

1. EINLEITUNG

1.1. Signaltransfer bei der Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr

In den letzten Jahren ist sichtbar geworden, dass Phospholipasen nicht nur in tierischen, sondern auch in pflanzlichen Zellen eine Signalfunktion bei vielen entwicklungs- und stressabhängigen Reaktionen haben. Sie reichen von der Wirkung des Hormons Auxins (z.B. Scherer et al., 1995) über die Vermittlung osmotischer Signale (z.B. Meijer et al., 2001) und mechanischer Verwundung (z.B. Ryu et al., 1998) bis zu ihrer Beteiligung an einigen Reaktionen der pflanzlichen Pathogenabwehr (Munnik, 1998; Wang, 2001; Roos et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit hat zum Ziel, die Rolle einer Phospholipase A₂ an der Auslösung eines wesentlichen Zweiges der pflanzlichen Pathogenabwehr, der Biosynthese von Phytoalexinen, zu charakterisieren.

Hauptelemente der pflanzlichen Pathogenabwehr, die durch Kontakt mit pathogenen Mikroorganismen oder Elicitoren ausgelöst werden können, sind:

- a) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (oxidative burst), gefolgt von der hypersensitiven Reaktion (HR), einer Form der Apoptose
- b) die Verstärkung der Zellwand durch Vernetzung prolinreicher Proteine und durch Lignifizierung
- c) die Produktion von Enzymen zur Lyse mikrobieller Zellwände, z.B. Chitinasen, sowie zahlreicher weiterer "pathogenesis related proteins"
- d) die Bildung von Salicylaten und weiteren Signalen, die zur Ausbildung von "systemic acquired resistance" in benachbarten Geweben führen
- d) die Produktion von o.g. Phytoalexinen, d.h. speziestypischer Sekundärstoffe.

Unter dem Begriff "Phytoalexine" versteht man niedermolekulare, antimikrobiell wirkende Verbindungen, die nach Kontakt mit Mikroorganismen von der Wirtspflanze synthetisiert werden (Kuc, 1995; Hammerschmidt, 1999; Harborne, 1999). Es wurden über 350 verschiedene Phytoalexine aus 30 Pflanzenfamilien wie z.B. *Fabaceae*, *Solanaceae*, *Convolvulaceae*, *Gramineae* und *Compositae* chemisch charakterisiert. Die größte Anzahl an Phytoalexinen (ca. 130) wurde aus der Familie *Fabaceae* isoliert. In dieser Familie findet man u.a. Isoflavonoide, Isoflavane, Isoflavanone, Isoflavone, Pterocarpane und Coumestane (Kuc, 1995). Bei den *Solanaceae* kommen u.a. Phenylpropane, Norsesqui- und Sesquiterpene sowie Polyacetylene vor (Kuc, 1995).

Die Induktion der Phytoalexinbiosynthese bei der Pathogenabwehr tritt meist koordiniert mit dem o.g. Reaktionen der Pathogenabwehr (z.B. "oxidative burst", Lignifizierung und Expression von "pathogenesis-related proteins") auf. Während in einigen Objekten diese Kopplung relativ eng erscheint (Bolwell, 1997; Jabs, 1999; Lamb & Dixon, 1997; Scheel, 1998), kann in einigen Zellkulturen eine Induktion der Phytoalexinbiosynthese unabhängig von "oxidative burst" und HR erfolgen: z.B. in *Eschscholzia californica* (Roos et al., 1998) und *Nicotiana tabacum* (Lapous et al., 1998).

Diese Kulturen, zu denen auch das Objekt der vorliegenden Arbeit gehört, bieten daher günstige Bedingungen für die Aufklärung distinkter Signalschritte, ihrer Module und deren Verknüpfung. Die Struktur und Verknüpfungen dieser Elemente sind oft unbekannt und unterscheiden sich offenbar zwischen den Signalketten zur Auslösung der Phytoalexinbiosynthese und den zur hypersensitiven Reaktionen führenden Zwischenschritten.

Frühe Signalereignisse nach Elicitorkontakt sind:

- a) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, u.a. Superoxidanionen, H_2O_2 , Hydroxidradikale oder singulett-Sauerstoff. Diese wirken einerseits selbst antimikrobiell, andererseits sind sie sekundäre Signale zur Induktion von pathogenesis-related proteins (Baker et al., 1995; Lamb & Dixon, 1997)
- b) Ionenfluxe durch die Plasmamembran, vor allem Efflux von K^+ , Einstrom von Ca^{2+} , und von H^+ (Alkalisierung des Außenmediums) (Amano et al., 1997; Bach, 1993; Ebel et al., 1998; Romeis, 2001; Nürnberger, 1999)
- c) intrazelluläre Ionenfluxe: in *Eschscholzia californica* wurde z.B. nach Elicitorkontakt die transiente Freisetzung von H^+ aus der Vakuole gemessen (Roos et al., 1998).

Zu den unmittelbar nach Elicitorkontakt aktivierten Proteinen gehören Elicitor-Rezeptoren (Hahn, 1996; Nürnberger, 2000), G-Proteine (Causier & Millner, 1996; Bischoff et al., 1999; Roos et al., 1999), Ionenkanäle (Amano et al., 1997; Ebel et al., 1995) und Phospholipasen (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Spätere Signalereignisse (vor der Genaktivierung) sind die Aktivierung von Proteinkinasen, von denen bisher vor allem MAP-Kinasen und weitere Ca^{2+} -abhängige Kinasen charakterisiert wurden, welche meist eine Thr-Ser-Phosphorylierung der Zielproteine katalysieren (Ligternik et al., 1997; Hirt, 1997; Romeis, 2001).

Die Rolle von Phospholipasen (PL) in diesen Signalkaskaden wird belegt durch a) den Nachweis von Signalfunktionen ihrer Spaltprodukte (IP_3 , Fettsäuren, PA, LPA und LPC) (Chandra et al., 1996; Munnik et al., 1998; van der Luit et al., 2000; Wang, 2001)

b) die Wirkung spezifischer Effektoren und Hemmstoffe (Mastoparan, Neomycin, ETYA) auf den Signaltransfer (Munnik et al., 1998; Scherer et al., 1995; Scherer et al., 1997; Wang, 2001)

1.2. Spezifität der Phospholipasen und ihr Vorkommen in Pflanzen

Phospholipasen sind wesentlich am Metabolismus von Phospholipiden beteiligt. Sie kommen in allen Organismen sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form vor. Die Phospholipasen unterteilt man entsprechend ihrer enzymatischen Spaltstellen am Phospholipid in Acylhydrolasen (Phospholipase A_1 und Phospholipase A_2) und Phosphodiesterasen (Phospholipase C und Phospholipase D) (Dennis, 1994) (s. Abb. 1.).

Phospholipase A spaltet eine Fettsäure aus dem Phospholipidmolekül ab. PLA_1 hydrolysiert die Bindung an der *sn-1*-Position des Glycerols, PLA_2 an der *sn-2*-Position. Als Reaktionsprodukte entstehen das α - bzw. β -Lysophospholipid und die freie Fettsäure. Der am häufigsten gefundene Typ der Acylhydrolasen in Pflanzen ist die PLA_2 ; es gibt nur wenige Berichte über das PLA_1 -Vorkommen in Pflanzen, so in Tonoplasten aus *Acer pseudoplatanus* (Tavernier et al., 1995). PLA_2 -Aktivität wurde in Suspensionszellkulturen von *Glycine max* (Paul et al., 1998), *Nicotiana tabacum* (Roy et al., 1995), *Petroselinum crispum L* (Scherer et al., 2000), im Hypokotyl von *Cucurbita pepo* (Andre et al., 1991) und *Helianthus annuus* (Scherer et al., 1995), sowie in embryonalem Gewebe von *Brassica nabus*, in Wurzeln von *Triticum aestivum* (Banas et al., 1992) und im Mesokarp von *Persea gratissima* (Bafor et al., 1991) nachgewiesen. Membrangebundene PLA_2 -Aktivitäten wurden in Plasmamembranvesikeln aus Wurzeln von *Avena sativa* (Palmgren et al., 1989) und in mikrosomalen Membranfraktionen von *Ricinis communis* (Bafor et al., 1991) gemessen.

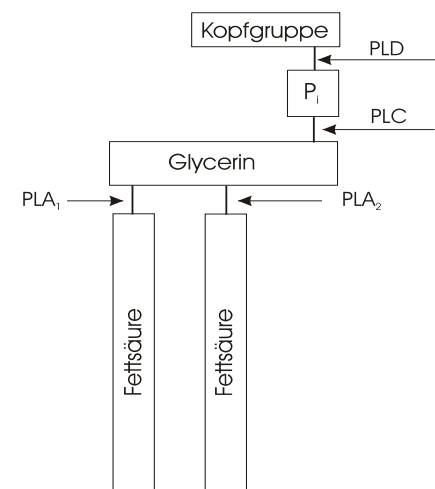


Abb.1. Schema der Hydrolyse von Phospholipiden durch Phospholipasen

Bislang wurde nur eine membrangebundene PLA₂ gereinigt. Es handelt sich dabei um ein 48 kDa Enzym aus *Vicia faba* (Jung et al., 2000). Lösliche PLA₂-Enzyme sind eine 40 kDa PLA₂ aus Knollen von *Solanum tuberosum*, die Patatin genannt wird, eine 70 kDa, Ca⁺²-unabhängige PLA₂ und eine Ca⁺²-abhängige 14 kDa PLA₂ jeweils aus *Vicia faba* (Senda et al., 1996; Kim, 1994). Eine weitere 14 kDa PLA₂ wurde aus den Wurzeln von *Ulmus glabra* gereinigt und vollständig sequenziert (Stahl et al., 1998).

Phospholipase C hydrolysiert die Phosphatesterbindung am C₃-Kohlenstoff des Glycerolgrundkörpers, so dass die phosphorylierte Alkoholgruppe und Diacylglycerol als Reaktionsprodukte entstehen. PLCs aus Pflanzen können bezüglich ihrer Substratspezifität in drei Gruppen eingeteilt werden: phosphoinositidspezifische PLC (PI-PLC), phosphoinositid-unspezifische PLC, die in der Lage sind PC bzw andere Phospholipide zu spalten (PC-PLC) und glycosylphosphatidyl-inositolspezifische PLC (GPI-PLC) (Wang, 2001). Die bisher am häufigsten gefundene pflanzliche PLC ist die PI-PLC. Aus Pflanzen von *Arabidopsis thaliana* (Hirayama et al. 1995; Hirayama et al. 1997), *Glycine max* (Shi et al., 1995) und *Solanum tuberosum* (Kopka et al., 1998) gereinigte PI-PLCs zeigen relativ weitgehende Sequenzhomologien mit der tierischen PI-PLC_δ (Wang, 2001). PC-PLC-Aktivität wurde in verschiedenen Pflanzenspezies gefunden. Jedoch sind diese Befunde wegen der hohen Aktivität von PLD und möglicher Umwandlung der Produkte von PLC und PLD durch Kinasen und Phosphatasen mit Vorsicht zu behandeln (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Eine PLC katalysierte Freisetzung von Diacylglycerol (DAG), gefolgt von einer DAG-Kinase-katalysierten Phosphorylierung zu Phosphatidsäure (PA) bzw. zu DAG-Pyrophosphat, wurde in Suspensionszellkulturen von *Lycopersicon esculentum* beobachtet (van der Luit et al., 2000).

Eine GPI-spaltende Aktivität einer PLC konnte z.B. in Samen von *Arachis hypogaea* nachgewiesen werden (Butikofer et al., 1993).

Phospholipase D hydrolysiert die Bindung zwischen Phosphat und Alkoholgruppe, so dass Phosphatidsäure und die freie Kopfgruppe entstehen. Phosphatidsäure ist das Ausgangsmaterial für die Synthese aller Glycerolipide. Eine spezifische Eigenschaft der PLD ist ihre Fähigkeit zur Transphosphatidylierung, d.h. das Enzym katalysiert neben der Hydrolyse von Phospholipiden bei Anwesenheit geeigneter Alkohole auch Umesterungen mit kurzkettigen Alkoholen (Munnik, 2001). In Pflanzen wurden mehrere Isoenzyme der PLD entdeckt, die man in verschiedenen

Entwicklungsstadien oder auf bestimmte Gewebetypen begrenzt findet und die sich in ihren Eigenschaften und ihrer Regulation unterscheiden, z.B. in *Arabidopsis thaliana* wurden 7 verschiedene Isoenzyme identifiziert (Pappan et al., 1999).

Die pflanzlichen PLDs sind in α -, β -, γ -Typen unterteilt. PLD α zeichnet sich durch einen sehr hohen Ca^{2+} -Bedarf (20-100 mM *in vitro*) und ein im sauren Bereich liegendes pH-Optimum aus (Wang, 2001). PLD α -Enzyme werden in weitere Subtypen PLD α 1, PLD α 2 und PLD α 3 unterteilt. PLD β weist eine 40%-ige Aminosäurehomologie zum α -Typ auf und besitzt ein pH-Optimum bei pH 7.0-7.5 und braucht für ihre Aktivität Calciumionen nur in mikromolaren Bereich. PLD γ weist eine 66%-ige Homologie zum β -Typ auf. All diese Isoformen haben unterschiedliche Substratspezifität bezüglich der Phospholipidkopfgruppen (Pappan et al., 1999; Wang 2001).

1.3. Phospholipasen in der Signaltransduktion der pflanzlichen Pathogenabwehr

In Analogie zu tierischen Zellen stellen Produkte Phospholipase-katalysierter Reaktionen häufig in Pflanzen Signalmoleküle dar oder können als Ausgangsverbindungen zur Synthese von biologisch aktiven Substanzen dienen. In letzter Zeit häufen sich experimentelle Befunde über eine Funktion von Hydrolyseprodukten der Phospholipasen als potentielle Botenmoleküle bei zellulären Signaltransduktionsprozessen in Pflanzen (Munnik, 1998; Munnik, 2001; Wang 2001). Arachidonsäure (C20: 3), ein Spaltprodukt der PLA₂ in tierischen Organismen, ist die Ausgangsverbindung für die Synthese biologisch wirksamer Substanzen, die als Eicosanoide bezeichnet werden, u.a. Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene (Samuelsson, 1987).

Ein analoges PLA₂-Spaltprodukt in der Pflanze ist die Linolensäure (C18: 3). Sie ist der Ausgangspunkt der Octadecanoidkaskade und der Isoprostane (Müller et al., 1993; Blechert et al., 1995; Parchmann et al., 1997; Imbusch et al., 2000).

Lyso-PC, ein Produkt der PLA₂, dient in tierischen Zellen u.a. als Ausgangsverbindung für den sogenannten „platelet-activating factor“ (PAF) (Tjoelker et al., 1995). In den pflanzlichen Zellen ist LPC als Aktivator der Plasmamembran- H^+ -ATPase (Palmgren et al., 1989) und der Proteinkinasen (Martiny-Baron et al., 1989) bekannt. Ein weiteres Beispiel ist IP₃, ein Spaltprodukt der PLC, das einen Einstrom von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol bewirkt und dadurch die Aktivität von zahlreichen calciumabhängigen Enzymen reguliert. Die Aktivierung von Phospholipasen erfolgt vermutlich wie in tierischen Organismen über

rezeptorvermittelte G-Proteine. In tierischen Zellen etablierte G-Proteinaktivatoren wie Mastoparan, primäre Alkohole wie Ethanol und Choleratoxin aktivieren auch die pflanzliche PLC, PLD und PLA₂ (Chandra et al., 1996; Munnik et al., 1995; van Himbergen et al., 1999; Scherer et al., 1995; Roos et al., 1999).

1.3.1. Phospholipase A₂ (PLA₂)

Zahlreiche regulatorische Effekte der PLA₂ oder ihrer Produkte wurden in Pflanzen beobachtet. Die durch PLA₂ freigesetzten C₁₈-Fettsäuren dienen in Pflanzen u.a. als Substrat der Lipoxygenasen. So werden aus Linolensäure hochreaktive Hydroperoxide (13-Hydroperoxy-octadecatriensäuren) gebildet, deren weitere enzymatische Umwandlung zur Biosynthese von Jasmonsäure führt. Jasmonsäure, ihr Precursor 12-Oxophytodiensäure, sowie ihre Derivate sind in Pflanzen multifunktionelle Signalmoleküle (Noehringer et al., 2000; Parcmann et al., 1997; Wasternack et al., 1997).

Diese Verbindungen können die Expression von Abwehrgenen stimulieren. Die Aktivierung der PLA₂ bei Pflanze-Pathogen-Interaktionen wurde in verschiedenen Pflanzenspezies gefunden. Die durch PLA₂-Aktivität aus den Phospholipiden freigesetzten Fettsäuren können eng mit der Regulation der Phytoalexinbildung verbunden sein, wie durch Li et al. (1991) gezeigt wurde. Sie fanden, dass Blätter von *Oryza sativa*, die mit dem Pathogen *Pyricularia oryzae* infiziert waren, 13-Hydroperoxide und 13-Hydroxide der Linolen- und Linolsäure akkumulierten, noch bevor es zur Bildung der Phytoalexine (Momilactone und Oryzalexin D) kam (Li et al., 1991). Inhibitoren der PLA₂ und Lipoxygenase unterdrückten sowohl die Hydroperoxidbildung als auch die Bildung dieser Phytoalexine. Aufgrund dieser Ergebnisse werden die Fettsäureperoxide und Fettsäureoxide als endogene Signalmoleküle der Phytoalexinbildung angesehen.

Weiterhin konnte eine Linolensäureakkumulation und Jasmonsäure-Akkumulation nach Elicitorbehandlung in Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica* beobachtet werden (Blechert et al., 1995).

Der Einfluß von Hydrolyseprodukten der PLA₂ auf die Aktivität plasmamembranständiger H⁺-ATPasen wurde vielfach belegt (Palmgren et al., 1989). Es ist bekannt, dass das PLA₂-Produkt Lysophosphatidylcholin eine Aktivierung der plasmamembrangebundenen ATPase bewirkt (Gomes et al., 1996; Luo et al., 1999).

Der Effekt ist nicht nur auf die Lysoverbindungen beschränkt, auch die durch PLA₂ freigesetzten Fettsäuren können eine ATPase Aktivierung auslösen (Yi et al., 1996). Diese Aktivierungsvorgänge verlaufen möglicherweise über eine Aktivierung membranständiger Proteinkinasen, die ihrerseits wiederum die H⁺-ATPasen aktivieren (Yi et al., 1996).

Die Behandlung einer Suspensionszellkultur von *Glycine max* mit einem Elicitor aus *Verticillium dahliae* oder *Erwinia amylovora* aktivierte die PLA₂ und löste einen "oxidative burst" aus. Hingegen löste ein anderer Elicitor (Oligogalacturonsäure) zwar einen "oxidative burst", jedoch keine Aktivierung der PLA₂ aus. (Chandra et al., 1996).

Aus diesem Befund schließen die Autoren, dass die PLA₂ nicht für die Auslösung des „oxidative burst“ sondern für andere, noch unbekannt Signalvorgänge benötigt wird. Die Beteiligung der PLA₂ an der Signaltransduktionskaskade des Auxins in Pflanzen ist aufgrund von Hemmstoffversuchen vermutet worden (Scherer & Andre, 1989). Auxin fördert das Streckungswachstum von Pflanzenzellen, welches durch die Ansäuerung des Apoplasten infolge der Aktivierung der H⁺-ATPase der Plasmamembran erreicht wird (Paul et al., 1998). Inhibitoren tierischer PLA₂ hemmen das auxininduzierte Wachstum von etiolierten Hypokotylen von *Cucurbita pepo* (Scherer & Arnold 1997).

1.3.2. Phospholipase C (PLC)

Die Beteiligung der phosphoinositolspezifischen PLC an der Aktivierung des "oxidative burst" in neutrophilen Granulocyten ist eines der bekanntesten Beispiele für den Phospholipase-abhängigen Signaltransfer in tierischen Organismen. Durch die Aktivierung des Enzyms werden zwei Signalmoleküle, Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) gebildet. Das ins Cytosol freigesetzte IP₃ bewirkt einen Einstrom von Calcium aus intrazellulären Speichern in das Cytosol und reguliert dadurch die Aktivität von zahlreichen calciumabhängigen Enzymen. DAG aktiviert u.a. die Proteinkinase C (PKC) und steuert damit verschiedene Enzyme. Diese aktivieren z.B. die NADH-Oxidase über ihren Phosphorylierungsstatus (Alberts et al., 1995; Streyer, 1994). Die NADH-Oxidase ist das Schlüsselenzym für den "oxidative burst", d.h. sie katalysiert die Bildung von ROS. Viele Komponenten der PI-PLC-Signalkaskade der Pflanzen haben strukturelle oder funktionelle Ähnlichkeiten mit denen in Tieren (Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

Untersuchungen mit Zellsuspensionskulturen von *Glycine max* zeigten, dass die Behandlung der

Zellen mit Elicitor oder Mastoparan, zur Akkumulation von IP_3 und auch zur Auslösung des “oxidative burst” führte (Legendre, 1993). Damit zeigt sich eine Analogie im Signalweg des “oxidative burst” zwischen pflanzlichen Zellen und den neutrophilen Granulocyten der Tiere (Dwyer et al., 1996). Allerdings ist die NADPH-oxidase der Neutrophilen nicht mit dem analogen Enzym der pflanzlichen ROS-Bildung identisch.

Auch die Behandlung von Suspensionszellkulturen weiterer Pflanzenspezies wie *Caucalis platycarpos* (Kurosaki et al., 1987), *Nicotiana tabacum* (Kamada et al., 1994), *Pisum sativum* (Toyoda et al., 1992), mit Elicitor führten zur Akkumulation von IP_3 als Folge der Aktivierung von PI-PLC. Eine Beteiligung der PI-PLC am pflanzlichen Signaltransfer wurde nicht nur bei der Pathogen-Interaktion, sondern auch in Prozessen wie osmotischen Streß, Abscisinwirkung und Lichtperception gefunden (Arz et al., 1994; Munnik et al., 1998; Wang, 2001).

1.3.3. Phospholipase D (PLD)

Es wird vermutet, dass PLDs in Pflanzen bei vielfältigen Entwicklungs- und Stressabwehr-Prozessen wie Keimung, Alterung, Kältestreß, Trockenstreß, Verwundung und Nahrungsmangel beteiligt sind bzw. aktiviert werden (van der Luit et al., 2000; Pappan et al., 1999; Munnik 1998; Wang, 2001). Die durch die Aktivierung von Phospholipase D entstandene Phosphatidsäure führt zur Aktivierung von Proteinkinasen oder dient als Ausgangsstoff für andere Botenstoffe wie z.B. Lysophosphatidsäure.

Auch eine Bedeutung der PLD an der Pflanzen-Pathogen-Interaktion deutet sich an; die PLD katalysierte Hydrolyse von N-Acyl-Phosphatidylethanolamin wurde in Zellen von *Nicotiana tabacum* infolge von Elicitorbehandlung festgestellt. Das freigesetzte N-Acyl-Ethanolamin kann transmembranale Ionenströme beeinflussen und die Expression von Abwehrgenen aktivieren (Chapman et al., 1998; Chapman, 2000).

1.4. Das Modellsystem der vorliegenden Arbeit: Suspensionszellkultur von *Eschscholzia californica*/Hefeelicitor

Die Behandlung einer Suspensionszellkultur von *Eschscholzia californica* mit einem Elicitorpräparat (Glycoproteinfraktion aus Backhefe) führt zur Induktion der Biosynthese der Benzophenanthridin-Alkaloide vor allem Macarpin und Chelirubin (Roos et al., 1998; Fachini, 2001).

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interkalation in der DNA sind diese Alkaloide wirksame Phytoalexine (Schmeller et al., 1997; Wolf et al., 1993).

Wenige Minuten nach dem Elicitorkontakt wurde in den Zellen ein transients Abfall des cytosolischen pH-Wertes mit Hilfe der konfokalen pH-Topographie nachgewiesen (Roos et al., 1998).

Dieser pH-Shift ist für die Auslösung der Alkaloidbiosynthese essentiell:

-die künstliche Ansäuerung des Cytoplasmas mit Buttersäure führte ebenfalls zur Induktion der Alkaloidbiosynthese;

-nach dem Verlust des vakuolären Protonengehaltes durch Behandlung mit Methylamin ist keine Alkaloidbiosynthese durch Elicitorkontakt mehr auslösbar (Roos et al., 1998).

Auch in anderen Zellkulturen wurde nach Elicitorkontakt eine Ansäuerung des Cytoplasmas nachgewiesen, welche in Zusammenhang mit der Induktion einiger Enzyme der Pathogenabwehr steht (Mathieu et al., 1996; Kuchitsu et al., 1997; He et al., 1998). Jedoch unterscheidet sich der Mechanismus zur Auslösung des pH-Shiftes in diesen Fällen grundsätzlich von der obengenannten Elicitierungsreaktion in *Eschscholzia californica*. Die im Zusammenhang mit der Phenylalaninammoniumlyase (PAL)-Induktion gemessenen pH-Shift in Zellkulturen von *Oryza sativa* und *Nicotiana tabacum* kommen unter Beteiligung von Serin/Threonin-Proteinkinasen durch den Einstrom externer Protonen zustande und führen zu einer meßbaren Alkalisierung des Außenmediums (Lapous et al., 1998; He et al., 1998). Pathogenabwehrmechanismen, welche zur Hypersensitivitätsreaktion führen, sind meist mit einer Alkalisierung des Außenmediums verbunden. Sie widerspiegeln einen Einstrom der Protonen aus der Umgebung der Zellen (Lapous et al., 1998; He et al., 1998).

Dagegen stammen die Protonen, welche nach dem Elicitorkontakt in das Cytoplasma von *Eschscholzia californica* einströmen, aus der Vakuole (Roos et al., 1998).

Es stellte sich die Frage, auf welche Weise der Kontakt des Elicitors mit der Zelloberfläche ein Signal zur Auslösung der vakuolären Protonenfluxe erzeugt. Bei der Suche nach sehr früheren Ereignissen nach Elicitorkontakt, d.h. vor dem gemessenen pH-Shift, wurde die Aktivierung einer PLA₂ als möglicher Kandidat entdeckt (Roos et al., 1999).

An *in situ*-Vakuolen wurde gezeigt, dass LPC, ein Produkt dieser PLA₂, tatsächlich einen pH-Shift auslöst (Viehweger et al., 2002).

1.5. Zielstellung der vorliegenden Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sind Experimente zur analytischen und zellbiologischen Charakterisierung der PLA₂-Aktivität von *Eschscholzia californica* und ihre Aktivierung nach Elicitorkontakt dargestellt.

Zunächst war zu klären, ob und mit welchen Methoden sich eine PLA₂-Aktivität in Suspensionszellkulturen von *Eschscholzia californica* nachweisen lässt und ob diese auf eine Elicitorstimulation reagiert. Wenn die PLA₂ als Signalezym für den Elicitorkontakt fungiert, wäre eine Lokalisation des Enzyms in der Plasmamembran anzunehmen. Um dies zu prüfen, war es notwendig, möglichst reine Plasmamembranvesikel zu präparieren und auf PLA₂-Aktivität zu untersuchen.

Weiterhin sollte ein Beitrag zur Aufklärung der Stellung der PLA₂-Aktivität innerhalb der Signalkette zur Auslösung der Alkaloidbiosynthese geleistet werden.