandlung führte bei Tomatenpflanzen zu einem transienten Anstieg der ACC-Konzentrationen sowie der Aktivität und Genexpression von ACC-Synthase und ACC-Oxidase (Tuomainen et al., 1995).

Bei Tabak erhöhte Ozon die Ethylenbiosynthese in erster Linie bei dem hier verwendeten ozonsensitiven Kultivar Bel W3, wobei sich ACC-Gehalte und Ethylen-Emission gleich verhielten (Langebartels et al., 1991; Yin et al., 1994).

Exogen appliziertes Ethylen führt zu einer Induktion der PR-Proteine β -1,3-Glucanase und Chitinase (s. III. 3.2., Abb. 28). Dabei werden vor allem die basischen Isoformen der PR-Proteine beeinflusst (Keefe et al., 1990; Boller, 1993). Diese werden auch durch Ozon erhöht (s. S. 128). Für eine Rolle von Ethylen bei der Regulation von PR Proteinen spricht auch das Auffinden von Ethylen-sensitiven Elementen in der Promoterregion von PR Proteinen (Eyal et al., 1993). Kangasjärvi et al. (1994) zeigten auf, daß andere ozoninduzierte Gene und Proteine wie z.B. Phenylammoniaklyase, Peroxidase und Glutathion-S-Transferase ebenfalls durch Ethylen induzierbar sind. Andere Studien mit Hilfe von Ethylen-unempfindlichen *Arabidopsis* HEYNH.- Mutanten deuten darauf hin, daß Ethylen nicht unbedingt selbst notwendig ist für die Induktion von Abwehrantworten, sondern Signalcharakter für die systemische Genaktivierung nach Streßeinwirkung besitzen kann (Ecker, 1995).

In Sonnenblumenzellkulturen, die mit einem Wachstumsretardantium vom Triazol-Typ behandelt wurden, war die beobachtete Zunahme vorwiegend der Chitinase-

Aktivität mit einem erhöhten Verhältnis ACC/Ethylen gekoppelt (Siefert et al., 1994a). Daß das synthetische Fungizid Epoxiconazol (BAS 480 F; Ammermann et al., 1990) ebenfalls eine intrazelluläre Induktion der Hydrolasen β -1,3-Glucanase und Chitinase auslösen kann, wurde in Kooperation mit K. Großmann (BASF, Limburgerhof) bei Weizenpflanzen gezeigt (Siefert et al., 1996). Aus immunologischen Studien wurden Dosis-abhängige Erhöhungen der Enzymaktivitäten und der Proteinmengen in Hydrokulturen von Weizenpflanzen deutlich. Die Proteinmengen waren mit maximal 2.8facher Induktion der Chitinase bzw. 1.6facher Induktion der β -1,3-Glucanase im Vergleich zu Ozon (s.o.) nur moderat induziert. Berücksichtigt man jedoch, daß *in vitro* eine sehr hohe Hemmfähigkeit des Hyphenwachstums von Pilzen durch Weizen-Chitinasen nachgewiesen wurde (Schlumbaum et al., 1986), so dürften die gezeigten Erhöhungen der Enzymmengen und -aktivitäten bei Weizen die Abwehrreaktion gegenüber Pathogenen verstärken. Diese Ergebnisse sind im Zusammenhang mit Beobachtungen von Kessmann et al. (1994) zu sehen. Die Autoren weisen neben der direkten antibiotischen Wirksamkeit von Pestiziden auf die Möglichkeit einer durch Chemikalien vermittelten Krankheitskontrolle hin, die auf Komponenten basiert, die eine „systemisch erworbene Resistenzantwort“ (SAR, systemic acquired resistance; Ross, 1961 b; Ryals, 1992) auszulösen vermögen. Chemikalien (wie z.B. 2,6-Dichloro-Isonicotinsäure (INA) oder Salicylsäure) können gewissermaßen eine Initial-Pathogen-Infektion imitieren und so eine verstärkte Resistenz von Pflanzen gegenüber nachfolgenden Pathogenattacken bewirken (Kessmann et al., 1994).

Effekte von UV-B Strahlung auf β -1,3-Glucanase und Chitinase sowie andere Proteine

Eine Variation der Bestrahlungsstärke im UV-B Bereich wurde mit Hilfe von verschiedenen UV-Filtern erreicht. Es konnte eine deutliche Induktion der Aktivität der β -1,3-Glucanase und Chitinase bei cut-off Wellenlängen von 277 nm und 287 nm beobachtet werden. Im Bereich höherer Wellenlängen von 293 nm und 312 nm dagegen war keine Reaktion dieser Enzyme erkennbar. Daraus läßt sich ableiten, daß eine deutliche Schwelle für die Induktion von PR-Proteinen wie β -1,3-Glucanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3) existiert. Diese befindet sich in der Nähe der solaren Absorptionskante zwischen 287 nm und 293 nm.

Unter vergleichbaren experimentellen Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit konnte auf mRNA-Ebene auf O_3 - bzw. UV-B-Behandlung hin eine erstaunliche Übereinstimmung des Verhaltens antioxidativer Abwehrgene beobachtet werden (Willekens et al., 1994a). Es wurde gezeigt, daß eine von drei Katalase-Isoformen (Cat 2) sowie Glutathion-Peroxidase auf beide Streßfaktoren mit einer ähnlich raschen Zunahme reagierten. Katalase ist am H_2O_2 -Abbau beteiligt, während man vermutet,

daß Glutathion-Peroxidase von Lipiden abgeleitete Peroxide zu reparieren vermag (Willekens et al., 1994). Zusätzlich führen Ozon und UV-B zu einer Erhöhung der Konzentration aktivierter Sauerstoffspezies und der Lipid-Peroxidation in Pflanzen (Foyer et al., 1994). Wie in Pflanzen-Pathogen Studien postuliert wurde (Dixon et al., 1994), so fungieren aktivierte Sauerstoffspezies möglicherweise auch bei Ozon- und UV-B behandelten Pflanzen als Signalmoleküle. Für eine Vermittlerrolle aktivierter Sauerstoffspezies bei UV-B Behandlungen sprechen Ergebnisse von Green und Fluhr (1995), die die UV-B abhängige Induktion von sauren PR-1 Proteinen bei *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN durch Antioxidantien blockieren konnten.

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion von intrazellulären basischen Isoformen der β -1,3-Glucanase und möglicherweise auch der Chitinase wird auf Ozon-induziertes Streß-Ethylen (Langebartels et al., 1991) zurückgeführt. Andere Effekte, wie z.B. die Akkumulation von sauren PR 1 Proteinen (Yalpani et al., 1994; Green und Fluhr, 1995) werden möglicherweise über aktivierte Sauerstoffspezies vermittelt. Diese Reaktionen scheinen jedoch in Ozon-behandelten Pflanzen ziemlich spät aufzutreten (Ernst et al., 1992) oder bei Wellenlängen, die unter der solaren UV-Absorptionskante liegen (Brederode et al., 1991; Yalpani et al., 1994). Von Brederode et al. (1991) wurde gezeigt, daß Bestrahlung mit kürzeren Wellenlängen (UV-C) eine Induktion aller PR-Proteinfamilien bewirkt. Yalpani et al. (1994) beobachteten eine ähnliche Akkumulation von PR-1 Proteinen durch UV-C und durch Ozon. Die stratosphärische Ozonschicht schirmt jedoch die Erdoberfläche völlig von UV-C Strahlung ab. UV-C ist deshalb kein geeignetes Modell, um physiologische Effekte zunehmender UV-B Strahlung auf Pflanzen zu zeigen (Stapleton, 1992).

Daß Proteine bereits auf erhöhte Lichtverhältnisse (ohne UV-B Behandlung) reagieren können, ergab die Untersuchung von Proteinen im Apoplasten bei Versuchen, bei denen Starklichteffekte und UV-B Wirkungen differenziert betrachtet wurden (s. Tab. 12 und III. 5.5., Abb. 51). Dazu wurde ein Teil der Tabakpflanzen des Kultivars Bel W3 unter Starklichtbedingungen im Sonnensimulator gehalten, ein anderer Teil wurde in der Anzuchtskammer bei einer geringeren PPFR weiterkultiviert. Die Pflanzen im Sonnensimulator wurden mit UV-B (cut-off bei 291 nm) behandelt oder nur unter Starklichtbedingungen gehalten (Kontrollen). 75 h nach Beginn der dreimal sechsständigen UV-B Behandlungsperiode wurden alle Pflanzen simultan geerntet. Ein Protein von ca. 42 kDa wurde durch UV-B abgeschwächt. Ein anderes Protein bei ca. 33 kDa wurde ebenfalls durch UV-B Behandlung reprimiert. Es wurde jedoch auch bereits unter Starklichtbedingungen (ohne UV-B) abgeschwächt. Nur unter Starklicht-Bedingungen traten zwei Proteine von 26 kDa und 20 kDa auf, die durch UV-B Behandlung nicht beeinflusst wurden (s. Tab. 15). Diese Proteine der IWF lagen jedoch in zu geringen Mengen für eine Identifizierung per Mikrosequenzierung vor.

Tab. 15: Apoplastidäre UV-B bzw. Starklicht-abhängige Proteine in Tabak (cv. Bel W3; vgl. III. 5.5., Abb. 48). Es wurden jeweils interzelluläre Waschflüssigkeiten aus mittelalten Tabakblättern durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. MG, Molekulargewicht; +UV-B /-UV-B, Sonnensimulator-Pflanzen mit UV-B (3x6 h) behandelt bzw. Kontrollen, jeweils 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet; -UV-B, entsprechende Kontrollen; AK, Anzuchtskammer-Pflanzen, 75 h nach Behandlungsbeginn geerntet; Intensität der Proteinbanden: +++, intensiv/stark hervortretend, ++, deutlich erkennbar, +, schwach/kaum sichtbar; -, nicht vorhanden

MG [kDa]	+ UV-B	-UV-B	AK
42	+	+++	+++
33	+	++	+++
26	+	+	-
20	++	++	+

Durch zweidimensionale Auftrennung der Proteine von Gesamtblattextrakten wurde deutlich, daß bei Kultivar Bel W3 ein Protein von ca. 30 kDa (IEP bei 6) bei den cut-off Wellenlängen von 293 nm und 287 nm induziert war, das bei den Kontrollen (312 nm) fehlte. Durch Mikrosequenzanalyse wurde dieses Protein näher charakterisiert. Sequenzvergleiche ergaben eine hohe Homologie der vier identifizierten Peptidsequenzen (a-d, s. Abb. 58) zu durch Trypsin freisetzbaren Peptiden einer Carboanhydrase (CA) aus *Nicotiana* L. (Majeau und Coleman, 1992), aus *Spinacia* L. (Burnell et al., 1990), aus *Arabidopsis* HEYNH. (Raines et al., 1992) und aus *Pisum* L. (Roeske und Ogren, 1990). Alle identifizierten Peptide (a-d) des UVR-1 Proteins stimmen zu 100 % mit den Peptidsequenzen der Carboanhydrase aus *Nicotiana* L. überein. Die Peptide a und b1 wiesen außerdem eine 100 %ige Homologie zu den Peptid-Sequenzen der Carboanhydrase von *Spinacia* L. und *Arabidopsis* L. auf (Abb. 58). Das Peptid c stimmte zu 83 % mit den entsprechenden Peptiden aus *Spinacia* L. und *Arabidopsis* HEYNH. überein. Das Peptid d war zu 75 % bzw. 63 % mit den CA-Peptidsequenzen aus *Spinacia* L. bzw. *Arabidopsis* HEYNH. identisch. Die Peptide a und c zeigten eine 100 %ige Homologie zu den Peptidsequenzen der *Pisum*-Carboanhydrase. Die Peptide c und d stimmten zu 88 % bzw. 63 % mit den CA-Peptidsequenzen aus *Pisum* L. überein.

a

	132	139
UVR-1	.. N P A L Y G E L ..	
<i>Nicotiana</i> -CA	.. N P A L Y G E L ..	
<i>Spinacia</i> -CA	.. N P A L Y G E L ..	
<i>Arabidopsis</i> -CA	.. N P A L Y G E L ..	
<i>Pisum</i> -CA	.. N P A L Y G E L ..	

b 1

	204	211
UVR-1	.. V E N I V V I G ..	
<i>Nicotiana</i> -CA	.. V E N I V V I G ..	
<i>Spinacia</i> -CA	.. V E N I V V I G ..	
<i>Arabidopsis</i> -CA	.. V E N I V V I G ..	
<i>Pisum</i> -CA	.. V S N I V V I G ..	

b 2

	221	226
O ₃ R-6	.. L M - L P A ..	
<i>Nicotiana</i> -CA	.. L M S L P A ..	

c

	241	246
UVR-1	.. I G L P A K ..	
<i>Nicotiana</i> -CA	.. I G L P A K ..	
<i>Spinacia</i> -CA	.. I G L P A K ..	
<i>Arabidopsis</i> -CA	.. I C L P A K ..	
<i>Pisum</i> -CA	.. I G L P A K ..	

d

	312	319
UVR-1	.. E F G L S P S L ..	
<i>Nicotiana</i> -CA	.. E F G L S P S L ..	
<i>Spinacia</i> -CA	.. E Y G L S P S Q ..	
<i>Arabidopsis</i> -CA	.. E F G L S E T S ..	
<i>Pisum</i> -CA	.. E F G L S S T F ..	

Abb. 58: Vergleich der durch Trypsin-Verdau erhaltenen Peptide des UV-Related Proteins 1 (UVR-1, 30 kDa) aus Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) mit Carboanhydrasen (CA). Es wurden vier Peptide (a, b1, c, d) des Proteins UVR-1 sequenziert. b2, Peptidsequenz des O₃R-6 Proteins (cv. Bel B); Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Gesamtsequenz der *Nicotiana*-CA. Datenquellen: *Nicotiana*-CA, cDNA-Sequenz aus Chloroplasten von *Nicotiana tabacum* L. (Majeau und Coleman, 1992 eingereicht bei EMBL/Genbank/DBJ databases); *Spinacia*-CA, cDNA-Sequenz der Carboanhydrase von *Spinacia oleracea* L. (Burnell et al., 1990); *Arabidopsis*-CA, cDNA-Sequenz der Carboanhydrase von *Arabidopsis thaliana* HEYNH. (Raines et al., 1992); *Pisum*-CA, cDNA Sequenz der Carboanhydrase von *Pisum sativum* L. (Roeske und Ogren, 1990 eingereicht bei EMBL/Genbank/DBJ databases)

```

M S T A S I N S C L T I S P A Q A S L K K P T R P V A F A 29
R L S N S S S T S V P S L I R N E P V F A A P T P I I N 58
P I L R E E M A K E S Y E Q A I A A L E K L L S E K G E L 87
G P I A A A R V D Q I T A E L Q S S D G S K P F D P V E H 116
M K A G F I H F K T E K Y E K N P A L Y G E L S K G Q S P 145
K F M V F A C S D S R V C P S H V L N F Q P G E A F V V R 174
N I A N M V P A Y D K T R Y S G V G A A I E Y A V L H L K 203
V E N I V V I G H S A C G G I K G L M S L P A D G S E S T 232
A F I E D W V K I G I P A K A K V Q G E H V D K C F A D Q 261
C T A C E Q E A V N V S L G N L L T Y P F V R E G L V K K 290
T L A L K G G H Y D F V N G G F E L W G L E I G L S P S I 319
S V 321

```

Abb. 59: Gesamtsequenz der Carboanhydrase von *Nicotiana tabacum* L. (Majeau und Coleman, 1992 eingereicht bei EMBL / Genbank / DDBJ databases). Am Zeilenende ist jeweils für die unmittelbar letzte Aminosäure die Position in der Gesamtsequenz angegeben. Schwarz sind die Peptidsequenzen dargestellt, die mit identifizierten Peptidsequenzen des UVR-1 bzw. O₃R-6 Proteins (Aminosäuren 221-222, 224-226) völlig übereinstimmen (vgl. Abb. 57).

Das O₃-related Protein O₃R-6 (vgl. Tab. 14) zeigt ebenfalls eine hohe Peptidsequenz-Homologie (83 %) zu einem CA-Peptid von *Nicotiana* L. (s. Abb. 58 b 2). Bei letzterem Peptid jedoch, das sehr kurz ist (ca. 2 % der CA-Gesamtsequenz), ist ein Homologievergleich generell mit einem großen Unsicherheitsfaktor behaftet (Allen, 1989). Die sequenzierten UVR-1 Peptidsequenzen (a, b 1, c, d) dagegen umfassen ca. 9 % der Gesamtsequenz der chloroplastidären Carboanhydrase von *Nicotiana tabacum* L. (s. Abb. 58 und Abb. 59).

In Tab. 17 sind Merkmale des UVR-1 Proteins zusammenfassend dargestellt.

Tab. 17: Charakteristische Eigenschaften des UVR-1 Proteins; MG, Molekulargewicht; IEP, isoelektrischer Punkt; n.b., nicht bestimmt; CA, Carboanhydrase aus *Nicotiana tabacum* L. (s. Abb. 58)

Kultivar	MG [kDa]; IEP	Nachweis	Anteil [%] der sequenzierten Teilpeptide an der Gesamtsequenz der CA	Streß-bedingte Regulation
Bel W3	30; 6	n.b.	9	UV-abhängige Induktion

Carboanhydrase [EC 4.2.1.1.] ist ein Zink-haltiges, licht-unabhängiges Enzym, das die reversible Hydrierung von CO_2 zu HCO_3^- (Bicarbonat) katalysiert (Raines et al., 1992):



In Pflanzen gibt es verschiedene hexamere Formen mit Monomer-Untereinheiten zwischen 26 und 34 kDa (Graham et al., 1984; Burnell et al., 1990). In diesen Bereich fällt auch das hier gezeigte Protein von 30 kDa (UVR-1). Während der Hauptanteil der CA-Aktivität bei C_3 -Pflanzen in den Chloroplasten lokalisiert ist, wurde die Carboanhydrase bei C_4 -Pflanzen vorzugsweise in cytosolischen Mesophyllzellen gefunden, wobei jedoch zusätzliche Isoformen im Cytosol von C_3 -Pflanzen bzw. in Chloroplasten von C_4 -Pflanzen vorhanden sind (Burnell et al., 1990). Die physiologische Funktion der Carboanhydrasen im CO_2 -Metabolismus von Pflanzen ist noch wenig verstanden. Man vermutet, daß sie die CO_2 -Zufuhr für das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase durch Beschleunigung der Dehydrierung von HCO_3^- sicherstellen. Zusätzlich könnten Carboanhydrasen direkt die CO_2 -Diffusion fördern und die Pufferkapazität des Chloroplasten-Stromas unterstützen (Reed, 1981). Badger und Price (1994) diskutieren die Rolle der Carboanhydrase bei der Photosynthese verschiedener Organismen. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Induktion dieses Enzyms auf UV-Behandlung hin könnte mit einer UV-bedingten Schädigung des Photosyntheseapparates zusammenhängen. Von Strid et al. (1990) wurde z.B. beobachtet, daß durch erhöhte UV-B Strahlung die Aktivität der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase abnahm. Um den photosynthetischen CO_2 -Einbau dennoch aufrechterhalten zu können, wird vermutlich die CA-Aktivität erhöht. Bei cv. Bel B war dieses Enzym bei den

Kontrollen vorhanden und wurde durch die UV-Exposition nicht beeinflusst. Durch Ozon-Behandlung jedoch wurde die Carboanhydrase bei cv. Bel B reprimiert (O_3 R-6, vgl. Tab. 14). Bei cv. Bel W3 war dieses Protein durch Coomassie-Blau Färbung nicht detektierbar.

Potentielle globale Klimaveränderungen, die u.a. mit einer Zunahme der CO_2 -Konzentration verbunden sind (Amthor, 1995), haben das Interesse an den Mechanismen erhöht, mit Hilfe derer Pflanzen auf einen CO_2 -Anstieg reagieren. Raines et al. (1992) zeigten auf mRNA-Ebene, daß die CA-Gehalte in Blättern von *Arabidopsis*-Pflanzen, die unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen ($600 \mu\text{l/l}$) aufgezogen worden waren, im Vergleich zu Kontrollpflanzen (Anzucht bei $300 \mu\text{l/l}$ CO_2) erhöht waren. Einige Algen wie die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* besitzen neben der intrazellulären (vermutlich in den Chloroplasten lokalisierten) CA auch eine extrazelluläre CA (Coleman et al., 1984). Die Autoren fanden unter erhöhten CO_2 -Konzentrationen (3 %) im Vergleich zu den Kontrollen (0.03 % CO_2) signifikant geringere Mengen der extrazellulären Carboanhydrase. In einer neuen Studie von Protoschill-Krebs et al. (1995) wurde bei verschiedenen CO_2 -Wachstumsbedingungen die Umsetzung von Carbonylsulfid (COS) durch *Chlamydomonas reinhardtii* und die Aktivität der Carboanhydrase untersucht. Es wurde gezeigt, daß unter Anzuchsbedingungen bei niedrigen CO_2 -Konzentrationen (0.03 %) die Aktivität der Carboanhydrase deutlich höher war als bei erhöhten CO_2 -Bedingungen (3 %) (Protoschill-Krebs et al., 1995). Parallel dazu wurde ein höherer COS-Verbrauch und CO_2 -Umsatz durch *Chlamydomonas reinhardtii* festgestellt. Demnach besitzt das Enzym Carboanhydrase die Fähigkeit, seine Aktivität an verschiedene ambiente CO_2 -Konzentrationen anzupassen. Zu berücksichtigen ist jedoch, daß die CA-Sequenzen von Algen eine höhere Homologie zu tierischen CA Isoenzymen aufweisen als zu den Carboanhydrasen höherer Pflanzen, die untereinander zu ca. 70 % übereinstimmen (Fukuzawa et al., 1990).

Reaktionen von biochemischen Parametern unter Freiland-Bedingungen

In der vorliegenden Arbeit wurden Klimakammer-Versuche zu O_3 , UV-B und Starklichteffekten durchgeführt, um Informationen zur Vorbereitung von Freiland-Experimenten zu erhalten. In Freilandversuchen wurden cv. Bel W3-Pflanzen verwendet, die aus dem gleichen Samenmaterial angezogen worden waren, wie die zuvor in Klimakammerexperimenten eingesetzten Pflanzen. Sie wurden jeweils 14 Tage auf dem Versuchsfeld der Universität Gießen in Fürth/Odenwald exponiert (s. II.5., Abb. 4). In diesem Versuch war es aus Platzgründen leider nicht möglich, ozontolerante Pflanzen des Kultivars Bel B gleichzeitig zu exponieren. Der alleinige Einsatz von cv. Bel W3 (ohne Kontrollmöglichkeit durch Bel B) ist jedoch in der

Praxis des aktiven Biomonitorings bei Einsatz von Tabak durchaus üblich (s. z.B. Ozonwirkungsmessungen des Bayerischen Landesamtes für Umweltschutz / LfU, 1994). Da Bel W3 ozonspezifisch reagiert (s. I. 3.2. und III. 1.), sind die beobachteten Blattschäden im Freiland auf ambientes Ozon zurückzuführen. Die Symptome dieser Pflanzen im Freiland waren mit Schädigungswerten bis zu 60 % der Gesamtblattfläche deutlich ausgeprägt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität der β -1,3-Glucanase in mittelalten Blättern von Freilandpflanzen nachgewiesen. Die Enzymaktivitätswerte waren im Vergleich zu Kammerexperimenten erhöht (bis zu dreifach). Über den gesamten Expositionszeitraum von Mai bis September 1994 betrachtet war ein ähnlicher Verlauf der β -1,3-Glucanase-Aktivitätswerte wie der Schäden zu beobachten. Eine Untersuchung der ACC- und MACC-Konzentrationen ergab im Freilandversuch ebenfalls erhöhte Werte. Die Unterschiede der biochemischen Analysewerte in Abhängigkeit von der jeweiligen Periode sind auf verschiedene Einflußparameter im Freiland wie z.B. Temperatur- und Feuchtigkeitswerte, solare Bestrahlungsstärke, O_3 -, NO_2 -Konzentrationen etc. zurückzuführen. Wie in Kammerexperimenten gezeigt (s. III. 3.2.1., Abb. 28), bewirkt z.B. eine Kombination von O_3 und NO_2 eine Erhöhung der O_3 -abhängigen Akkumulation der β -1,3-Glucanase-Proteinmenge.

Ein Vergleich des Verlaufs der gemessenen ambienten Ozonkonzentration und -dosis (7 h, 8 h, 12 h und 24 h Mittelwerte und Dosiswerte) mit dem Verhalten der biochemischen Meßparameter ergab, daß zwei deutliche Peak-Phasen der Ozonwerte im Hochsommer (Juli, August) auch bei den biochemischen Daten vorzufinden waren. Demnach können vermutlich die Veränderungen auf biochemischer Ebene zumindestens in diesen Monaten auf die erhöhten ambienten Ozonwerte zurückgeführt werden. Der erste kleinere Ozonpeak (Anfang Juli) spiegelte sich in gleichzeitigen Maximalwerten der MACC-Konzentrationen, der β -1,3-Glucanase-Aktivitätswerte und der Blattsymptome wider. Interessanterweise war ein zweiter größerer Peak ebenfalls bei den biochemischen Daten wiederzufinden. Bei genauer Betrachtung jedoch konnte man erkennen, daß die Ozonwerte erst Anfang August ihren Höhepunkt erreichten, während die Analysewerte bereits Ende Juli ihr Maximum überschritten hatten. Das läßt sich vermutlich damit erklären, daß Anfang August die hohen Ozonwerte zusammen mit Klimafaktoren (wie z.B. niedrige Luftfeuchtigkeit, hohe Lufttemperatur) auftraten, die einen Stomatenschluß verursachten (s. III. 6., Tab. 9). Das bewirkte eine geringere Ozonaufnahme und damit verbunden ein Absinken der Blattschädigung sowie der ozonabhängigen biochemischen Meßparameter der exponierten Pflanzen. Diese Beobachtung stimmt z.B. mit Ergebnissen von Tonneijck und Bugter (1991) überein, die feststellten, daß moderate Ozonkonzentrationen im Freiland bei gleichzeitiger niedriger Luftfeuchte größere Blattschäden verursachten als sehr hohe Ozonwerte.

Als Streßproteine wurden im Freiland bislang nur „Hitzeschockproteine“ (HSP) beschrieben (Lindquist und Craig, 1988). Den Autoren zufolge handelt es sich um evolutiv stark konservierte Peptide, die durch Umweltbedingungen, wie z.B. Hitze, Schwermetalle, osmotischer Streß, UV-C etc. induziert werden können. Sie können grob in hochmolekulare (ca. 68-110 kDa bei höheren Pflanzen) und niedermolekulare (15-36 kDa) Hitzeschockproteine eingeteilt werden (Gifford und Taleisnik, 1994). In höheren Pflanzen akkumulieren vorwiegend die niedermolekularen Proteine als Antwort z.B. auf Überschreitungen der normalen Wachstumstemperatur (DeRocher et al., 1991) oder auf andere Streßfaktoren, wie z.B. Behandlung mit Arsenit oder Cadmium (Edelman et al., 1988). Die Induktion wird als sehr rasch beschrieben (Reaktion auf RNA-Niveau innerhalb von 15 min, Edelman et al., 1988). Die Halbwertszeit der durch eine vierstündige Hitzebehandlung von *Pisum sativum* induzierten HS-Proteine wurde z.B. von DeRocher et al. (1991) mit ca. 40 h angegeben. Zur Akkumulation von Hitzeschockproteinen unter Freilandbedingungen gibt es bis jetzt nur wenige Studien. Hernandez und Vierling (1993) zeigten im Freiland bei verschiedenen Leguminosen-Arten einen unterschiedlichen Induktionsgrad von niedermolekularen HS-Proteinen in verschiedenen Organen. Die HS-Proteine akkumulierten vorwiegend in Samen und Blüten und in geringerem Maße auch in Blättern. Die Autoren weisen auf eine z.T. entwicklungsbedingte Expressierung hin.

Die Induktion des PR-Proteins β -1,3-Glucanase in Tabakpflanzen im Freiland wurde hier erstmals beschrieben. Für zukünftige Untersuchungen wäre es sehr interessant, Freilandstudien (z.B. im Odenwald) über *mehrere* Vegetationsperioden hinweg unter Einbeziehung von Tabakpflanzen des Kultivars Bel B durchzuführen und die Analysen auf verschiedene PR- und HS-Proteine in Korrelation mit Umweltparametern (wie Ozon, Strahlung, Temperatur etc.) auszudehnen.

V. Zusammenfassung

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) des ozonsensitiven Kultivars Bel W3 und des ozontoleranten Kultivars Bel B wurden in Expositions-kammern in kurzzeitigen Perioden mit Ozon bzw. mit UV-B einzeln oder in Kombination behandelt. Bei UV-B Exposition wurde die spektrale Bestrahlungsstärke durch Einsatz verschiedener Kantenfilter variiert. Die Proteinmuster der Blätter wurden auf Veränderungen hin untersucht, die in Abhängigkeit von dem jeweiligen Streßfaktor auftraten. Aus den Untersuchungen wird gefolgert, daß die Induktion von „Streßproteinen“, vor allem von PR-Proteinen eine wichtige Reaktion von Pflanzen auf Ozon und UV-B darstellt. Insbesondere Proteine im Apoplasten, aber auch Proteine in Gesamtblattextrakten werden von den abiotischen Streßfaktoren beeinflusst.

1.) Es konnte gezeigt werden, daß Ozon Veränderungen von fünf Proteinen in der interzellulären Waschflüssigkeit im Molekulargewichtsbereich von 4 bis 35 kDa hervorruft (O_3R-1 - O_3R-5). Es wurde u.a. die Technik der Mikrosequenzanalyse benutzt, um drei dieser O_3 -related Proteine näher zu charakterisieren. Den Aminosäuresequenzen und dem Molekulargewicht zufolge handelt es sich bei den O_3 -related Proteinen von 25 kDa und 26 kDa (O_3R-2 und O_3R-3) um Monomere einer Germin-ähnlichen Oxalatoxidase. Dieses Enzym katalysiert die Umsetzung von Oxalsäure und Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid und Kohlenstoffdioxid und wurde hier erstmals im Apoplasten von Tabakpflanzen nachgewiesen. Es gelang, die Enzymaktivität der Oxalatoxidase durch Aktivitätsfärbung auf Nitrozellulose-Blots zu detektieren. Ozon bewirkte eine Reprimierung der Oxalatoxidase-Aktivität. Damit ist es neben der Diaminoxidase in Leguminosen das zweite apoplastische Enzym, das H_2O_2 produziert und durch Ozon gehemmt wird.

Die Peptidsequenzen des O_3 -related Proteins von 28 kDa (O_3R-4) stimmten mit durch Trypsin-Verdau freisetzbaren Peptiden einer sauren Chitinase-Isoform (PR-3b (II)) überein. Dieses Protein konnte immunologisch mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert werden.

Das Proteinmuster in der IWF von unbehandelten Kontrollpflanzen war bei beiden Kultivaren sehr ähnlich. Ein Protein bei ca. 21 kDa war Kultivar-spezifisch und trat nur bei cv. Bel B auf. Es wurde durch Ozon nicht beeinflusst. Sequenzanalysen ergaben Ähnlichkeiten einzelner Peptidsequenzen zu einem Initiationsfaktor der Proteinbiosynthese und zu einer Ubiquitin-Protein-Ligase.

2.) Ozonbehandlung führte zu einer Induktion der β -1,3-Glucanase in beiden, ozonsensitiven (Bel W3) und -toleranten (Bel B) Kultivaren, während Chitinase nur bei cv. Bel W3 auf Ozonbehandlung hin akkumulierte. Die Ozon-Induktion spiegelte sich nicht nur in erhöhten Enzymaktivitäten, sondern auch in einer Zunahme der Proteinmengen dieser Enzyme wider. Dies spricht für eine ozonbedingte de-novo Synthese dieser PR-Proteine. Dabei ging aus Western-Blot Analysen hervor, daß insbesondere eine basische Isoform bei 33 kDa für β -1,3-Glucanase und zwei basische Isoformen bei 32 und 34 kDa für Chitinase induziert wurden. Ozon-Exposition und anschließende Infektion von Tabakpflanzen cv. Bel W3 mit *Botrytis cinerea* führte zu einer im Vergleich zu alleiniger Ozonbehandlung verstärkten Expression der gleichen Isoformen. Um eine Quantifizierung der Proteinmengen dieser Enzyme zu erreichen, wurde als Nachweismethode eine Sandwich-ELISA-Technik etabliert. Die Quantifizierung erfolgte durch Eichung mit Hilfe der betreffenden Antigene. Mit dieser Technik ergaben sich durch Ozonbehandlung bis zu 70fach (cv. Bel W3) bzw. 11fach (cv. Bel B) erhöhte β -1,3-Glucanase- und bis zu siebenfach (cv. Bel W3) gesteigerte Chitinase-Proteinmengen im Vergleich zu den in Reinluft gehaltenen Kontrollen.

3.) In kombinierten Behandlungen mit Ozon und UV-B (cut-off Wellenlänge bei 293 nm) war die spektrale Verteilung der Strahlung auf Pflanzenniveau besonders im UV-B Bereich dem Sonnenspektrum sehr ähnlich. UV-B Strahlung allein führte bei realistisch simulierten solaren Strahlungsbedingungen nur bei den älteren Blättern von cv. Bel W3 zu (bis zu 19fach) erhöhten β -1,3-Glucanase-Proteinmengen, hatte aber keinen Einfluß auf die Chitinase-Proteinmengen. Eine simultane UV-B- Behandlung verstärkte die ozonabhängige Nekrosen-Bildung (bis zu dreifach). Die ozonbedingte Induktion der β -1,3-Glucanase-Proteinmenge wurde bei beiden Kultivaren durch zusätzliche UV-B-Behandlung nicht wesentlich verändert. Dagegen wurde die Akkumulation des Chitinase-Proteins bei dem sensitiven Kultivar Bel W3 deutlich reduziert (um ca. 60 %). Daraus läßt sich ableiten, daß basische β -1,3-Glucanase und Chitinase bei Behandlung mit Ozon und UV-B nicht wie bei Pathogen-infizierten Pflanzen koordiniert reguliert werden.

4.) UV-Behandlung unter Einsatz verschiedener Kantenfilter bewirkte eine bis zu 10fache Induktion der β -1,3-Glucanase- und der Chitinase-Enzymaktivität bei cut-off Wellenlängen von 277 nm und 287 nm, jedoch keine Reaktion bei 293 nm und bei 312 nm (Kontrolle). Daraus läßt sich ableiten, daß eine Schwelle für die Induktion von PR-Proteinen existiert. Diese liegt in der Nähe der Absorptionskante von stratosphärischem Ozon.

Aus zweidimensionalen Protein-Auftrennungen ging hervor, daß bei cv. Bel W3 ein Protein von ca. 30 kDa und einem isoelektrischen Punkt von ca. 6 bei den cut-off Wellenlängen 287 nm und 293 nm im Vergleich zu 312 nm induziert war (UVR-1). Das gleiche Protein war bei cv. Bel B unabhängig von der Behandlung stets vorhanden. Molekulargewicht, IEP und Teilpeptidsequenzen dieses Proteins (ca. 9 % der Gesamtsequenz) weisen darauf hin, daß es sich dabei um eine Carboanhydrase handelt.

5.) Freilandversuche mit Tabakpflanzen (cv. Bel W3) wurden von Mai bis September 1994 in Fürth/Odenwald durchgeführt und bestanden aus insgesamt 15 jeweils 14tägigen Expositionsperioden. Die Untersuchungen zeigten, daß diese Pflanzen im Freiland sehr empfindlich (mit Blattschäden bis zu 60 %) auf Ozon reagierten. Es wurde erstmals die Aktivität der β -1,3-Glucanase in Freilandpflanzen nachgewiesen. Die Enzymaktivitäten waren in mittelalten Blättern deutlich und im Vergleich zu Expositions-kammerexperimenten wesentlich stärker (bis zu dreifach) induziert. Über den gesamten Expositionszeitraum betrachtet war der Verlauf der β -1,3-Glucanase-Aktivitäten und der Schäden sehr ähnlich. Die ACC- und MACC-Werte waren gegenüber Kammerversuchen erhöht. Die MACC-Gehalte zeigten ähnliche Maxima und Minima wie die β -1,3-Glucanase-Aktivitäten. Ein Vergleich der biochemischen Daten mit den ambienten Ozonkonzentrationen ergab eine Übereinstimmung in hochsommerlichen Peak-Phasen. Es wurden damit erste Anhaltspunkte gewonnen, daß Ozon auch im Freiland als abiotischer Induktor von biochemischen Antworten bei Tabak gewertet werden kann.

VI. Literatur

- Agrawal M, Agrawal SB, Krizek DT, Kramer GF, Lee EH, Mirecki RM, Rowland RA (1991) Physiological and morphological responses of snapbean plants to ozone stress as influenced by pretreatment with UV-B radiation. In YP Abrol, PN Wattal, A Gnanam, JA Govindjee, DR Ort, AH Teramura, eds, *Impact of Global Climatic Changes on Photosynthesis and Plant Productivity*. Oxford und IBH Publishing Company, New Delhi, Indien, pp 133-146
- Ahl P, Cornu A, Gianinazzi S (1982) Soluble proteins as genetic markers in studies of resistance and phylogeny in *Nicotiana*. *Phytopathology* 72: 80-85
- Akers A, Köhle HH, Gold RE (1990) Uptake, transport and mode of action of BAS 480 F, a new triazole fungicide. In *The British Crop Protection Council, ed, Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, Vol 2*. BCPC Publications, Farnham, Großbritannien, pp 837-845
- Allen G (1989) Sequencing of proteins and peptides. Deduction of the total primary structure of a protein from the sequences of constituent peptides. In RH Burdon, PH van Knippenberg, eds, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol 9*. Elsevier, Amsterdam, pp 327-333
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Ammermann E, Janssen B, Karbach S, Löcher F, Lorenz G, Meyer N (1990) BAS 480 F, a new broad spectrum fungicide. In *The British Crop Protection Council, ed, Brighton Crop Protection Conference - Pests and Diseases, Vol 2*. BCPC Publications, Farnham, Großbritannien, pp 407-414
- Amthor JS (1995) Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric [CO₂] in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biol* 1: 243-274
- Andresen I, Becker W, Schlüter K, Burges J, Parthier B, Apel K (1992) The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Mol Biol* 19: 193-204

- Andrews JT, Lorimer GM (1987) Rubisco: structure, mechanism and prospects for improvement. In MD Hatch, NK Boardman, eds, *The Biochemistry of Plants*, Vol 10. Academic Press, New York, USA, pp 132-219
- Anegg S (1995) Effekte von Ozon auf den Befall von Tabakpflanzen mit *Botrytis cinerea*. Diplomarbeit, LMU München
- Apostol I, Heinstein PF, Low PS (1989) Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiol* 90: 109-116
- Arlbaud M, Paynot M, Burtin D, Rossin N, Dumas E, Martin-Tanguy J, Gianinazzi S (1990) Pathogenesis-related (b) proteins, conjugated amines and morphogenesis of tobacco leaf explants. In HE Flores, RN Arteca, JC Shannon, eds, *Polyamines and Ethylene: Biochemistry, Physiology and Interactions*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp 373-376
- Arnott HJ (1983) Three systems of biomineralization in plants with comments on the associated organic matrix. In GH Nancollas, *Biological Mineralization and Demineralization*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 199-218
- Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235-241
- Badger MR, Price GD (1994) The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 369-392
- Bahl A, Kahl G (1995) Air pollutant stress changes the steady-state transcript levels of three photosynthesis genes. *Environ Pollut* 88: 57-65
- Bahl A, Loitsch SM, Kahl G (1995) Transcriptional activation of plant defence genes by short-term air pollutant stress. *Environ Pollut* 89: 221-227
- Baker JT, Allen LH (1994) Assessment of the impact of rising carbon dioxide and other potential climate changes on vegetation. *Environ Pollut* 83: 223-235
- Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz GP, Lauridsen JB, Celis JE (1989) Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7701-7705

- Bazzaz FA (1990) The response of natural ecosystems to the rising global CO₂ levels. *Annu Rev Ecol Syst* 21: 167-196
- Becker F, Buschfeld E, Schell J, Bachmair A (1993) Altered response to viral infection by tobacco plants perturbed in ubiquitin system. *Plant J* 3: 875-881
- Besford RT, Ludwig LJ, Withers AC (1990) The greenhouse effect: acclimation of tomato plants growing in high CO₂, photosynthesis and ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase protein. *J Exp Bot* 41: 925-931
- Blumthaler M, Ambach W (1990) Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in alpine regions. *Science* 248: 206-208
- Bol JF (1988) Structure and expression of plant genes encoding pathogenesis-related proteins. In DPS Verma, RB Goldberg, eds, *Plant Gene Research, Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes*. Springer-Verlag, Wien/New York, pp 201-221
- Bol JF, Linthorst HJM, Cornelissen BJC (1990) Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annu Rev Phytopathol* 28: 113-38
- Boller T (1993) Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and β -1,3-glucanase. In B Fritig, M Legrand, eds, *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers, Niederlande, pp 391-400
- Boller T (1988) Ethylene and the regulation of antifungal hydrolases in plants. *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol* 5: 145-174
- Boller T (1985) Induction of hydrolases as a defense reaction against pathogens. *UCLA Symp Mol Cell Biol New Ser* 22: 247-262
- Boller T, Gehri A, Mauch F, Vögeli U (1983) Chitinase in bean leaves: induction by ethylene. Purification, properties, and possible function. *Planta* 157: 22-31
- Boller T, Métraux JP (1988) Extracellular localization of chitinase in cucumber. *Physiol Mol Plant Pathol* 33: 11-16
- Booker FL, Fiscus EL, Philbeck RB, Heagle AS, Miller JE, Heck WW (1992b) A supplemental ultraviolet-B radiation system for open-top field chambers. *J Environ Qual* 21: 56-61

- Booker FL, Miller JE, Fiscus L (1992a) Effects of ozone and UV-B radiation on pigments, biomass and peroxidase activity in soybean. In RL Berglund, ed, *Tropospheric Ozone II: Effects, Modeling and Control*, Transaction Series 20. Air and Waste Management Association, Pittsburgh, USA, pp 489-503
- Bornman JF, Teramura AH (1993) Effects of ultraviolet-B radiation on terrestrial plants. In AR Young, LO Björn, J Moan, W Nultsch, eds, *Environmental UV photobiology*. Plenum Press, New York, USA, pp 427-471
- Bors W, Langebartels C, Michel C, Sandermann H (1989) Polyamines as radical scavengers and protectants against ozone damage. *Phytochemistry* 28: 1589-1595
- Bowler C, van Montagu M, Inzé D (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 43: 83-116
- Bowles DJ (1990) Defence-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* 59: 873-907
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30
- Bravo R (1984) Two-dimensional gel electrophoresis: a guide for the beginner. In JE Celis, R Bravo, eds, *Two-dimensional Gel Electrophoresis of proteins*. Academic Press, Orlando, USA, pp 3-36
- Brederode FT, Linthorst HJM, Bol JF (1991) Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. *Plant Mol Biol* 17: 1117-1125
- Burnell JN (1990) Immunological studies of carbonic anhydrase in C₃ and C₄ plants using antibodies to maize cytosolic and spinach carbonic anhydrase. *Plant Cell Physiol* 31: 423-427
- Burnell JN, Gibbs MJ, Mason JG (1990) Spinach chloroplastic carbonic anhydrase. Nucleotide sequence analysis of cDNA. *Plant Physiol* 92: 37-40
- Caldwell MM (1971) Solar UV irradiation and the growth and development of higher plants. In AC Giese, ed, *Photophysiology*, Vol IV. Academic Press, New York, USA, pp 131-268

- Castillo FJ, Greppin H (1986) Balance between anionic and cationic extracellular peroxidase activities in *Sedum album* leaves after ozone exposure. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Physiol Plant* 68: 201-208
- Castillo FJ, Greppin H (1988) Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environ Exp Bot* 28: 231-238
- Castillo FJ, Müller PR, Greppin H (1987) Waldsterben, Part IV. Extracellular biochemical markers of photochemical oxidant air pollution damage to Norway spruce. *Experientia* 43: 111-115
- Chameides WL (1989) The chemistry of ozone deposition to plant leaves: Role of ascorbic acid. *Environ Sci Technol* 23: 595-600
- Chiriboga J (1966) Purification and properties of oxalic acid oxidase. *Arch Biochem Biophys* 116: 516-523
- Cohen Y, Niderman T, Mössinger E, Fluhr R (1994) β -Aminobutyric acid induces the accumulation of pathogenesis-related proteins in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and resistance to late blight infection caused by *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol* 104: 59-66
- Coleman JR, Berry JA, Togasaki RK, Grossman AR (1984) Identification of extracellular carbonic anhydrase of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 76: 472-477
- Collinge DB, Kragh KM, Mikkelsen JD, Nielsen KK, Rasmussen U, Vad K (1993) Plant chitinases. *Plant J* 3: 31-40
- Conklin PL, Last RL (1995) Differential accumulation of antioxidant mRNAs in *Arabidopsis thaliana* exposed to ozone. *Plant Physiol* 109: 203-212
- Cornelissen BJC, Horowitz J, Van Kan JAL, Goldberg RB, Bol JF (1987) Structure of tobacco genes encoding pathogenesis-related proteins from the PR-1 group. *Nucl Acids Res* 15: 6799-6811
- Cornelius R, Faensen-Thiebes A, Meyer G (1985) Immissions- und Wirkungserfassung in einem Berliner Bioindikationsprogramm: Einsatz von *Nicotiana tabacum* L. *Beitr W3. Staub-Reinhalt Luft* 45: 59-61

- Dann MS (1988) Impact of ozone on the activity and quantity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in potato foliage and its relation to premature senescence. Doktorarbeit, The Pennsylvania State University, Pennsylvania, USA
- Dann MS, Pell EJ (1989) Decline of activity and quantity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and net photosynthesis in ozone-treated potato foliage. *Plant Physiol* 91: 427-432
- De Jong AJ, Cordewener J, Lo Schiavo F, Terzi M, Vandekerckhove J, Van Kammen A, De Vries SC (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4: 425-433
- De Jong AJ, Heidstra R, Spaink HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T, Lo Schiavo F, Terzi M, Bisseling T, Van Kammen A, De Vries SC (1993) *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* 5: 615-620
- De Laat AMM, Van Loon LC (1983) The relationship between stimulated ethylene production and symptom expression in virus-infected tobacco leaves. *Physiol Plant Pathol* 22: 261-273
- DeRocher AE, Helm KW, Lauzon LM, Vierling E (1991) Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiol* 96: 1038-1047
- Devlin WS, Gustine DL (1992) Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiol* 100: 1189-1195
- Dixon DC, Cutt JR, Klessig DF (1991) Differential targeting of the tobacco PR-1 pathogenesis-related proteins to the extracellular space and vacuoles of crystal idioblasts. *EMBO J* 10: 1317-1324
- Dixon RA, Harrison MJ, Lamb CJ (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev Phytopathol* 32: 479-501
- Dohmen GP, Koppers A, Langebartels C (1990) Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: effects on amino acid, glutathione and polyamine titers. *Environ Pollut* 64: 375-383

- Döhning T, Köfferlein M, Payer HD, Seidlitz HK, Thiel S (1994) Simulation von Globalstrahlung in Expositionskammern. In Gesellschaft für Umweltsimulation, ed, Umwelteinflüsse - erfassen, simulieren, bewerten. Tagungsband zur 23. Jahrestagung der Gesellschaft für Umweltsimulation, 9.-11. März 1994, Pfinztal/Deutschland, pp 257-269
- Döhning T, Köfferlein M, Thiel S, Seidlitz H (1996) Spectral shaping of artificial UV-B irradiation for vegetation stress research. J Plant Physiol, im Druck
- Domon JM, Dumas B, Lainé E, Meyer Y, David A, David H (1995) Three glycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. Plant Physiol 108: 141-148
- Dumas B, Sailland A, Cheviet J-P, Freyssinet G, Pallet K (1993) Identification of barley oxalate oxidase as a germin-like protein. C R Acad Sci Paris, Life Sci 316: 793-798
- Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. Science 268: 667-675
- Eckey H (1992) Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen Ozon-induzierter Abwehrreaktionen in Petersilie (*Petroselinum crispum* L.). Doktorarbeit, LMU München
- Eckey-Kaltenbach H, Ernst D, Heller W, Sandermann H (1994) Biochemical plant responses to ozone. IV. Cross-induction of defensive pathways in parsley (*Petroselinum crispum* L.) plants. Plant Physiol 104: 67-74
- Edelman L, Czarnecka E, Key JL (1988) Induction and accumulation of heat shock-specific poly(A⁺)RNAs and proteins in soybean seedlings during arsenite and cadmium treatments. Plant Physiol 86: 1048-1056
- Elstner EF (1988) Schadstoffe, die über die Luft zugeführt werden. In B Hock, EF Elstner, eds, Schadwirkungen auf Pflanzen. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, pp 67-95
- Enquete Kommission (1992) Klimaänderung gefährdet globale Entwicklung. Zukunft sichern - Jetzt handeln. Bericht der Enquete-Kommission „Schutz der Erdatmosphäre“ des 12. Deutschen Bundestages, Economica Verlag, Bonn

- Enquete-Kommission (1991) Schutz der Erde. Eine Bestandsaufnahme mit Vorschlägen zu einer neuen Energiepolitik. Bericht der Enquete-Kommission „Vorsorge zum Schutz der Erdatmosphäre“ des 11. Deutschen Bundestages, Teilbände I und II, Economica Verlag, Bonn
- Enquete-Kommission (1994) Schutz der Grünen Erde. Klimaschutz durch umweltgerechte Landwirtschaft und Erhalt der Wälder. Bericht der Enquete-Kommission „Schutz der Erdatmosphäre“ des 12. Deutschen Bundestages, Economica Verlag, Bonn
- Ernst D, Bodemann A, Schmelzer E, Langebartels C, Sandermann H (1996) β -1,3-Glucanase mRNA is locally, but not systemically induced in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bel W3 after ozone fumigation. *J Plant Physiol*, im Druck
- Ernst D, Schraudner M, Langebartels C, Sandermann C (1992) Ozone-induced changes of mRNA levels of β -1,3-glucanase, chitinase and pathogenesis-related protein 1b in tobacco plants. *Plant Mol Biol* 20: 673-682
- Evans NA, Hoyne PA (1984) Characteristics and specificity of the interactions of fluorochrome from aniline blue (Sirofluor) with polysaccharides. *Carbohyd Polym* 4: 215-230
- Faensen-Thiebes A (1983) Veränderungen im Gaswechsel. Chlorophyllgehalt und Zuwachs von *Nicotiana tabacum* L. und *Phaseolus vulgaris* L. durch Ozon und deren Beziehung zur Ausbildung von Blattnekrosen. *Angew Bot* 57: 181-191
- Feder WA, Shrier R (1990) Combination of UV-B and ozone reduces pollen tube growth more than either stress alone. *Environ Exp Bot* 30: 451-454
- Federico R, Angelini R (1986) Occurrence of diamine oxidase in the apoplast of pea epicotyls. *Planta* 167: 300-302
- Felix G, Meins F (1985) Purification, immunoassay and characterization of an abundant, cytokinin-regulated polypeptide in cultured tobacco tissues. *Planta* 164: 423-428
- Felix G, Meins F (1986) Developmental and hormonal regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 167: 206-211
- Felix G, Meins F (1987) Ethylene regulation of β -1,3-glucanase in tobacco. *Planta* 172: 386-392

- Fink S (1991) Unusual patterns in the distribution of calcium oxalate in spruce needles and their possible relationships to the impact of pollutants. *New Phytol* 119: 41-51
- Fink W, Liefland M, Mendgen K (1988) Chitinases and β -1,3-glucanases in the apoplastic compartment of oat leaves (*Avena sativa* L.). *Plant Physiol* 88: 270-275
- Flint SD, Caldwell MM (1984) Partial inhibition of in vitro pollen germination by simulated solar ultraviolet-B radiation. *Ecology* 65: 792-795
- Foyer CH, Descourvières P, Kunert KJ (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ* 17: 507-523
- Foyer CH, Lelandais M, Kunert KJ (1994) Photooxidative stress in plants. *Physiol Plant* 92: 696-717
- Frederick JE, Erlick C (1995) Trends and interannual variations in erythral sunlight, 1978-1993. *Photochem Photobiol* 62: 476-484
- Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Chakraborty S, Schopfer LM, Massey V (1990) Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J Biol Chem* 265: 3793-3802
- Fritig B, Rouster J, Kauffmann S, Stintzi A, Geoffroy P, Kopp M, Legrand M (1989) Virus-induced glycanhydrolases and effects of oligosaccharide signals on plant-virus interactions. In BJJ Lugenberg, ed, *Signal Molecules in Plants and Plant-Microbe Interactions*. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 161-168
- Fukuzawa H, Fujiwara S, Yamamoto Y, Dionisio-Sese ML, Miyachi S (1990) cDNA cloning, sequence, and expression of carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*: Regulation by environmental CO_2 concentration. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4383-4387
- Gay AP, Hauck B (1994) Acclimation of *Lolium temulentum* to enhanced carbon dioxide concentration. *J Exp Bot* 45: 1133-1141

- Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1990) Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* 3: 327-333
- Gianinazzi S, Martin C, Vallée J-C (1970) Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana Xanthi* n.c. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. *C R Acad Sci Paris* 270D: 2383-2386
- Gifford DJ, Taleisnik E (1994) Heat-shock response of *Pinus* and *Picea* seedlings. *Tree Physiol* 14: 1003-110
- Gillham DJ, Dodge AD (1986) Hydrogen-peroxide-scavenging systems within pea chloroplasts. *Planta* 167: 246-251
- Graf U (1993) Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen bei *Nicotiana tabacum* L. durch Ozonbehandlung mit umweltrelevanten Konzentrationen. Diplomarbeit, TU München
- Graham D, Reed ML, Patterson BD, Hockley DG (1984) Chemical properties, distribution and physiology of plant and animal carbonic anhydrases. *Ann NY Acad Sci* 429: 222-237
- Green R, Fluhr R (1995) UV-B induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* 7: 203-212
- Grünhage L, Dämmgen U, Haenel HD, Jäger HJ, Holl A, Schmitt J, Hanewald K (1993) A new potential air-quality criterion derived from vertical flux densities of ozone and from plant response. *Angew Bot* 67: 9-13
- Grünhage L, Herm K, Hanewald K, Jäger HJ (1992) Auswirkungen von Ozon auf Pflanzen - Bewertung hessischer Ozonprofile. Hessische Landesanstalt für Umwelt, Heft 143, Wiesbaden
- Guderian R (1985) Air pollution by photochemical oxidants: formation, transport, control and effects on plant. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg
- Hahlbrock K, Scheel D (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 40: 347-369
- Heagle AS (1989) Ozone and crop yield. *Annu Rev Phytopathol* 27: 397-423

- Heath RL (1987) The biochemistry of ozone attack on the plasma membrane of plant cells. *Adv Phytochem* 21: 29-53
- Heck WW (1968) Factors influencing expression of oxidant damage to plants. *Annu Rev Phytopath* 6: 165-188
- Heck WW, Heagle AS, Shriner DS (1988) Assessment of crop loss from air pollutants. Elsevier, London, Großbritannien
- Heggestad HE (1991) Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut* 74: 264-291
- 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
- Heitz T, Geoffroy P, Fritig B, Legrand M (1991) Two apoplastic α -amylases are induced in tobacco by virus infection. *Plant Physiol* 97: 651-656
- Heitz T, Geoffroy P, Stintzi S, Fritig B, Legrand M (1993) cDNA cloning and gene expression analysis of the microbial proteinase inhibitor of tobacco. *J Biol Chem* 268: 16987-16992
- Hernandez LD, Vierling E (1993) Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field conditions. *Plant Physiol* 101: 1209-1216
- Hogue R, Asselin A (1987) Detection of 10 additional pathogenesis-related (*b*) proteins in intercellular fluid extracts from stressed 'Xanthi-nc' tobacco leaf tissue. *Can J Bot* 65: 476-481
- Hunte C, Janßen M, Schulz M, Traub O, Willecke K, Schnabl H (1993) Age-dependent modifications and further localization of the CX 26-like protein from *Vicia faba* L. *Bot Acta* 106: 207-212
- Hurkman WJ, Tanaka CK (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol* 81: 802-806
- Jakobek JL, Lindgren PB (1993) Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell* 5: 49-56

- Jentsch S (1992) The ubiquitin-conjugation system. *Annu Rev Genet* 26: 179-207
- Jones AM (1994) Surprising signals in plant cells. *Science* 263: 183-184
- Jordan BR, Chow WS, Strid WS, Anderson JM (1991) Reduction in cab and psb A RNA transcripts in response to supplementary ultraviolet-B radiation. *FEBS Lett* 284: 453-458
- Jung J-L, Fritig B, Hahne G (1993) Sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogenesis-related proteins. Induction by aspirin (acetylsalicylic acid) and characterization. *Plant Physiol* 101: 873-880
- Jungblut TP, Schnitzler JP, Heller W, Hertkorn N, Metzger JW, Szymczak W, Sandermann H (1995) Die Strukturen UV-B-induzierter Sonnenschutzpigmente der Kiefer (*Pinus sylvestris* L.). *Angew Chem* 107: 376-378
- Kangasjärvi J, Talvinen J, Utriainen M, Karjalainen R (1994) Plant defence systems induced by ozone. *Plant Cell Environ* 17: 783-794
- Kärenlampi SO, Airaksinen K, Miettinen ATE, Kokko HI, Holopainen JK, Kärenlampi LV, Karjalainen RO (1994) Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce [*Picea abies* (Karst) L.]. *New Phytol* 126: 81-89
- Kauffmann S, Legrand M, Fritig B (1990) Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. *Plant Mol Biol* 14: 381-390
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucanase activity. *EMBO J* 6: 3209-3212
- Keefe D, Hinz U, Meins F (1990) The effect of ethylene on the cell-type-specific and intracellular localization of β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco leaves. *Planta* 182: 43-51
- Keen NT (1992) The molecular biology of disease resistance. *Plant Mol Biol* 19: 109-122
- Keitel A & Erhardt W (1987) Biomonitoring der Photooxidantienbelastung in Baden-Württemberg. *VDI-Berichte* 609: 445-62

- Kemp MS, Burden RS (1986) Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. *Phytochemistry* 25: 1261-1269
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 283-307
- Kerner K (1990) Biochemische und physiologische Untersuchungen zur unterschiedlichen Ozontoleranz der Tabaksorten (*Nicotiana tabacum* L.) Bel B und Bel W3. Doktorarbeit, LMU München
- Kerr JB, McElroy CT (1993) Evidence for large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262: 1032-1034
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J (1994) Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu Rev Phytopathol* 32: 439-459
- Kirsch C, Halhlbrock K, Kombrink E (1993) Purification and characterization of extracellular, acidic chitinase isoenzymes from elicitor-stimulated parsley cells. *Eur J Biochem* 213: 419-425
- Klessig DF, Malamy J (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* 26: 1439-1458
- Kley D, Klockow D (1989) Atmosphärische Prozesse und Deposition. In: Forschungsbeirat Waldschäden / Luftverunreinigungen, ed, Dritter Bericht. Forschungsbeirat Waldschäden/Luftverunreinigungen der Bundesregierung und der Länder, Kernforschungszentrum Karlsruhe, pp 113-254
- Kley D, Volz-Thomas A (1990) Die Belastung der Umwelt durch troposphärisches Ozon. Jahresbericht des Forschungszentrums Jülich GmbH, pp 25-35
- Knoester M, Bol JF, Van Loon LC, Linthorst HJM (1995) Virus-induced gene expression for enzymes of ethylene biosynthesis in hypersensitively reacting tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 177-180
- Kombrink E, Hahlbrock K (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi: Timing and dose dependency of elicitor-induced reactions. *Plant Physiol* 81: 216-221

- Kombrink E, Schröder M, Hahlbrock K (1988) Several "pathogenesis-related" proteins in potato are β -1,3-glucanases and chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 782-786
- Köfflerlein M, Döhring T, Seidlitz HK, Payer HD (1995) Xenon lighting adjusted to plant requirements. In TW Tibbitts, ed, *Proceedings of the International Lighting in Controlled Environments Workshop*. NASA Conference Publication CP-3309, NASA Kennedy Space Center, Houston, USA, pp 229-241
- Körner C (1988) Does global increase of CO_2 alter stomatal density? *Flora* 181: 253-257
- Krizek DT, Kramer GF, Upadhyaya A, Mirecki RM (1993) UV-B response of cucumber seedlings grown under metal halide and high pressure sodium/deluxe lamps. *Physiol Plant* 88: 350-358
- Krupa SV, Grünhage L, Jäger HJ, Nosal M, Manning WJ, Legge AH, Hanewald K (1995) Ambient ozone (O_3) and adverse crop response: a unified view of cause and effect. *Environ Pollut* 87: 119-126
- Krupa SV, Kickert RN (1989) The greenhouse effect: Impacts of ultraviolet-B (UV-B) radiation, carbon dioxide (CO_2) and ozone (O_3) on vegetation. *Environ Pollut* 61: 263-393
- Krupa SV, Manning WJ, Nosal M (1993) Use of tobacco cultivars as biological indicators of ambient ozone pollution: an analysis of exposure-response relationships. *Environ Pollut* 81: 137-146
- Kuan IC, Tien M (1993) Stimulation of manganese peroxidase activity: a possible role for oxalate in lignin biodegradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1242-1246
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamb CJ, Lawton MA, Dron M, Dixon RA (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack. *Cell* 56: 215-224
- Landry LG, Pell EJ (1993) Structural modification of rubisco and altered proteolytic activity in O_3 -stressed hybrid poplar. *Plant Physiol* 101: 1355-1369

- Lane BG (1994) Oxalate, germin, and the extracellular matrix of higher plants. *FASEB J* 8: 294-301
- Lane BG, Cuming AC, Frégeau J, Carpita NC, Hurkman WJ, Bernier F, Dratewka-Kos E, Kennedy TD (1992) Germin isoforms are discrete temporal markers of wheat development. Pseudogermin is a uniquely thermostable water-soluble oligomeric protein in ungerminated embryos and like germin in germinated embryos, it is incorporated into cell walls. *Eur J Biochem* 209: 961-969
- Lane BG, Dunwell JM, Ray JA, Schmitt MR, Cuming AC (1993) Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem* 268: 12239-12242
- 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
- Langer B, Wellmann E (1990) Phytochrome induction of photoreactivating enzyme in *Phaseolus vulgaris* L. seedlings. *Photochem Photobiol* 52: 861-863
- Lawton K, Ward E, Payne G, Moyer M, Ryals J (1992) Acidic and basic class III chitinase mRNA accumulation in response to TMV infection of tobacco. *Plant Mol Biol* 19: 735-743
- Lee EH (1991) Plant resistance mechanisms to air pollutants: Rhythms in ascorbic acid production during growth under ozone stress. *Chronobiol Int* 8: 93-102
- Lee EH, Bennett JH (1982) Superoxide dismutase: A possible protective enzyme against ozone injury in snap beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* 69: 1444-1449
- Legrand M, Kauffmann S, Geoffroy P, Fritig B (1987) Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 6750-6754
- LfU (1994) Lufthygienischer Jahresbericht 1994. Schriftenreihe, Heft 133. Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, München

- Li Z-C, McClure JW, Hagerman AE (1989) Soluble and bound apoplastic activity for peroxidase, β -D-glucosidase, malate dehydrogenase, and nonspecific arylesterase, in barley (*Hordeum vulgare* L.) and oat (*Avena sativa* L.) primary leaves. *Plant Physiol* 90: 185-190
- Lindquist S, Craig EA (1988) The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677
- Linthorst HJM (1991) Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci* 10: 123-150
- Lizada MCC, Yang SF (1979) A simple and sensitive assay for 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Anal Biochem* 100: 140-145
- Luthe DS (1986) Measurement of oat globulin by radioimmunoassay. In HF Linskens, JF Jackson, eds, *Immunology in Plant Sciences*, Band 4. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp 231-246
- Luwe M, Heber U (1995) Ozone detoxification in the apoplast and symplast of spinach, broad bean and beech leaves at ambient and elevated concentrations of ozone in air. *Planta* 197: 448-455
- Luwe MWF, Takahama U, Heber U (1993) Role of ascorbate in detoxifying ozone in the apoplast of spinach (*Spinacia oleracea* L.) leaves. *Plant Physiol* 101: 969-976
- Madronich S (1992) Implications of recent total atmospheric ozone measurements for biologically active ultraviolet radiation reaching the earth's surface. *Geophys Res Lett* 19: 37-40
- Madronich S (1993) The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In AR Young, LO Björn, J Moan, W Nultsch, eds, *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press, New York, USA, pp 1-39
- Manning WJ, 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
- Matthews REF (1991) *Plant Virology*, 3rd edition, Harcourt Brace Jovanovich, San Diego, USA

- Mauch F, Dudler R (1993) Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiol* 102: 1193-1201
- Mauch F, Hadwiger LA, Boller T (1988a) Antifungal hydrolases in pea tissues. I. Purification and characterisation of two chitinases and two β -1,3-glucanases differentially regulated during development in response to fungal infection. *Plant Physiol* 87: 325-333
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T (1988b) Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol* 88: 936-942
- Mauch F, Meehl JB, Staehelin LA (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
- Mauch F, Staehelin LA (1989) Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1: 447-457
- Mauney JR, Lewin KF, Hendrey GR, Kimball BA (1992) Growth and yield of cotton exposed to free-air CO₂ enrichment (FACE). *Crit Rev Plant Sci* 11: 213-222
- McDougall GJ (1992) Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibres. *Phytochemistry* 31: 3385-3389
- McKersie BD, Leshem YY (1994) *Stress and Stress Coping in Cultivated Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande
- Mehdy MC (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* 105: 467-472
- Mehlhorn H (1990) Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. *Plant Cell Environ* 13: 971-976
- Mehlhorn H, O'Shea JM, Wellburn AR (1991) Atmospheric ozone interacts with stress ethylene formation by plants to cause visible plant injury. *J Exp Bot* 42: 17-24

- Meins F, Ahl P (1989) Induction of chitinase and β -1,3-glucanase in tobacco plants infected with *Pseudomonas tabaci* and *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Plant Sci 61: 155-161
- Meins F, Neuhaus JM, Spherisen C, Ryals J (1992) The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In T Boller, F Meins, eds, Genes Involved in Plant Defense. Springer-Verlag, Wien/New York, pp 245-282
- Melchers LS, Apotheker-de Groot M, Van der Kaap JA, Ponstein AS, Sela-Buurlage MB, Bol JF, Cornelissen BJC, Van den Elzen PJM, Linthorst HJM (1994) A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. Plant J 5: 469-480
- Melchers LS, Sela-Buurlage MB, Vloemans SA, Woloshuk CP, Van Roekel JSC, Pen J, Van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1993) Extracellular targeting of the vacuolar tobacco proteins AP24, chitinase and β -1,3-glucanase in transgenic plants. Plant Mol Biol 21: 583-593
- Menser HA, Heggstad HE, Grosso JJ (1966) Carbon filter prevents ozone fleck and premature senescence of tobacco leaves. Phytopathology 56: 466-467
- Menser HA, Heggstad HE, Street OE (1963a) Response of plants to air pollutants. II. Effects of ozone concentration and leaf maturity on injury to *Nicotiana tabacum*. Phytopathology 53: 1304-1308
- Messner B, Boll M (1994) Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*): fungal elicitor-induced inactivation. Plant Cell Tiss Org Cult 36: 81
- Mustafa MG (1990) Biochemical basis of ozone toxicity. Free Radical Biol Med 9: 245-265
- Mysliwicz J, Thierfelder S, Mocikat R, Kremmer E (1994) Immunological approach to inhibit formation of anti-antibodies to allo- and xenogeneic anti-T cell immunoglobulin. Eur J Immunol 24: 2323-2328
- Nakano Y, Asada K (1981) Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant Cell Physiol 22: 867-880

- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES (1990) Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. *Plant Cell* 2: 673-684
- Neuhaus JM, Flores S, Keefe D, Ahl-Goy P, Meins F (1992) The function of vacuolar β -1,3-glucanase investigated by antisense transformation. Susceptibility of transgenic *Nicotiana glauca* plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol Biol* 19: 803-813
- Neuhaus JM, Sticher L, Meins F, Boller T (1991a) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10362-10366
- O'Leary JW, Knecht GN (1981) Elevated CO₂ concentration increases stomate numbers in *Phaseolus vulgaris* leaves. *Bot Gaz* 142: 438-441
- Osswald WF, Shapiro JP, Doostdar H, McDonald RE, Niedz RP, Nairn CJ, Hearn CJ, Mayer RT (1994) Identification and characterization of acidic hydrolases with chitinase and chitosanase activities from sweet orange callus tissue. *Plant Cell Physiol* 35: 811-820
- Pang Q, Hays JB (1991) UV-B-inducible and temperature-sensitive photoreactivation of cyclobutane pyrimidine dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 95: 536-544
- Parent JG, Asselin A (1984) Detection of pathogenesis-related (PR or *b*) and of other proteins in the intercellular fluid of hypersensitive plants infected with tobacco mosaic virus. *Can J Bot* 62: 564-569
- Payer HD, Blodow P, Köfferlein M, Lippert M, Schmolke W, Seckmeyer G, Seidlitz HK, Strube D, Thiel S (1994) Controlled environment chambers for studies on plant responses to CO₂ and interactions with pollutants. In ED Schulze, HA Mooney, eds, *Design and Execution of Experiments with CO₂ Enrichment*. CEC-Verlag, Brüssel, Belgien, pp 127-145
- Payne G, Ahl P, Moyer M, Harper A, Beck J, Meins f, Ryals J (1990) Isolation of complementary DNA-clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 98-102

- Pell EJ, Dann MS (1991) Multiple stress-induced foliar senescence and implications for whole plant longevity. In HA Mooney, WE Winner, EJ Pell, eds, *Response of Plants to Multiple Stress*, Academic Press, San Diego, USA, pp 189-204
- Pell EJ, Eckardt N, Enyedi AJ (1992) Timing of ozone stress and resulting status of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase and associated net photosynthesis. *New Phytol* 120: 397-405
- Pell EJ, Eckardt NA, Glick RE (1994) Biochemical and molecular basis for impairment of photosynthetic potential. *Photosynth Res* 39: 453-462
- Pell EJ, Landry LG, Eckardt NA, Glick RE (1994) Air pollution and RubisCO: effects and implications. In RG Alscher, AR Wellburn, eds, *Plant Responses to the Gaseous Environment*. 1st edition, Chapman and Hall, London, Großbritannien, pp 239-254
- Peters JL, Castillo FJ, Heath RL (1989) Alteration of extracellular enzymes in pinto bean leaves upon exposure to air pollutants, ozone and sulfur dioxide. *Plant Physiol* 89: 159-164
- Pierpoint WS (1983) The major proteins in extracts of tobacco leaves that are responding hypersensitively to virus-infection. *Phytochemistry* 22: 2691-2697
- Pierpoint WS (1986) The pathogenesis-related proteins of tobacco leaves. *Phytochemistry* 25: 1595-1601
- Pietta PG, Calatroni A, Angellini D, Pace M (1982) Improved purification protocol for oxalate oxidase from barley roots. *Prep Biochem* 12: 341-353
- Polle A, Junkermann W (1994) Does atmospheric hydrogen peroxide contribute to damage to forest trees ? *Environ Sci Technol* 28: 812-815
- Polle A, Rennenberg H (1991) Superoxide dismutase activity in needles of Scots pine and Norway spruce under field and chamber conditions: lack of ozone effects. *New Phytol* 117: 335-343
- Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Sela-Buurlage MB, Van den Elzen PJM, Melchers LS, Cornelissen BJC (1994) A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. *Plant Physiol* 104: 109-118

- Price AH, Taylor A, Ripley SJ, Griffiths A, Trewavas AJ, Knight MR (1994) Oxidative signals in tobacco increase cytosolic calcium. *Plant Cell* 6: 1301-1310
- Protschill-Krebs G, Wilhelm C, Kesselmeier J (1995) Consumption of carbonyl sulphide by *Chlamydomonas reinhardtii* with different activities of carbonic anhydrase (CA) induced by different CO₂ growing regimes. *Bot Acta* 108: 445-448
- Raines CA, Horsnell PR, Holder C, Lloyd JC (1992) *Arabidopsis thaliana* carbonic anhydrase: cDNA sequence and effect of CO₂ on mRNA levels. *Plant Mol Biol* 20: 1143-1148
- Ramasarma T (1982) Generation of H₂O₂ in biomembranes. *Biochim Biophys Acta* 694: 69-93
- Rathmell WG, Sequeira L (1974) Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiol* 53: 317-318
- Rau W, Hoffmann H, Huber-Willer A, Mitzke-Schnabel U, Schrott E (1988) Die Wirkung von UV-B auf photoregulierte Entwicklungsvorgänge bei Pflanzen. Abschlußbericht 1988, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung GmbH, Oberschleißheim
- Raven PH, Evert RF, Curtis H (1981) *Biology of Plants*. 3rd edition, Worth Publishers, New York, USA
- Rayle DL, Cleland RE (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol* 99: 1271-1274
- Raz V, Fluhr R (1992) Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell* 4: 1123-1130
- Reddy GN, Arteca RN, Dai Y-R, Flores HE, Negm FB, Pell EJ (1993) Changes in ethylene and polyamines in relation to mRNA levels of the large and small subunits of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in ozone-stressed potato foliage. *Plant Cell Environ* 16: 819-826
- Reich PB (1987) Quantifying plant response to ozone: a unifying theory. *Tree Physiol* 3: 63-91
- Reich PB, Amundson RG (1985) Ambient levels of ozone reduce net photosynthesis in tree and crop species. *Science* 230: 566-570

- Reupold PE (1991) Einfluß von Ozon auf die Diaminoxidase-Aktivität in *Pisum sativum* L.: Extrazelluläre Lokalisation und Korrelation mit dem Polyamingehalt. Diplomarbeit, LMU München
- Rhoads AF, Brennan E (1978) The effect of ozone on chloroplast lamellae and isolated mesophyll cells of sensitive and resistant tobacco selections. *Phytopathology* 68: 883-886
- Rich S (1964) Ozone damage to plants. *Annu Rev Plant Pathol* 7: 253-266
- Rosemann D, Heller W, Sandermann H (1991) Biochemical plant responses to ozone II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol* 97: 1280-1286
- Rosenberger RF (1976) The cell wall. In JE Smith, DR Berry, eds, *The Filamentous Fungi, Vol II, Biosynthesis and Metabolism*. Edward Arnold, London, Großbritannien, pp 328-341
- Ross AF (1961b) Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340-358
- Runeckles VC, Krupa SV (1994) The impact of UV-B radiation and ozone on terrestrial vegetation. *Environ Pollut* 83: 191-213
- Ryals J, Ward E, Ahl-Goy P, Métraux JP (1992) Systemic acquired resistance: an inducible defence mechanism in plants. In JL Wray, ed, *Inducible Plant Proteins*. Society for Experimental Biology, Seminarreihe 49, Cambridge University Press, Cambridge, Großbritannien, pp 205-229
- Ryan CA (1988) Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. *Biochemistry* 27: 8879-8883
- Saito K (1996) Formation of L-ascorbic acid and oxalic acid from D-glucosone in *Lemna minor*. *Phytochemistry* 41: 145-149
- Salter L, Hewitt CN (1992) Ozone-hydrocarbon interactions in plants. *Phytochemistry* 31: 4045-4050
- Sandermann H, Ernst D, Heller W, Langebartels C (1994) Biochemical markers for stress detection and ecophysiology. In E-D Schulze, HA Mooney, *Design and Execution of Experiments on CO₂ Enrichment, Ecosystems Research Report 6*. Commission of the European Communities, Brüssel, Belgien, pp 45-51

- Sander mann H, Schmitt R, Heller W, Rosemann D, Langebartels C (1989) Ozone-induced early biochemical reactions in conifers. In JWS Longhurst, ed, *Acidic Deposition. Sources, Effects and Controls*. British Library, London, Großbritannien, pp 243-254
- Savidge R, Udagama-Randeniya P (1992) Cell wall-bound coniferyl alcohol oxidase associated with lignification in conifers. *Phytochemistry* 31: 2959-2966
- Scandalios JG (1993) Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant Physiol* 101: 7-12
- Schlumberbaum A, Mauch F, Vögeli U, Boller T (1986) Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324: 365-367.
- Schmitt R, Sander mann H (1990) Biochemical response of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) towards 14-month exposure to ozone and acid mist: part II - effects on protein biosynthesis. *Environ Pollut* 64: 367-373
- Schneiderbauer A, Back E, Sander mann H, Ernst D (1995) Ozone induction of extensin mRNA in Scots pine, Norway spruce and European beech. *New Phytol* 130: 225-230
- Schnitzler J-P, Jungblut TP, Feicht C, Köfferlein M, Langebartels C, Heller W, Sander mann H (1996) UV-B induction of flavonoid biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Trees*, eingereicht
- Schraudner M (1992) Frühe Reaktionen von Tabak und Buche auf Ozon: Induktion des Tyramin- und Polyaminstoffwechsels. Doktorarbeit, TU München
- Schraudner M, Ernst D, Langebartels C, Sander mann H (1992) Biochemical plant responses to ozone. III. Activation of the defense-related proteins β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *Plant Physiol* 99: 1321-1328
- Schraudner M, Graf U, Langebartels C, Sander mann H (1994) Ambient ozone can induce plant defence reactions in tobacco. *Proc R Soc Edinburgh* 102 B: 55-61
- Schraudner M, Langebartels C, Sander mann H (1996) Plant defence systems and ozone. *Biochem Soc Transact*, im Druck

- Schröder M, Hahlbrock K, Kombrink E (1992) Temporal and spatial patterns of 1,3- β -glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. Plant J 2: 161-172
- Seckmeyer G, McKenzie RL (1992) Increased ultraviolet radiation in New Zealand (45°S) relative to Germany (48°N). Nature 359: 135-137
- Seckmeyer G, Payer HD (1993) A new sunlight simulator for ecological research on plants. J Photochem Photobiol B 21: 175-181
- Sela-Buurlage MB, Ponstein AS, Bres-Vloemans SA, Melchers LS, Van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1993) Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. Plant Physiol 101: 857-863
- Shinshi H, Mohnen D, Meins F (1987) Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin. Proc Natl Acad Sci USA: 89-93
- Shinshi H, Neuhaus J-M, Ryals J, Meins F (1990) Structure of a tobacco endochitinase gene: evidence that different chitinase genes can arise by transposition of sequences encoding a cysteine-rich domain. Plant Mol Biol 14: 357-368
- Siefert F, Langebartels C, Boller T, Grossmann K (1994a) Are ethylene and 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid involved in the induction of chitinase and β -1,3-glucanase activity in sunflower cell-suspension cultures ? Planta 192: 431-440
- Siefert F, Thalmair M, Langebartels C, Sandermann H, Grossmann K (1996) Epoxiconazole-induced stimulation of the antifungal hydrolases chitinase and β -1,3-glucanase in wheat. Phytopathology, eingereicht
- Simmons CR (1994) The physiology and molecular biology of plant 1,3- β -D-glucanases and 1,3;1,4- β -D-glucanases. Crit Rev Plant Sci 13: 325-387
- Slocum RD, Furey MJ (1991) Electron-microscopic cytochemical localization of diamine and polyamine oxidases in pea and maize tissues. Planta 183: 443-450
- Smart CM (1994) Gene expression during leaf senescence. New Phytol 126: 419-448

- Smirnoff N (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol* 125: 27-58
- Stapleton AE (1992) Ultraviolet radiation and plants: burning questions. *Plant Cell* 4: 1353-1358
- Steinberger EH, Naveh Z (1982) Effects of recurring exposures to small ozone concentrations on Bel W3 tobacco plants. *Agric Environ* 7: 255-263
- Sticher L, Hinz U, Meyer AD, Meins F (1992) Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase. *Planta* 188: 559-565
- Stintzi A, Heitz T, Kauffmann S, Legrand M, Fritig B (1991) Identification of a basic pathogenesis-related, thaumatin-like protein of virus-infected tobacco as osmotin. *Physiol Mol Plant Pathol* 38: 137-146
- Stintzi A, Heitz T, Prasad V, Wiedemann-Merdinoglu S, Kauffmann S, Geoffroy P, Legrand M, Fritig B (1993) Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie* 75: 687-706
- Strasburger E (1991) *Lehrbuch der Botanik*. P Sitte, H Ziegler, F Ehrendorfer, A Bresinsky, eds, 33. Auflage, Fischer-Verlag, Stuttgart
- Strid A, Chow WS, Anderson JM (1990) Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim Biophys Acta* 1020: 260-268
- Sugiura M, Yamamura H, Hirano K, Sasaki M, Morikawi M, Tsuboi M (1979) Purification and properties of oxalate oxidase from barley seedlings. *Chem Pharm Bull* 27: 2003-2007
- Sullivan JH, Teramura AH (1988) Effects of ultraviolet-B irradiation on seedling growth in the *Pinaceae*. *Am J Bot* 75: 225-230
- Sutherland BM (1981b) Photoreactivating enzymes. In PD Boyer, ed, *The enzymes*, Vol XIV, Nucleic acids Part A. Academic Press, New York, USA, pp 481-515
- Takahashi A, Takeda K, Ohnishi T (1991) Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant Cell Physiol* 32: 541-547

- Teramura AH (1990) Ozone depletion, ultraviolet light and plants.
In Proc 83rd Annu Meet Air Waste Manage Assoc, Pittsburgh, USA,
Juni 1990, Paper 90-151.41. Air and Waste Management Association,
Pittsburgh, USA
- Tevini M (1993) Effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial plants.
In M Tevini, ed, UV-B radiation and ozone depletion. Lewis Publishers,
Boca Raton, USA, pp 125-153
- Tevini M (1992) Erhöhte UV-B-Strahlung: Ein Risiko für Pflanzen !?
Global Change Prisma 12: 4-6
- Tevini M (1995) UV-Wirkungen auf Pflanzen. Kurzfassung des Vortrages am
30.03.1995, Botanisches Institut II der Universität Karlsruhe
- Tevini M, Iwanzik W, Thoma U (1981) Some effects of enhanced UV-B
irradiation on the growth and composition of plants. *Planta* 153: 388-394
- Thalmair M, Bauw G, Thiel S, Döhring T, Langebartels C, Sandermann H
(1996) Ozone and ultraviolet B effects on the defense-related proteins
 β -1,3-glucanase and chitinase in tobacco. *J Plant Physiol*, im Druck
- Thiel S, Döhring T, Köfferlein M, Kosak A, Martin P, Seidlitz HK (1996)
A phytotron for plant stress research: How far can artificial lighting
compare to natural sunlight ? *J Plant Physiol*, im Druck
- Thompson AM (1992) The oxidizing capacity of the earth's atmosphere:
probable past and future changes. *Science* 256: 1157-1165
- Tingey DT, Standley C, Field RW (1976) Stress ethylene evolution: a measure
of ozone effects on plants. *Atmos Environ* 10: 969-974
- Tonneijck AEG und Bugter RJF (1991) Biological monitoring of ozone effects
on indicator plants in the Netherlands: Initial research on exposure-
response functions. In Verein Deutscher Ingenieure, ed, Bioindikation -
ein wirksames Instrument der Umweltkontrolle. VDI-Berichte 901,
Düsseldorf, pp 613-624
- Tuomainen J, Kangasjärvi J, Betz C, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H
(1995) Ozone activation of ethylene biosynthesis proceeds via differential
accumulation of transcripts for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate
synthase genes. In Abstract Book, Plant Growth Regulator Conference,
Pittsburgh, USA

- Van Buuren M, Neuhaus J-M, Shinshi H, Ryals J, Meins F (1992) The structure and regulation of homeologous tobacco endochitinase genes of *Nicotiana sylvestris* und *N. tomentosiformis* origin. *Mol Gen Genet* 232: 460-469
- Van de Rhee MD, Lemmers R, Bol JF (1993) Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic β -1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* 21: 451-461
- Van den Bulcke M, Bauw G, Castresana C, Van Montagu M, Vandekerckhove J (1989) Characterization of vacuolar and extracellular β (1,3)-glucanases of tobacco: evidence for a strictly compartmentalized plant defense system. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2673-2677
- Van den Bulcke M, Bauw G, De Rycke R, Castresana C, Van Montagu M, Vandekerckhove J (1990) The role of vacuolar and secreted pathogenesis-related β (1-3)-glucanases and chitinases in the defence response of plants. *Bull Soc Bot Fr* 137: 51-63
- Van Loon LC (1982) Regulation of changes in proteins and enzymes associated with active defense against virus infection. In RKS Wood, ed, *Active defense mechanisms in plants*. Plenum Press, New York, USA, pp 247-273
- Van Loon LC (1990) The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* 37: 229-230
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol Rep* 12: 245-264
- Van Loon LC, Van Kammen A (1970) Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with TMV. *Virology* 40: 199-211
- Vogelsang R, Barz W (1993) Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* 189: 60-69
- Vögeli U, Meins F, Boller T (1988) Coordinated regulation of chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Planta* 174: 364-372

- Vögeli-Lange R, Hansen-Gehri A, Boller T, Meins F (1988) Induction of the defense-related glucanohydrolases, β -1,3-glucanase und chitinase, by tobacco mosaic virus infection of tobacco leaves. *Plant Sci* 54: 171-176
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhol DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux JP, Ryals J (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3: 1085-1094
- Watson RT, Rodhe H, Oeschger H, Siegenthaler U (1990) Greenhouse gases and aerosols. In JT Houghton, GJ Jenkins, JJ Ephraums, eds, *Climatic change: the IPCC scientific assessment*. Cambridge University Press, Großbritannien, pp 1-40
- Weast RC (1972) *Handbook of Chemistry and Physics*. 53rd edition, The Chemical Rubber Company, Ohio, USA, p B-232
- Webb MA, Cavaletto JM, Carpita NC, Lopez LE, Arnott HJ (1995) The intravacuolar organic matrix associated with calcium oxalate crystals in leaves of *Vitis*. *Plant J* 7: 633-648
- Wege K, Vandersee W (1991) Ozonbeobachtungen am Nordrand der Alpen. *Meteorol Rdsch* 44: 138-146
- Wegener-Strake (1995) Ozon-induzierte Änderungen im Transkriptionsmuster von Kiefernkeimlingen (*Pinus sylvestris* L.): Charakterisierung beteiligter Gene. Doktorarbeit, LMU München
- Willekens H, Langebartels C, Tiré C, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1994a) Differential expression of catalase genes in *Nicotiana plumbaginifolia* (L.). *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10450-10454
- Willekens H, Van Camp W, Van Montagu M, Inzé D, Langebartels C, Sandermann H (1994b) Ozone, sulfur dioxide, and ultraviolet B have similar effects on mRNA accumulation of antioxidant genes in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Physiol* 106: 1007-1014
- Wirth SJ, Wolf GA (1990) Dye-labelled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. *J Microbiol Methods* 12: 197-205
- Wolf S, Lottspeich F, Baumeister W (1993) Ubiquitin found in the archaebacterium *Thermoplasma acidophilum*. *FEBS Lett* 326: 42-44

- Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, Van den Elzen PJM, Cornelissen BJC (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. Plant Cell 3: 619-628
- Woodward FI, Bazzaz FA (1988) The responses of stomatal density to CO₂ partial pressure. J Exp Bot 39: 1771-1781
- Wu G, Shortt BJ, Lawrence EB, Levine EB, Fitzsimmons KC, Shah DM (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H₂O₂-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. Plant Cell 7: 1357-1368
- Yalpani N, Enyedi AJ, 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
- Yang SF, Hoffmann NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol 35: 155-189
- Yin ZH, Langebartels C, Sandermann H (1994) Specific induction of ethylene biosynthesis in tobacco plants by the air pollutant ozone. Proc Royal Soc Edinburgh 102 B: 127-130
- Zarebinski TI, Theologis A (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. Plant Mol Biol 26: 1579-1597
- Zellner R (1993) Ozonabbau in der Stratosphäre. Chem unserer Zeit 5: 230-236

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie der GSF, Neuherberg unter Leitung von Prof. Dr. H. Sandermann angefertigt.

Herrn Prof. Dr. H. Sandermann danke ich für die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten.

Bei Herrn Dr. C. Langebartels möchte ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Betreuung bestens bedanken.

Herrn Prof. Dr. F. Meins (Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz) darf ich für die Einführung in immunologische Labortechniken und für zur Verfügung gestellte Antikörper und Antigene (β -1,3-Glucanase und Chitinase) danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. L. Ruprecht (GSF/Tierhaltung, Neuherberg) für die tierärztlichen Ratschläge bei der Immunisierung von Kaninchen und Herrn Dr. J. Mysliwietz (GSF/Hämatologikum, Großhadern) für die Hilfe bei der Gewinnung polyklonaler Antikörper aus Kaninchenserum.

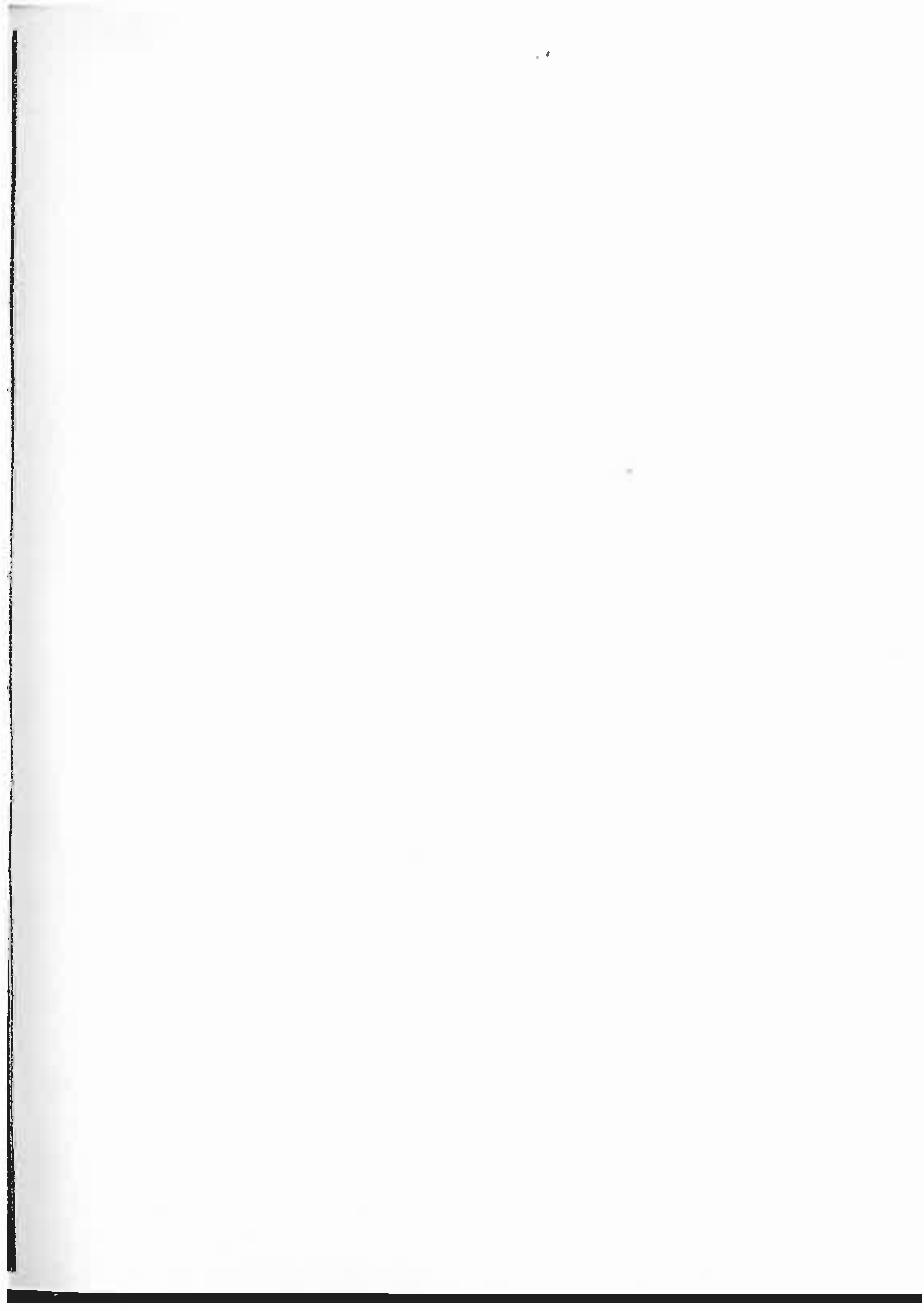
Herzlichen Dank auch an Herrn Dr. G. Bauw (Laboratorium Genetika, Universität Gent, Belgien) für die Einführung in zweidimensionale Gelelektrophoresemethoden und die Durchführung der Mikrosequenzanalysen.

Bei Herrn Dr. W. Heller und Herrn Dr. D. Ernst möchte ich mich für die stete Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. H. Seidlitz, Herrn Dr. T. Döhning, Herrn M. Köfferlein und allen anderen EPOKA-Mitgliedern darf ich für die Informationen und Anregungen auf physikalischem Gebiet besonders danken.

Herrn C. Betz und Herrn A. Kosak danke ich herzlich für die geduldige Hilfe in allen EDV-Belangen.

Vielen Dank auch an R. Kreitmeyer, L. Göbl, E. Mattes, S. Anegg, J. Hintermair, B. Groß und alle anderen Laborkolleg(inn)en, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.



LEBENS LAUF

- | | |
|------------|--|
| 16.06.1967 | Geburt in München |
| 1974-1978 | Grundschule in München |
| 1978-1987 | Gymnasium in München |
| 1987-1991 | Studium der Biologie (Diplom) an der Ludwig-Maximilians-Universität München |
| 1992 | Diplomarbeit am Lehrstuhl für Systematische Botanik und am Lehrstuhl für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Thema: „Morphologisch-anatomische und phytochemische Untersuchungen in der Umbelliferen-Gattung <i>Angelica</i> L.“ |
| Okt. 1992 | Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Biochemische Pflanzenpathologie GSF, München |

Auslandsaufenthalte:

- | | |
|------------|--|
| Okt. 1993 | Prof. Dr. F. Meins, Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz |
| Febr. 1995 | Prof. Dr. M. van Montagu, Laboratorium Genetika, Universität Gent, Belgien |