

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen – neue Signalelemente in der pflanzlichen Pathogenabwehr

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Thomas Kroj
geboren am 27. Oktober 1968 in Köln

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Elmar Wahle
3. Prof. Dr. Heribert Hirt

Halle (Saale), den 21.09.1999

1 Einleitung.....	1
1.1 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr	1
1.2 Pathogenerkennung	3
1.3 Rassenspezifische Resistenz.....	4
1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	4
1.5 Das Modellsystem aus einer Petersiliezellensuspensionskultur und Peptidelicitoren...	8
1.6 Ziele der Arbeit	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide	11
2.2 Kultivierung, Behandlung und Aufarbeitung der Petersiliezellen und Petersilieprotoplasten.....	11
2.2.1 Gewinnung von Petersilieprotoplasten.....	11
2.2.2 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen.....	11
2.2.3 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium.....	12
2.2.4 Proteinextraktion aus Petersiliezellen	12
2.2.5 Transiente Transformation von Petersilieprotoplasten	12
2.3 Molekularbiologische Arbeiten	13
2.3.1 Bakterienstämme, Phagen, Plasmide	13
2.3.2 Reinigung von Plasmid-DNA	14
2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	15
2.3.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	15
2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten	15
2.3.6 DNA-Sequenzierung	15
2.3.7 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten.....	15
2.3.8 Punktmutagenese	16
2.3.9 Konstruktion einer gerichteten cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	16
2.3.10 Southernblots mit genomischer DNA	17
2.3.11 Screening einer Petersilie- λ -ZAP TM II-cDNA-Bank.....	18
2.3.12 Bakterielle Expression von <i>MPK1</i> , 2, 3 und 4.....	18
2.4 Proteinanalytische Methoden	19
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.4.3 Westernblots	19
2.5 Antikörperproduktion.....	20
2.5.1 Peptidsynthese.....	20
2.5.2 Gewinnung der Antiseren.....	20
2.6 In-Gel-MBP-Kinasenachweis.....	21
2.7 Immunpräzipitations-Kinasenachweis.....	21
2.8 Immunlokalisierung	23
2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	23

2.9.1 Hefestämme und Plasmide.....	23
2.9.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen.....	24
2.9.3 Herstellung des Plasmids pBD-HA.M1.....	25
2.9.4 Hefetransformation.....	25
2.9.5 Screening mit MPK1.....	25
2.9.6 Plasmidpräparation aus Hefe.....	26
2.9.7 Proteinextraktion aus Hefe.....	26
2.10 Analyse der Reporterexpression im Protoplastensystem.....	27
2.10.1 Proteinextraktion.....	27
2.10.2 Bestimmung der LUC-Aktivität.....	27
2.10.3 Bestimmung der GUS-Aktivität.....	27
2.10.4 Errechnung der normierten GUS-Aktivität.....	27

3 Ergebnisse.....28

3.1 Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Petersiliezellen.....	28
3.1.1 Nachweis elicitorresponsiver Proteinkinasen mittels In-Gel-MBP-Kinaseversuchen.....	28
3.1.2 Identifizierung der elicitorresponsiven Kinasen als MAPKs.....	29
3.1.3 Immunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Medicago MAPKs.....	30
3.1.4 Westernblot-Analyse von Petersilieproteinen mit M7-Antiserum.....	31
3.2 Signalspezifität der MAPK-Aktivierung.....	31
3.3 Einordnung der MAPKs in die Elicitorsignal-transduktionskette.....	32
3.3.1 Einfluß des Ionenkanalinhibitors A9C auf die MAPK-Aktivierung.....	32
3.3.2 Einfluß des Polyenantibiotikums Amphotericin B auf die MAPK-Aktivität.....	33
3.3.3 Einfluß des NADPH-Oxidaseinhibitors DPI auf die MAPK-Aktivierung.....	34
3.3.4 Immunlokalisierung der elicitorresponsiven MAPK mit M7-Antiserum.....	34
3.3.5 Einfluß von Inhibitoren der MAPK-Kaskade auf die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs und die Phytoalexinproduktion.....	35
3.4 Klonierung und Charakterisierung 5 verschiedener Petersilie-MAPK-cDNAs.....	36
3.4.1 Screenen einer Petersilie-cDNA-Bank mit einer <i>MMK1</i> - und einer <i>MMK4</i> -Sonde.....	36
3.4.2 Analyse der Sequenzen der MAPK-cDNAs.....	37
3.4.3 Southern-Analyse genomischer DNA mit <i>MPK1</i> -, <i>MPK2</i> - und <i>MPK3</i> -Sonden.....	40
3.4.4 Expression von <i>MPK1</i> , <i>MPK2</i> , <i>MPK3</i> und <i>MPK4</i> in <i>E. coli</i>	40
3.4.4.1 Bestimmung der Kinaseaktivität des rekombinanten MPK1.....	41
3.4.5 Kreuzreaktion des M7- und des M11-Serums mit den rekombinanten Kinasen.....	42
3.4.6 Produktion von Antikörpern gegen N- und C-terminale Peptide der Kinasen MPK1, 3 und 4	42
3.4.7 Kreuzreaktion der Antiseren mit den rekombinanten Kinasen und mit Petersilieproteinen ..	43
3.4.8 Immunpräzipitationsexperimente mit den Seren P82, P97, P37 und P38.....	44
3.5 Suche nach Interaktionspartnern von MPK1 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid- Systems.....	46
3.5.1 Herstellung einer Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank aus Petersilie-mRNA.....	47
3.5.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit <i>MPK1</i>	48
3.5.2.1 Kontrollen zur Eignung des pBD-HA.M1-Konstrukts für einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen	48
3.5.2.2 Ergebnis des Screens.....	49
3.5.2.3 Analyse der Sequenzen der Klone <i>2H1</i> und <i>2H4</i>	50
3.6 Transiente Überexpression von <i>MPK1</i> , 2, 3 und 4 in Petersilieprotoplasten.....	51
3.6.1 Konstrukte zur Überexpression aktiver und inaktiver MAPK-Varianten.....	51
3.6.2 Akkumulation von MPK1:HA in transient transformierten Petersilieprotoplasten.....	52

3.6.3 Kotransformationsexperimente mit MAPK-Varianten	53
3.6.4 Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante der humanen MEK1	56
4 Diskussion	57
4.1 Die Aktivierung von MAPKs in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	57
4.2 Die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ist ein rezeptorvermittelter Prozeß	60
4.3 Einordnung der elicitorresponsiven MAPKs in die Elicitorsignalkette.....	61
4.4 Die Genfamilie der MAPKs in Petersilie.....	62
4.5 Immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven Kinasen	63
4.6 Elicitorstimulierter Kerntransport von MPK3.....	64
4.7 Eignung von Proteinkinaseinhibitoren für die funktionelle Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs.....	66
4.8 Kotransformationsexperimente	66
4.9 Identifizierung zusätzlicher Signalkomponenten durch einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen	71
4.10 Ausblick	72
5 Zusammenfassung	73
6 Literatur	75
7 Anhang.....	98

Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
4-MUG	4-Methylumbeliferylglucuronid
A9C	Anthracen-9-carbonsäure
Abb.	Abbildung
Amp ^r	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
avr-Gen	Avirulenzgen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
b-ZIP	basischer "Leucin-Zipper"
Cam ^r	Chloramphenikolresistenz
CaMV	"cauliflower mosaik virus"
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EREB-	"ethylen response element binding"-
ERK	"extracellular signal-regulated protein kinase kinase"
Fmoc-	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-
GUS	Glucuronidase
h	Stunden
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	"high-performance-liquid-chromatoraphy"
HR	hypersensitive Reaktion
IC ₅₀	Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Inhibierung
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
ISR	systemisch induzierte Resistenz
kDa	Kilodalton
KLH	"key limpet hemocyanin"
LUC	Luciferase

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MBP	Myelin-assoziiertes basisches Protein
MEK	“mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase kinase“
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MRE	“MYB-response element“
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaque-bildende Einheiten
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Polyvinylpyrrolidon
PR-Protein	“pathogenesis-related“-Protein
pv.	Pathovar
R-Gen	Resistenzgen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S/T-Proteinkinase	Serin/Threonin-Proteinkinase
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Gelelektrophorese
SV40	Simian Virus 40
TPA	12-O-Tetradecanylphorbol-13-acetat
TMV	Tabak-Mosaikvirus
Tricine	N-tris[Hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Pflanzen müssen wie alle Lebensformen ständig auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren. Deshalb besitzen sie Sensoren, mit denen sie für sie relevante Umweltparameter erfassen, Signalverarbeitungs- und Weiterleitungssysteme, die Informationen integrieren, beurteilen und an Effektorstrukturen vermitteln, und Antwortprogramme, die es den Pflanzen ermöglichen, auch unter Extrembedingungen zu überleben. Eine derartige Extremsituation stellt für Pflanzen der Befall mit pathogenen Mikroorganismen dar. Durch Eingriffe in den pflanzlichen Stoffwechsel, einen kontinuierlichen Entzug von Nährstoffen oder die Produktion von Toxinen können phytopathogene Bakterien, Pilze, Viren und Viroide den Tod oder zumindest eine deutliche Schwächung und damit die Verzögerung von Wachstum und Entwicklung der befallenen Pflanze bewirken. Vor allem Kulturpflanzen sind einem hohen Pathogendruck ausgesetzt, da ihr Anbau in Monokulturen die Ausbreitung und Adaptation von Schadorganismen begünstigt und weil ihre Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten im Vergleich zu Wildformen oftmals geschwächt ist. Dennoch sind Pflanzen gegen einen Befall durch die meisten möglichen Phytopathogene resistent. Diese Nichtwirts- oder Grundresistenz stützt sich auf induzierbare und passive, präformierte Schutzmechanismen (Prell, 1996; Kombrink und Somssich, 1995).

Präformierte Schutzmechanismen können mechanischer oder chemischer Art sein. Barrieren wie pflanzliche Zellwände oder die Wachsschichten der Kutikula verhindern das Eindringen von Mikroorganismen in die Pflanze (Ride 1983). Antibiotische Produkte des Sekundärstoffwechsels, die in Vakuolen gespeichert und in Zellwände eingelagert werden, unterdrücken mikrobielles Wachstum (Mansfield, 1983; Maher *et al.*, 1994; Osbourn, 1996). Gelangen dennoch Mikroorganismen in die Pflanze, so werden sie in der Regel durch die Pflanze erkannt, und die Auslösung einer zeitlich und räumlich genau definierten pflanzlichen Abwehrantwort verhindert ihr Wachstum und ihre Vermehrung (Scheel, 1992; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998). Dieses induzierte Abwehrprogramm setzt sich aus einer Vielzahl von Einzelreaktionen zusammen und wird über ein bisher nur unvollständig verstandenes Signalsystem ausgelöst. Da eine Pflanzenart auf den Befall mit unterschiedlichen Pathogenen oftmals mit den gleichen Abwehrantworten reagiert, ist in den meisten Fällen unbekannt, welche Abwehrreaktionen in einer bestimmten Pflanze-Pathogen-Interaktion für die Resistenz notwendig sind und wo Redundanz besteht. Die einzelnen Komponenten der komplexen pflanzlichen Antwort sind jedoch bei verschiedenen Pathogenen unterschiedlich wirksam und für die Bekämpfung eines bestimmten Mikroorganismus wäre in den meisten Fällen nicht das gesamte Spektrum der induzierten Abwehrantwort notwendig (Glazebrook und Ausubel, 1994; Thomma *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1999; Maleck und Dietrich, 1999).

Eine der schnellsten Reaktionen, die bei Infektion von Pflanzengewebe zu beobachten ist, ist die massive Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. OH⁻- und O₂⁻-Radikalen und H₂O₂. Dieser als "oxidative burst" bezeichnete Prozeß weist einige Ähnlichkeiten mit dem "respiratory burst" in Säugerleukocyten auf und geht nach weit

verbreiteter Auffassung ebenfalls auf die primäre Bildung von O_2^- -Ionen durch eine NADPH-Oxidase zurück (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Verschiedene Gene mit Homologien zur katalytischen Untereinheit der Säuger-NADPH-Oxidase sind in der Vergangenheit kloniert worden, doch konnte für die entsprechenden Genprodukte bisher weder NADPH-Oxidaseaktivität noch eine andere Funktion innerhalb des „oxidative burst“ nachgewiesen werden (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998). Der „oxidative burst“ ist ein wichtiges Element der pflanzlichen Abwehrantwort und dient vermutlich u. a. dem Abtöten eingedrungener Schadorganismen und der Vernetzung von Zellwandbestandteilen (Peng und Kuc, 1992; Brisson *et al.*, 1994). Eine zunehmende Anzahl von Arbeiten deutet jedoch auch auf eine zentrale Rolle des „oxidative burst“ in der Signaltransduktion und bei der Auslösung der Resistenzantwort hin (Lamb und Dixon, 1997; Scheel, 1998).

Bei Pilzinfektion und Verwundung wird oftmals direkt an der Infektionsstelle eine Verstärkung der pflanzlichen Zellwände durch Auflagerung von Kallose beobachtet. Die Bildung dieser zusätzlichen physikalischen Barriere geht auf die allosterische Aktivierung einer β -(1-3)-Glucansynthase zurück, die konstitutiv im Plasmalemma vorhanden ist (Kauss *et al.*, 1989). Ebenfalls auf die Infektionsstelle begrenzt ist die hypersensitive Reaktion (HR). Dieses zentrale Element in der Abwehrreaktion vieler Pflanzen bewirkt das Absterben von Zellen in einem begrenzten Bereich rund um die Infektionsstelle und entzieht so dem Pathogen die Nahrungs- und Existenzgrundlage (Greenberg, 1997). Im Gegensatz zum Zelltod, der bei erfolgreicher Kolonisation einer Pflanze durch ein Pathogen beobachtet wird und ein Krankheitssymptom darstellt, ist der mit der HR assoziierte Zelltod ein aktiver Prozeß der Pflanzenzelle und wird aus diesem Grunde als programmierter Zelltod bezeichnet (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997; Heath, 1998).

In einem begrenzten Bereich um die Infektionsstelle herum wird die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert bzw. reprimiert (Bowles, 1990; Scheel, 1991; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998). Einige dieser pathogenresponsiven Gene kodieren für Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, was dazu führt, daß in vielen Pflanzen der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel und die Synthese von Phenolen, wie z. B. den Vorstufen des Lignins hochreguliert wird (Dixon und Paiva, 1995; Weisshaar und Jenkins, 1998). Außerdem akkumulieren in vielen Pflanzen als Antwort auf Pathogenbefall und infolge der Expression der entsprechenden Enzyme antibiotisch wirkende Produkte des Sekundärstoffwechsels, sogenannte Phytoalexine (Smith, 1996). Neben Produkten, die auf den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel zurückgehen, wie z. B. Cumarine, Stilbene und Flavanole, können dies u. a. Alkaloide, Saponine oder Terpene sein (Bailey and Mansfield, 1982). Eine andere Gruppe von Genen, deren Transkription in der Pathogenantwort induziert wird, kodiert für Proteine, die unmittelbar der Zellwandverstärkung dienen. Neben Proteinen, die in die Zellwand eingelagert werden wie beispielsweise hydroxyprolinreiche Glycoproteine und glycinreiche Proteine, sind dies Peroxidasen, die eine zusätzliche Vernetzung der Zellwandbestandteile katalysieren (Kawallek *et al.*, 1995; Cassab, 1998). Ein Teil der Proteine, die nach Pathogeninfektion akkumulieren und deren Funktion nicht in allen Fällen bekannt ist, wurde unter dem Sammelbegriff PR-Proteine („pathogenesis-related“) zusammengefaßt (van Loon *et al.*, 1994; Kombrink und Somssich, 1997). Dazu

zählen u. a. hydrolytische Enzyme, wie beispielsweise β -(1-3)-Glucanasen, Proteasen und Chitinasen. Diese Enzyme akkumulieren in den pflanzlichen Vakuolen und im Apoplasten, wo sie möglicherweise pilzliche oder bakterielle Zellwände abbauen (Kombrink und Somssich, 1997). Neben diesen lokalen Reaktionen wird in vielen Pflanzen nach Infektion mit einem Pathogen eine systemische Resistenz ("systemic acquired resistance" SAR und "induced systemic resistance" ISR) in der gesamten Pflanze induziert, die gegen nachfolgende Infektionen mit verschiedenen Pathogenen immunisiert (z. B. Chitinasen und Glucanasen) (Ryals *et al.*, 1996; Van Lon, 1997; Dong, 1998).

Die Analyse der Promotorbereiche einer Vielzahl pathogenaktivierter Gene aus verschiedenen Pflanzen hat gezeigt, daß die pathogenresponsiven Promotoren bezüglich der Anzahl, Anordnung und Art der regulatorischen Elemente sehr voneinander abweichen (Somssich, 1994; Rushton und Somssich, 1998). Trotz dieser Unterschiede in der Promotorarchitektur finden sich einige typische *cis*-Elemente in den Promotoren pathogenaktivierter Gene, wie z. B. GCC-, W- und G-Boxen und MRE-ähnliche Sequenzen (Rushton und Somssich, 1998). Mit Hilfe dieser Elemente konnten DNA-bindende Proteine isoliert werden, die z. T. pflanzenspezifisch sind, wie die WRKY- und EREB-Proteine ("ethylen response element binding"), die an W- bzw. GCC-Boxen binden, z. T. aber auch in anderen Eukaryoten gefunden werden, wie MYP- und bZIP-Faktoren (Rushton und Somssich, 1998).

1.2 Pathogenerkennung

Das oben skizzierte Abwehrprogramm wird erst ausgelöst, wenn die Pflanze ein eindringendes Pathogen wahrgenommen hat. Die Pathogenerkennung ist in der Regel rezeptorvermittelt und erfolgt über Bestandteile des Pathogens oder Komponenten der pflanzlichen Zellwand, die durch die Wirkung hydrolytischer Enzyme des Pathogens freigesetzt werden (Ebel und Cosio, 1994; Hahn, 1996; Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Ebel und Mithöfer, 1998). Derartige, als Elicitoren bezeichnete Substanzen lösen z. T. nur in einzelnen Spezies, z. T. in verschiedenen Pflanzenarten in geringer Konzentration ein breites Spektrum pflanzlicher Resistenzreaktionen aus. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden in der Vergangenheit Polysaccharid-, Polypeptid-, Glycoprotein- und Lipidelicatoren gereinigt (Bostock *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1984; Ricci *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1991). In der Plasmamembran einzelner Pflanzen konnten durch Bindungsstudien hochaffine Bindungsstellen für einige dieser Elicitoren nachgewiesen werden (Cosio *et al.*, 1990; Nürnberger *et al.*, 1994; Wendehenne *et al.*, 1995; Shibuya *et al.*, 1996; Hanania und Avni, 1997). Lediglich in einem Fall konnte bisher ein solcher Elicitorrezeptor bis zur Homogenität gereinigt und in der Folge kloniert werden (Mithöfer *et al.*, 1996; Umemoto *et al.*, 1997). Die Sequenz dieses klonierten Heptaglucanrezeptors aus Soja und die Eigenschaften der bisher charakterisierten Elicitorrezeptoren geben jedoch keinen Aufschluß darüber, wie durch sie das Signal zur Aktivierung der Pathogenabwehr ausgelöst wird. So gibt es bisher keine Hinweise, daß es sich bei ihnen um bekannte Rezeptortypen wie Rezeptortyrosinkinasen oder Serpentine-Rezeptoren handelt.

1.3 Rassenspezifische Resistenz

Trotz des wirkungsvollen Abwehrsystems der Pflanzen haben einzelne Pathogenarten Mechanismen entwickelt, um bestimmte Pflanzenspezies zu parasitieren. Durch Pathogenizitätsfaktoren sind sie in der Lage, die pflanzliche Abwehr auszuschalten, zu verzögern oder unschädlich zu machen (Prell, 1996). Eine solche Pflanze-Pathogen-Interaktion, die erfolgreich für das Pathogen verläuft, wird als kompatibel bezeichnet. Aufgrund der Koevolution zwischen Pathogenen und ihren Wirten existieren jedoch auch in Pflanzenarten, die suszeptibel für ein bestimmtes Pathogen sind, einzelne Sorten, die gegen bestimmte Rassen des Pathogens resistent sind. In der Regel gleicht das Muster der Abwehrantwort, das bei Vorliegen einer solchen Wirts- bzw. rassenspezifischen Resistenz beobachtet wird, dem Abwehrprogramm, das für die Nichtwirtsresistenz beschrieben wurde (Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Die Wirtsresistenz ist vom Genotyp der Wirtspflanzensorte und der Pathogenrasse abhängig. Arbeiten von Flor über die Vererbung von Pflanzenresistenz und Pathogenvirulenz im Pathosystem Flachs/Flachsrost haben zur Aufstellung der Gen-für-Gen-Hypothese für die Beschreibung der Wirtsresistenz geführt (Flor, 1971). Dieses allgemein anerkannte Konzept besagt, daß eine Pflanze-Pathogen-Interaktion bei Vorliegen einer Grundkompatibilität nur dann inkompatibel ist, wenn das Pathogen ein Avirulenzgen (*avr-Gen*) trägt und der Wirt ein komplementäres Resistenzgen (*R-Gen*) besitzt. Die monogen determinierten Phänotypen Resistenz und Avirulenz sind in der Regel dominant, was zu der Hypothese geführt hat, daß in diesen Fällen *R-Gen*produkte Rezeptoren für *avr-Gen*produkte sind (de Witt, 1997). In der Tat konnte für einige *avr-Gen*produkte gezeigt werden, daß sie als rassenspezifische Elicitoren wirken, d. h. daß ihre Applikation in resistenten Pflanzensorten eine Resistenzantwort auslöst (van den Ackerveken *et al.*, 1992; Joosten *et al.*, 1994; Wewelsiep *et al.*, 1991; Knogge, 1996). Der Nachweis einer Rezeptorfunktion für die entsprechenden *R-Gen*produkte steht in fast allen Fällen jedoch noch aus, obwohl in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von *R-Genen* kloniert wurde (de Wit, 1997; Hammond-Kosack und Jones, 1997). Lediglich für das bakterielle *avr-Gen* *avrPto* konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem entsprechenden *R-Gen* *Pto* nachgewiesen werden (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996).

1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenantwort wurde in der Vergangenheit vor allem genetisch in *Arabidopsis thaliana*, Gerste und Tomate und pharmakologisch in Zellsuspensionskulturen untersucht (Ebel und Scheel, 1992; Ebel und Scheel, 1997; Glazebrook *et al.*, 1997a; Ebel und Mitthöfer, 1998; Innes, 1998; Scheel, 1998). Die Ergebnisse von Mutantenscreens in *Arabidopsis*, bei denen auf Verlust oder Verminderung der *R-Gen*-vermittelten Resistenz oder Ausfall einzelner Aspekte in der Resistenzantwort selektiert wurde, deuten darauf hin, daß bereits sehr früh nach Pathogenerkennung eine Verzweigung der Signalwege erfolgt (Innes, 1998; van der

Biezen und Jones, 1998). Nur sehr wenige Mutanten zeigen einen vollständigen Verlust der Resistenz; in den meisten Fällen wird ein intermediärer Resistenzphänotyp beobachtet (Century *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Rogers and Ausubel, 1997; Glazebrook *et al.*, 1997b). Dabei sind alle bisher beschriebenen Signalmutationen Supressoren mehrerer, aber nicht aller *R*-Gene. Die *ndr1*-Mutation ("no disease resistance") suprimiert beispielsweise die *R*-Gene *RPM1*, *RPS2* und *RPS5*, die alle putative "leucine zipper" in ihrem N-Terminus besitzen (Century *et al.*, 1995). Die Mutation beeinträchtigt jedoch nicht die Funktion von *R*-Genen, die stattdessen im N-Terminus eine Domäne mit Homologien zur Effektordomäne des *Drosophila* TOLL-Gens und Interleukin-1 Rezeptoren aus Säugern aufweisen (TIR-Domäne). Derartige Resistenzgene mit einer TIR-Domäne wie z. B. *RPS4*, *RPP2*, *RPP4*, *RPP5* und *RPP21* werden jedoch durch *eds1* ("enhanced disease susceptibility") suprimiert (Parker, *et al.*, 1996; Aarts *et al.*, 1998). Ein weiterer *R*-Genlocus (*RPP8*) wirkt unabhängig von *eds1* und *ndr1* (Aarts *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß unterschiedliche *R*-Gene verschiedene Signalwege benutzen. Inwiefern sich die dadurch ausgelösten Abwehrprogramme unterscheiden und ob die verschiedenen Signalwege an bestimmten Stellen konvergieren, ist unbekannt. Der *NDR1*- und der *EDS1*-Locus sind kloniert worden, doch die Funktion ihrer Genprodukte ist unbekannt, auch wenn Homologien der *EDS1*-Sequenz zu eukaryotischen Lipasen Anlaß zu Spekulationen geben (Century *et al.*, 1997; Falk *et al.*, 1999).

Eine Ausnahmestellung unter den bisher klonierten Resistenzgenen nimmt *Pto* aus Tomate ein. Dieses Gen kodiert für eine cytoplasmatische Serin/Threonin-Proteinkinase (S/T-Proteinkinase) und vermittelt Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* Stämmen, die das Avirulenzgen *avrPto* besitzen (Martin *et al.*, 1993; Loh und Martin, 1996). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte die direkte Interaktion zwischen *avrPto* und *Pto* nachgewiesen werden. Ebenfalls mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden verschiedene Gene isoliert, deren Genprodukte mit *Pto* interagieren. *Pti1* ("Pto-interacting gene 1") kodiert für eine weitere S/T-Proteinkinase und wird durch *Pto in vitro* phosphoryliert (Zhou *et al.*, 1995). *Pti4*, *5* und *6* kodieren für putative Transkriptionsfaktoren mit Homologien zu EREB-Proteinen und binden an GCC-Boxen pathogenresponsiver Gene (Zhou *et al.*, 1997). Obwohl viele Aspekte dieser Signalkette unbekannt sind, läßt sich aus den dargelegten Ergebnissen ein Modell ableiten, in dem *Pto* nach Bindung an *avrPto* die Transkriptionsfaktoren *Pti4*, *5* und *6* phosphoryliert und damit *PR*-Genexpression induziert (Zhou *et al.*, 1997). Davon unabhängig wird über *Pti1*-Phosphorylierung ein paralleler Signalweg aktiviert, der möglicherweise die HR auslöst (Zhou *et al.*, 1995).

Untersuchungen in Suspensionszellkulturen zeigten als schnellste Reaktion nach Elicitorbehandlung einen Efflux von Cl^- und K^+ -Ionen, einen Influx extracellulärer Protonen und Ca^{2+} -Ionen und einen Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Felix *et al.*, 1993; Nürnberger *et al.*, 1994; Tavernier *et al.*, 1995; Chandra und Low, 1997). Verschiedene Inhibitor- und Effektorstudien deuten darauf hin, daß an der Auslösung der Ionenflüsse G-Proteine und Proteinkinasen beteiligt sind (Legendre *et al.*, 1992; Felix *et al.*, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Ionenflüsse in den untersuchten Systemen notwendig und

hinreichend für die Auslösung der nachfolgenden Abwehrantworten sind (Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997). Ca^{2+} ist ein ubiquitärer "second messenger" in Eukaryoten - die Ca^{2+} -Homöostase und -Wirkung ist jedoch ausgesprochen komplex und in Pflanzen nur unvollständig verstanden (Trewavas und Malhó, 1998). Inhibitorstudien, Arbeiten mit Ca^{2+} -Chelatoren und Patch-Clamp-Untersuchungen zeigen, daß ein Teil des elicitorstimulierten Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran erfolgt (Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Gelli *et al.*, 1997); inwiefern jedoch auch intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher involviert sind, ist unbekannt.

Die während des "oxidative burst" entstehenden ROS haben neben ihrer direkten Abwehrwirkung auch eine wichtige Signalfunktion (Lamb und Dixon, 1997). Inhibierung des „oxidative burst“ blockiert in zahlreichen Zellsuspensionskulturen verschiedene Aspekte der Resistenzantwort, und während in einigen Systemen die Applikation von H_2O_2 Abwehrantworten auslöst, ist dies in anderen Systemen nur durch O_2^- -Behandlung möglich (Levine *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

Auch der aus Säugetieren bekannte "second messenger" Stickoxid (NO) ist möglicherweise eine wichtige Signalkomponente in der Auslösung der pflanzlichen Pathogenantwort. In Tabak wurde gezeigt, daß nach Infektion mit avirulenten Pathogenen NO-Synthaseaktivität induziert wird (Durner *et al.*, 1998). In Arabidopsispflanzen und Soja-Zellsuspensionskulturen haben NO und H_2O_2 synergistische Wirkung in der Auslösung von Zelltod (Delledonne *et al.*, 1998) und in Tabak induziert NO-Behandlung PR-Genexpression (Durner *et al.*, 1998), in Soja und Kartoffel Phytoalexinproduktion (Delledonne *et al.*, 1998; Noritake *et al.*, 1996). Möglicherweise wirkt NO ebenso wie in Säugern über ADP-Ribose und cyclisches GMP (Durner *et al.*, 1998). Weitere Komponenten, die die pflanzliche Pathogenabwehr und die Induktion der systemischen Resistenz regulieren, sind die Phytohormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Dong, 1998; Reymond und Farmer, 1999).

Proteinkinasen sind zentrale Elemente der eukaryotischen Signaltransduktion und scheinen auch auf verschiedenen Ebenen der Aktivierung der Resistenzantwort eine wichtige Rolle zu spielen. Die beteiligten Proteinkinasen sind jedoch in der Regel bisher unbekannt. Eine Ausnahme bilden das bereits diskutierte R-Gen *Pto* und *Xa21*, das in Reis Resistenz gegen alle Rassen des bakteriellen Pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* vermittelt. *Xa21* kodiert für ein putatives Membranprotein mit einer N-terminalen S/T-Proteinkinasedomäne (Song *et al.*, 1995). Die übrigen bisher klonierten Resistenzgene besitzen zwar keine Proteinkinasedomänen, die Aktivierung von Kinasen könnte jedoch eines der frühesten Signale nach Erkennung der avr-Genprodukte sein (Innes, 1998; van der Biezen und Jones, 1998).

In verschiedenen Zellkulturmodellen wurde durch *In-Vivo*-Markierungsversuche gezeigt, daß sich das Phosphorylierungsmuster zellulärer Proteine sehr schnell nach Elicitierung verändert (Dietrich *et al.*, 1990; Felix *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1993; Raz und Fluhr, 1993; Viard *et al.*, 1994). Bereits die Auslösung der elicitorstimulierten Ionenflüsse wird vermutlich durch Proteinkinasen vermittelt, denn die Proteinkinaseinhibitoren K252a und Staurosporin inhibieren in verschiedenen Systemen die Alkalinisierung des Kulturmediums und den Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Grosskopf

et al., 1990; Conrath *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1993; Viard *et al.*, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; B. Blume, persönliche Mitteilung). Gleichzeitig werden durch K252a und Staurosporin auch spätere Elicitorantworten, wie der "oxidative burst", Ethylen- und Jasmonat-Bildung und die Transkription von elicitorresponsiven Genen blockiert (Grosskopf *et al.*, 1990; Schwacke und Hager, 1992; Felix *et al.*, 1993; Kamada und Muto, 1994; Viard *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995; Mathieu *et al.*, 1996; Menke *et al.*, 1999). Umgekehrt induzieren Proteinphosphataseinhibitoren wie z. B. Calyculin A und Cantharidin Ionenflüsse, den "oxidative burst" und die Transkription einiger Abwehrgene in verschiedenen Systemen (Felix *et al.*, 1994; MacKintosh *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Chandra und Low, 1995; Mathieu *et al.*, 1996). Untersuchungen aus Kartoffel (Subramaniam *et al.*, 1997) deuten auf die Beteiligung einer Proteinkinase C (PKC) in der Ca^{2+} -vermittelten Elicitorsignaltransduktion hin. PKCs sind eine Klasse von S/T-Proteinkinasen, die in der Regel durch Ca^{2+} und Diacylglycerol aktiviert werden und nach Aktivierung mit der Plasmamembran assoziieren. PKC wurde aus Kartoffelproteinextrakt partiell gereinigt, immunologisch nachgewiesen und durch Ca^{2+} und den PKC-Aktivator TPA (12-O-Tetradecanylphorbol-13-acetat) aktiviert (Subramaniam *et al.*, 1997). Parallel dazu wurde gezeigt, daß der spezifische PKC-Inhibitor Sphingosin die durch Arachidonsäure ausgelöste Expression des *PR10a*-Gens in Kartoffelscheiben inhibiert, während TPA *PR10a*-Transkription induziert (Subramaniam *et al.*, 1997). Der direkte Nachweis einer elicitorresponsiven PKC-Aktivität wurde jedoch nicht erbracht.

Transkriptionsfaktoren stellen ein wichtiges Ziel von Signalketten dar, und ihre Aktivität wird in Pilzen und Säugern oftmals durch Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert (Hill und Treisman, 1995). Phosphorylierungen können dabei die Lokalisierung der Transkriptionsfaktoren, die DNA-Bindung, ihr transaktivierendes Potential oder die Interaktion mit anderen Faktoren modifizieren (Hunter und Karin, 1992). Über die Regulation der Transkription pflanzlicher Gene durch Phosphorylierungen der entsprechenden Transkriptionsfaktoren ist wenig bekannt; es ist jedoch davon auszugehen, daß ähnliche Regulationsprozesse wie in anderen Eukaryoten existieren. In Soja konnte nachgewiesen werden, daß das bZIP-Protein G/HBF-1 nach Elicitierung phosphoryliert wird (Dröge-Laser *et al.*, 1997). G/HBF-1 wird konstitutiv exprimiert und bindet an G- und H-Box *cis*-Elemente, die in den Promotoren von Genen des Phenylpropanstoffwechsel gefunden werden und die Pathogen- und Elicitorresponsivität dieser Gene vermitteln (Dron *et al.*, 1988; Lois *et al.*, 1989; Loake *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1992). In Proteinextrakten aus Sojazellen konnte eine cytosolische, elicitorresponsive Proteinkinaseaktivität detektiert werden, die rekombinantes G/HBF-1 phosphoryliert und dadurch die Bindung von G/HBF-1 an G- und H-Box *cis*-Elemente eines elicitorresponsiven Chalkonsynthase-Promotors induziert (Dröge-Laser *et al.*, 1997). In Tabak und Kartoffel konnte für einzelne DNA-bindende Proteine eine phosphorylierungsabhängige Bindung an elicitorresponsive Promotorelemente gezeigt werden (Després *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999).

1.5 Das Modellsystem aus einer Petersiliezellensuspensionskultur und Peptidelicitoren

Petersilie ist gegen Infektionen durch den phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora sojae* resistent. Auskeimende Zoosporen des Pilzes lösen in Petersilieblättern eine Nichtwirts-Resistenzantwort aus, die eine Ausbreitung des Pilzes wirkungsvoll verhindert und alle Komponenten umfaßt, die in Abschnitt 1.1 beschrieben worden sind, z. B. lokal begrenzter "oxidative burst", Kalloseapposition, HR, Expression von Abwehrgenen und Produktion von Furanocumarinphytoalexinen (Jahnen und Hahlbrock, 1988; Schmelzer *et al.*, 1989; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Hahlbrock *et al.*, 1995). Zellsuspensionskulturen der Petersilie und daraus isolierte Protoplasten reagieren nach Behandlung mit Kulturfiltrat oder Präparationen der Mycelwand von *Phytophthora sojae* mit einem Programm das der Resistenzantwort gleicht (Hauffe *et al.*, 1986; Kombrink und Hahlbrock, 1986; Dangl *et al.*, 1987; Somssich *et al.*, 1989; Kawalleck *et al.*, 1993; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Kawalleck *et al.*, 1995; Logemann *et al.*, 1995; Hahlbrock *et al.*, 1995). Sie sind deshalb ein gutes Modellsystem um biochemisch und molekularbiologisch die Signalmechanismen zu untersuchen, die zur Erkennung des Pilzes und zur Auslösung der Abwehrantworten führen.

Aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora sojae* wurde ein 42-kDa-Glycoprotein aufgereinigt, das in geringen Konzentration die Abwehrantworten der Petersiliezellen auslöst (Parker *et al.*, 1991). Innerhalb dieses Glycoproteins konnte eine 13 Aminosäuren lange Peptidsequenz (Pep13) identifiziert werden, die notwendig und hinreichend für die Elicitoraktivität des Proteins ist (Nürnberger *et al.*, 1994). Pep13 oder Peptide, die dieses Motiv enthalten, wie das längere und stabilere Pep25 lösen in Suspensionszellen die gleichen Abwehrantworten aus, wie das *Phytophthora sojae*-Kulturfiltrat oder das 42-kDa-Glycoprotein. In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Pep13 wurde gezeigt, daß eine einzige Klasse hochaffiner Bindungsstellen in der Petersilieplasmamembran existiert, und daß die Pep13-Bindung reversibel und saturierbar ist (Nürnberger *et al.*, 1994). Durch Verwendung proteinvernetzender Substanzen konnte ein 100 kDa großes Plasmamembranprotein identifiziert werden, das möglicherweise den Rezeptor darstellt (Nürnberger *et al.*, 1995) und durch Affinitätschromatographie partiell gereinigt wurde (Nennstiel *et al.*, 1998).

Als schnellste Reaktion der Petersiliezellen nach Elicitorapplikation wurde eine Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen, ein Ausstrom von Cl^- - und K^+ -Ionen, eine Alkalinisierung des Kulturmediums und ein Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration gefunden (Nürnberger *et al.*, 1994; B. Blume, persönliche Mitteilung). Diese Ionenströme, die notwendig und hinreichend für die Auslösung aller späteren Antworten sind, gehen wahrscheinlich auf die Aktivierung elicitorresponsiver Ionenkanäle und -transporter zurück (Jabs, 1994; Jabs *et al.*, 1997). In patch clamp-Untersuchungen mit Petersilieprotoplasten konnte ein derartiger elicitorresponsiver Ca^{2+} -Kanal in der Plasmamembran identifiziert und charakterisiert werden (Zimmermann *et al.*, 1997).

Ebenfalls innerhalb von Minuten nach Elicitorzugabe wird die Akkumulation von ROS im Kulturmedium detektiert (Nürnberger *et al.*, 1994). Inhibierung des "oxidative burst"

durch DPI (Diphenyleniodonium), einen Inhibitor NADPH-verbrauchender Enzyme (Cross und Jones, 1986), blockiert verschiedene Elicitorantworten wie z. B. die transkriptionelle Aktivierung einzelner elicitorresponsiver Gene und die Phytoalexinsynthese (Jabs *et al.*, 1997). Setzt man dem Kulturmedium dahingegen O_2^- zu, so wird die Phytoalexinsynthese induziert (Jabs *et al.*, 1997). Offensichtlich sind die O_2^- -Ionen nicht aber H_2O_2 frühe Komponenten der Elicitorsignalkette und notwendig und hinreichend für die Induktion der Furanocumarinsynthese.

Eine weitere sehr schnelle Antwort der Petersiliezellen auf Elicitorbehandlung ist die *De-Novo*-Synthese von Jasmonsäure (Kroj, 1995). Welche Signalfunktion die Jasmonsäure innerhalb der Elicitorsignaltransduktion in Petersilie spielt, ist bisher unbekannt, da die Inhibierung der elicitorstimulierten Jasmonatsynthese keinen Einfluß auf die Expression einzelner Abwehrgene und die Phytoalexinakkumulation hat (Kroj, 1995).

Die Promotoren einiger elicitorresponsiver Petersiliegene sind in der Vergangenheit detailliert untersucht worden. Dabei konnten verschiedene elicitorresponsive *cis*-Elemente identifiziert und daran bindende Proteine isoliert werden. Innerhalb der Promotoren der Petersiliegene *PR1.1* und *PR1.2* wurden beispielsweise jeweils zwei W-Boxen gefunden, die unabhängig voneinander funktionieren und notwendig für die Elicitorresponsivität der Promotoren sind (Rushton *et al.*, 1996). Mit Hilfe dieser *cis*-Elemente wurden drei WRKY-Proteine isoliert, die an die *PR1*-W-Boxen binden und deren Expression durch Elicitierung reguliert wird (Rushton *et al.*, 1996). Der Promotor von *WRKY1*, dessen Transkription innerhalb von 15 Minuten nach Elicitierung unabhängig von zusätzlicher Proteinsynthese aktiviert wird, enthält ebenfalls zwei elicitorresponsive W-Boxen (I. Somssich und T. Eulgem, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, daß an der Aktivierung der *WRKY1*-Expression weitere, konstitutiv exprimierte WRKY-Transkriptionsfaktoren beteiligt sind.

Durch *In-Vivo*-“Footprinting“-Analyse wurden P- und L-Boxen im Promotor des Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-Gens (*PAL*) (Lois *et al.*, 1989) identifiziert, die auch in den Promotoren von elicitorresponsiven Genen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels anderer Pflanzen gefunden wurden (Weisshaar und Jenkins, 1998). An die P-Box bindet BPF1, ein Protein, das Homologie zu MYB-Proteinen aufweist (da Costa e Silva *et al.*, 1993) und dessen Expression nach Elicitierung mit ähnlicher Kinetik induziert wird, wie die *WRKY1*- und *3*-Transkription (da Costa e Silva *et al.*, 1993; Rushton *et al.*, 1996). Auch innerhalb des Petersilie-*PR2*-Promotors wurden elicitorresponsive *cis*-Elemente identifiziert, an die das Homeodomain-Protein PRHP bindet (van de Löcht *et al.*, 1990; Korfhage *et al.*, 1994).

1.6 Ziele der Arbeit

In-Vivo-Phosphorylierungsstudien in Zellsuspensionskulturen der Petersilie haben gezeigt, daß sich das Phosphorylierungsmuster zellulärer Proteine nach Elicitorzugabe sehr schnell verändert (Dietrich *et al.*, 1990). Darüberhinaus werden durch Proteinkinase- und Phosphataseinhibitoren auf verschiedenen Ebenen der Elicitorsignalkette Antworten blockiert und induziert (Conrath *et al.*, 1991; Renelt *et al.*, 1993; B. Blume, persönliche

Mitteilung). Staurosporin und K252a blockieren die elicitorresponsiven Ionenflüsse, den Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und den "oxidative burst", aber induzieren die elicitorunabhängige Bildung von Phytoalexinen (Conrath *et al.*, 1991; B. Blume, persönliche Mitteilung). Zugabe des Phosphataseinhibitors Okadainsäure induziert ebenfalls die Phytoalexinsynthese (Renelt *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse und der Vergleich mit gut untersuchten Signalwegen in Pilzen und Tieren erlaubt den Schluß, daß verschiedene Proteinkinasen mit reprimierender oder aktivierender Funktion auf unterschiedlichen Ebenen der Elicitorsignalkette wirken. Ihre molekulare Kenntnis und die Aufklärung ihrer Funktion würde einen entscheidenden Fortschritt im Verständnis der Elicitorsignaltransduktion bedeuten.

Vorausgegangene Arbeiten mit Tabakzellkulturen haben gezeigt, daß möglicherweise eine S/T-Proteinkinase aus der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) durch Pilzelicitoren aktiviert wird (Suzuki und Shinshi, 1995). Ob es sich bei dieser elicitorresponsiven Kinase tatsächlich um eine MAPK handelt, wurde nicht demonstriert. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob MAPKs in der Elicitorantwort von *Petersilie* aktiviert werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob diese Aktivierung ein rezeptorvermittelter Prozeß oder lediglich eine unspezifische Reaktion der Pflanzenzellen auf pilzliche Zellwandbestandteile ist, und an welcher Stelle innerhalb der Elicitorsignalkette die MAPK-Aktivierung lokalisiert ist. Die elicitorresponsiven MAPKs sollten molekular charakterisiert werden, um anschließend ihre Funktion in der Elicitorsignaltransduktion bestimmen zu können und ausgehend von ihnen neue Signalelemente zu isolieren.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferten die Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck. Chemikalien für Kulturmedien wurden bei den Firmen Difco Lab. (Detroit, USA) und Sigma bezogen. Enzyme für die Molekularbiologie wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Boehringer (Mannheim), GibcoBRL (Eggenstein), Eurogentec (Seraing, Belgien) und Promega (Madison, USA) geliefert. Es wurden Röntgenfilme der Firma Kodak (Rochester, USA) benutzt. Oligonukleotide wurden über die Firma MWG-Biotech (München) bezogen. Die Nukleotidsequenzen der Oligonukleotide sind im Anhang 1 aufgeführt. Monoklonale HA-Antikörper der Firma Babco (San Francisco, USA) wurden über die Firma Eurogentec bezogen. Anti-ActiveTM-MAPK-Antikörper lieferte die Firma Promega.

2.2 Kultivierung, Behandlung und Aufarbeitung der Petersiliezellen und Petersilieprotoplasten

Zellsuspensionskulturen der Petersilie (*Petroselinum crispum*) wurden in modifiziertem Gamborgs B5-Medium mit 1 mg l⁻¹ 2,4-D im Dunkeln bei 26°C geschüttelt und alle 7 Tage in frisches Medium überführt (Hahlbrock, 1975).

2.2.1 Gewinnung von Petersilieprotoplasten

Protoplasten wurden nach der Methode von Dangl *et al.* (1987) unter Verwendung 5 Tage alter Zellkulturen isoliert.

2.2.2 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen

Für Elicitierungsexperimente wurden 6 Tage alte Zellen durch Filtration geerntet, mit I-Medium gewaschen und anschließend in I-Medium (10 mM Mes pH 5,7, 4% B5-Medium, 3% Saccharose) resuspendiert (100 g FG l⁻¹). Nach 30 min Äquilibrieren im Dunkeln unter konstantem Schütteln wurde die Suspension mit wässriger Elicitorstammlösung versetzt. Für Pep25 (Sequenz: DVTAGAEVWNQPVRGFKVYE-QTEMT) wurde eine Stammlösung von 10 µg/ml verwendet, für Pep13 (Sequenz: VWNQPVRGFKVYE) und die Pep13-Analoga eine 10 µM Lösung (Nürnberger *et al.*, 1994).

Zur Untersuchung der Inhibitorwirkung verschiedener Substanzen wurde die Zellsuspension mit 0.1% 1000fach konzentrierten Stammlösungen der Verbindungen (in

DMSO) versetzt und vor Zugabe des Elicitors für 30 min vorinkubiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Elicitorbehandlung durch Filtration geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gleich behandelten Proben wurden nach 24 h die Furanocumarinphytoalexine bestimmt (Parker *et al.*, 1991).

2.2.3 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium

Die Menge der durch die Zellen oder Protoplasten gebildeten Furanocumarinphytoalexine wurde nach 24 h Elicitorbehandlung anhand der Fluoreszenz des Kulturmediums (360 nm Excitation /440 nm Emission) bestimmt (Cytofluor II, Biossearch, Bedford, USA) (Parker *et al.*, 1991).

2.2.4 Proteinextraktion aus Petersiliezellen

Gefrorene Petersiliezellen (100 µg) wurden mit 200 µl Kinaseextraktionspuffer (Tab.1) versetzt und mit einem Glasstab aufgeschlossen. Nach 15 min Zentrifugation (4°C, 15000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und direkt für Immunpräzipitations-Kinaseexperimente verwendet oder bei -80°C eingefroren.

Tab. 1: Zusammensetzung des Kinaseextraktionspuffers

Kinaseextraktionspuffer	25 mM	Tris/HCl, pH 7,8
	75 mM	NaCl
	15 mM	EGTA
	15 mM	Glycerophosphat
	15 mM	4-Nitrophenylphosphatbis[Tris]
	10 mM	MgCl ₂
	1 mM	DTT
	1 mM	NaF
	0,5 mM	Na ₃ VO ₄
	0,5 mM	PMSF
	10 µg/ml	Leupetin
	10 µg/ml	Aprotenin
	0,1%	Tween

2.2.5 Transiente Transformation von Petersilieprotoplasten

Protoplasten wurden entsprechend der Methode von Dangl *et al.* (1987) mit 25 µg Plasmid (10 µg Reporterplasmid, 10 µg Effektorplasmid und 5 µg Standardisierungsplasmid) transformiert. Dabei wurden die Reporterkonstrukte PR1.1- (van de Löcht *et al.*, 1990) und PR2-GUS (Rushton *et al.*, 1996) aus dem *E. coli*-Stamm GM2163 (Woodcock *et al.*, 1989) gewonnen, da die basale und induzierte GUS-Expression in Petersilieprotoplasten stark durch den bakteriellen Wirtstamm bzw. den Methylierungsgrad der Reporterplasmide bestimmt wird (Torres *et al.*, 1993). In jedem Experiment wurden vier bis fünf parallele Transformationen pro Effektorkonstrukt durchgeführt. Im einzelnen waren folgende Arbeitsschritte erforderlich:

In Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (14 ml “round bottom tubes“; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, USA) wurden 200 µl PEG-Lösung (25% PEG₆₀₀ (Serva), 450 mM Mannitol, 100 mM CaCl₂), 40 µl Plasmidlösung (25 µg Plasmid in TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA)) und 200 µl Protoplastensuspension (1x10⁶ Protoplasten/ml in B5-Saccharose (0,4 M Saccharose, 3,2 g/l Gamborgs B5-Medium (Sigma), 0.1 mg/l 2.4-D) zusammengegeben und leicht geschüttelt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min wurden 5 ml 0,275 M Ca(NO₃)₂ zugegeben und die Protoplasten anschließend durch Zentrifugation sedimentiert (7 min, 800 rpm). Der Überstand wurde verworfen und die Protoplasten in 6 ml B5-Saccharose resuspendiert. Die einzelnen Transformationsansätze wurden zweigeteilt und nach 8 h wurde die eine Hälfte mit Wasser, die andere Hälfte mit Pep25 (50 ng/ml) versetzt. Nach weiteren 14 h wurden die Protoplasten in 25 ml 0,24 M CaCl₂ gegeben und in 2 aufeinanderfolgenden Zentrifugationsschritten (10 min, 2000 rpm, in 50 ml Röhrchen; 30 s, 10000 rpm, in 1,5 ml Reaktionsgefäßen) geerntet und bei -80°C eingefroren.

2.3 Molekularbiologische Arbeiten

Molekularbiologische Standardmethoden, die im folgenden nicht einzeln erwähnt sind, wurden, wie in Sambrock *et al.* (1989) beschrieben, durchgeführt.

2.3.1 Bakterienstämme, Phagen, Plasmide

Für molekularbiologische Arbeiten wurden die folgenden *E. coli*-Stämme (Tab. 2), Plasmide (Tab. 3) und Phagen (Tab. 4) verwendet:

Tab. 2: Verwendete *E. coli*-Stämme

<i>E. coli</i> -Stämme	Referenz
DH5α	Invitrogen, (San Diego, USA)
JM109	Promega
BMH 71-18 <i>mutS</i>	Promega
BL21	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
XL1-Blue-MRF'	Stratagene (La Jolla, USA)
XL0LR	Stratagene
GM2163	Woodcock <i>et al.</i> (1989)

Tab. 3: Verwendete Plasmidvektoren

Plasmide ¹	Charakteristika	Wirt	Referenz
PUC18/19	<i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r	DH5 α	Invitrogen
pBluescript SK ⁻	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r	DH5 α	Stratagene
pGEM-T	f1 ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , SP6 und T-Promotor	DH5 α , JM109	Promega
pGEX-5X-2	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI^q</i> , <i>tac</i> -Promotor, RBS, <i>GST</i>	DH5 α , BL21	Pharmacia
pGEX-2T-2	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI^q</i> , <i>tac</i> -Promotor, RBS, <i>GST</i>	DH5 α , BL21	Pharmacia
pRT100	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , CaMV-35S-Promotor, Nos-Terminator	DH5 α	Töpfer <i>et al.</i> (1987)
pBT4	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , CaMV-35S-Promotor, Nos-Terminator	DH5 α	Feldbrügge <i>et al.</i> (1994)
PR1.1-GUS	PUC9, PR1.1-Promotorfragment (840 bp), <i>GUS</i>	GM2163	Rushton <i>et al.</i> (1996)
PR2-GUS	PUC9, PR2-Promotorfragment (125 bp), <i>GUS</i>	GM2163	van de Löcht <i>et al.</i> (1990)

¹ Die für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendeten Plasmidvektoren sind unter 2.7.1 aufgeführt

Tab. 4: Verwendete Phagen

Phagen	Charakteristika	Wirt	Referenz
Lambda ZAP TM II	λ -Derivat, Excision, von pB SK ⁻	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
Lambda HybriZAP TM	λ -Derivat, Excision, von pAD-GAL4	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
ExAssist TM	M13-Derivat, <i>amber</i> Mutation	XL1-Blue-MRF'	Stratagene
R480	M13-Derivat, <i>amber</i> Mutation	JM109	Promega

2.3.2 Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von "QUIAprepTM"-Säulen der Firma Quiagen (Hilden) nach Herstellerprotokollen aus Bakterien-Übernachtskulturen aufgereinigt.

2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Bereiche, in denen sich die gewünschten Fragmente befanden, wurden ausgeschnitten und daraus mit Hilfe des "QIAquick™ gel extraction kit" der Firma Qiagen die DNA aufgereinigt.

2.3.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden unter Verwendung des "Megaprime DNA-labelling Kit" (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg) und mit [α -³²P]-dATP nach der "random prime"-Methode hergestellt. Nicht inkorporierte Radioaktivität wurde durch "Probe Quant™ G-50"-Säulen (Pharmacia) entfernt.

2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden mit "QIAquick™"-Zentrifugationssäulen (Qiagen, Hilden) gereinigt und anschließend nach Angaben des Herstellers in den pGEM-T-Vektor (Pomega) kloniert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen "DNA-Sequencer" (LICOR 4000L bzw. LONGREADER 4200, MWG-Biotech). Die Sequenzierreaktion wurde mit dem "SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing kit" (Epicentre Technologies; bezogen über BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf) oder dem "ThermiSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" (Amersham-Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für die Detektion der DNA-Fragmente besaßen die verwendeten Primer 5'-Fluoreszenzmarkierungen ("IRD800" bzw. "IRD700", MWG-Biotech).

2.3.7 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten

Sequenzdaten wurden mit dem Programm "DNASIS 2.1" (Hitachi, Tokyo, Japan) analysiert. Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden mit Hilfe von Programmen durchgeführt, die den BLAST-Algorithmus verwenden (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Dazu wurde der vom "National Centre for Biotechnological Information" (www.ncbi.nlm.nih.gov) und von der "Stanford Arabidopsis Database" (<http://genome-www.stanford.edu>) angebotene Service genutzt. Zur Abschätzung der Antigenizität von Peptidsequenzen wurden Programme verwendet, die auf den Methoden von Hoop und Woods (1981), Parker *et al.* (1986), Thornten *et al.*, (1986) und Welling *et al.* (1985) basieren.

2.3.8 Punktmutagenese

Die offenen Leserahmen von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden unter Verwendung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert (Anhang 1) und in den pGEM-T-Vektor kloniert (2.3.2). Unter Verwendung des "GeneEditor"-Kits (Promega) und 5'-phosphorylierter Oligonukleotide (Anhang 2) wurden nach Angaben des Herstellers die Punktmutationen in die Kinasesequenzen eingeführt.

Das "GeneEditor"-System basiert darauf, daß durch Verwendung zweier Oligonukleotide neben der gewünschten Mutation im Insert eine Mutation in das Ampizilinresistenzgen des Vektors eingeführt wird. Diese Mutation erzeugt eine zusätzliche Resistenz gegenüber der "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung (Promega) und ermöglicht so eine Selektion auf mutagenisierte Klone. Im einzelnen beinhaltet das Protokoll folgende Schritte:

Durch Infektion mit Helferphagen R408 (Promega) und unter Verwendung eines DNA-Reinigungskits für M13-Phagen ("QIAprepTM M13-System", Qiagen) wurde einzelsträngige DNA gewonnen. Anschließend wurden die Einzelstrang-DNA, ein Mutagenese-Oligonukleotid und das Selektions-Oligonukleotid in Annealingpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂) für 5 min auf 75°C erhitzt und anschließend mit 1°C/min auf 30°C abgekühlt. Unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase wurde ein Zweitstrang synthetisiert, der die Mutationen enthielt. Mit dem Reaktionsprodukt wurden *E. coli* BMH71-18 *mutS*-Zellen transformiert, die kein funktionierendes "DNA mismatch repair"-System besitzen (*mutS*) (Kramer *et al.*, 1984; Zell und Fritz, 1987) und somit den neu synthetisierten Strang nicht modifizieren. Nach Vermehrung und Selektion der Transformanten in Flüssigkultur, die "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung enthielt, wurde Plasmid-DNA isoliert. Anschließend wurden damit *E. coli* JM109-Zellen transformiert, mittels "GeneEditor"-Antibiotikum-Mischung positive Kolonien selektioniert und von Einzelkolonien Plasmid-DNA gewonnen. Durch automatische Sequenzierung wurde die Sequenz der Inserts bestimmt.

2.3.9 Konstruktion einer gerichteten cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Die Petersilie cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System wurde unter Verwendung des "ZAP-cDNATM Synthesis Kit" und des "HybriZAPTM Two-Hybrid Predigested Vector Kit" der Firma Stratagene hergestellt. Dazu wurde RNA, wie von Logemann *et al.* (1987) beschrieben, aus unbehandelten und für 30, 60 und 120 min elicitorbehandelten Petersiliezzellen gewonnen und vereinigt. Unter Verwendung des "poly(A)⁺RNA purification kit" der Firma Pharmacia wurde poly(A)⁺RNA angereichert und daraus mit Hilfe von oligo(dT) Primern, reverser Transkriptase und DNA-Polymerase cDNA synthetisiert. Nach einer Auffüllreaktion wurden EcoRI-Adaptoren anligiert, die cDNA mit XhoI verdaut und schließlich große Fragmente durch Sephacryl-S400 (Stratagene) angereichert. Die so entstandene cDNA wurde in die vorverdauten

Arme des HybriZAP™ λ -Phagen ligiert. Nach Reinigung der Phagen-DNA wurde diese mit "GigapackIII™ Gold"-Extrakt (Stratagene) verpackt und mit den erhaltenen Phagen XL1-Blue MRF' *E. coli*-Zellen infiziert.

Die Primärbank (3×10^6 pfu) wurde einmal amplifiziert; die resultierende Bank hatte einen Titer von $1,5 \times 10^9$ pfu/ml. Unter Verwendung des Helferphagen "EXAssist™" (Stratagene) und des *E. coli*-Stamms XL1-blue-MRF' wurde eine *In-Vivo*-Massen-Excision vorgenommen. Aus *E. coli*-XL0LR, die mit den dadurch erhaltenen filamentösen Phagen infiziert worden waren, wurde in einer Mega-Plasmidpräparation 2 mg cDNA-Bank-Plasmid isoliert.

2.3.10 Southernblots mit genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach der Methode von Dellaporte *et al.* (1983) aus Petersiliezellen isoliert und nach Restriktionsverdau in einem 0,7%igen Agarosegel (20 μ g/Spur) aufgetrennt. Das Gel wurde 15 min in 0,25 M HCl, 30 min in Denaturierungslösung (Tab. 5) und 2mal 15 min in Neutralisierungslösung (Tab. 5) inkubiert. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung von Saugpapier und 10xSSC (Tab. 5) auf Hybond-N-Memran (Amersham-Pharmacia Biotech) überführt und durch "UV-Crosslinking" (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Nach 2stündiger Prähybridisierung bei 42°C in Prähybridisierungslösung (Tab. 5) wurde die Membran in Hybridisierungslösung, die zusätzlich zu Prähybridisierungslösung eine Hitze-denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt, überführt und 16 h bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 2mal mit Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) (15 min, 42°C) und 2mal mit Waschlösung 2 (0,5xSSC, 0,1% SDS) (15 min, 68°C) gewaschen und schließlich autoradiographisch analysiert.

Tab. 5: Lösungen und Puffer für Southernblots

Denaturierungslösung:	0,5 M	NaOH
	1,5 M	NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M	Tris/HCl, pH 7,2
	1,5 M	NaCl
	1 mM	EDTA
Prähybridisierungslösung:	50 %	Formamid
	5x	SSPE
	5x	Denhardts-Lösung
	1%	SDS
	100 μ g/ml	Herings-DNA (Serva)
20xSSPE	200 mM	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	3 M	NaCl
	80 mM	EDTA
50xDenhardts-Lösung	10 g/l	Ficoll-400 (Pharmacia)
	10 g/l	Polyvinylpyrrolidon
	10 g/l	BSA (Serva)

2.3.11 Screening einer Petersilie- λ -ZAPTMII-cDNA-Bank

Für das Screening wurde eine gerichtete cDNA-Bank benutzt, die unter Verwendung des λ -ZAPTMII-Vectors und Poly(A)⁺-RNA von elicitorbehandelten (20 h) Petersiliezellen hergestellt worden war (W. Wirtz, 1994). Entsprechend einem Standardprotokoll wurden jeweils 5×10^5 pfu mit 0,6 ml Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue MRF' ausplattiert und nach 16stündiger Inkubation der Platten bei 37°C auf Nylonfilter (Porablot NYamp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Nach Denaturierung der DNA mit Denaturierungslösung wurden die Filter mit Neutralisierungslösung neutralisiert, mit 2xSSC gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde durch "UV-Crosslinking" (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Daraufhin wurden die Filter 2 h bei 42°C mit Prähybridisierungslösung (wie in 2.3.10 jedoch mit 25% Formamid) behandelt und für 16 h bei 42°C mit Hybridisierungslösung geschüttelt, die neben Prähybridisierungslösung (25% Formamid) eine Hitze-denaturierte, radioaktiv markierte DNA-Sonde enthielt. Anschließend wurden die Filter 2mal mit Waschlösung A (5xSSC, 0,1% SDS) und 2mal mit Waschlösung B (1xSSC, 0,1% SDS) gewaschen (jeweils 15 min bei 37°C) und autoradiographisch analysiert. Phagen im Bereich eines positiven Signals wurden in ein Gemisch aus 500 μ l SM-Puffer und 20 μ l Chloroform überführt. Nach einer zweiten Screening-Runde wurde das in den rekombinanten Phagen enthaltene pBluescript-SK-Plasmid durch *In-Vivo*-Excision (2.3.9) ausgeschnitten.

2.3.12 Bakterielle Expression von *MPK1*, 2, 3 und 4

Zur bakteriellen Expression von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden Vektoren der pGEX-Serie der Firma Pharmacia gewählt, die stromaufwärts des Polylinkers die Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) besitzen. Die Expressionsprodukte sind deshalb N-terminal mit GST fusioniert und lassen sich durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose-4B (Pharmacia) aufreinigen.

Die offenen Leserahmen von *MPK1*, 2, 3 und 4 wurden zur Einführung geeigneter Schnittstellen mittels PCR amplifiziert (Anhang 1) und in den pGEM-T-Vektor subkloniert. Von Einzelkolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Inserts mit korrekter DNA-Sequenz wurden in die Vektoren pGEX-5X-2 (*MPK1*) und pGEX-2T-2 (*MPK2*, 3 und 4) subkloniert. Positive Kolonien wurden durch Kolonienhybridisierung identifiziert und zur Gewinnung von Plasmid-DNA genutzt, die in der Folge durch Restriktionsanalyse untersucht wurde. Mit den so erhaltenen Plasmiden pGEX-M1, 2, 3, und 4 wurden *E. coli* BL21-Zellen transformiert.

Zur Proteinexpression wurden Übernachtskulturen der Bakterien 200fach in frischem LB-Medium (20% NaCl, 20% Pepton, 10% Hefeextrakt, 100 μ g/ml Ampicillin) verdünnt und unter starkem Schütteln (200 rpm) bei 30°C bis zu einer OD von 0,5-1 vermehrt. Zur Induktion der Proteinsynthese wurde 100 μ M IPTG zugegeben und anschließend weitere 3 h bei 30°C und starkem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4°C, 5000 rpm) und durch Resuspendieren in B-PERTM-Reagenz (Pierce, Rockford USA) und anschließender Inkubation für 15 min bei

25°C aufgeschlossen. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (15 min, 4°C, 15000 rpm) sedimentiert und der Überstand mit Glutathion-Sepharose-4B (0,1% v/v) versetzt und 3 h bei 4°C geschüttelt. Die Sepharose wurde durch Zentrifugation abgetrennt (2 min, 4°C, 2000 rpm) und durch Resuspendieren und anschließendes Zentrifugieren 5mal mit Waschpuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 0,1% Tween 20) und 2mal mit 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) gewaschen. Anschließend wurde durch 4 h Inkubation der Sepharose in Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM Glutathion (Sigma)) das rekombinante Protein eluiert. Die Abspaltung des GST-Anteils wurde durch 16 h Inkubation bei 4°C mit Thrombin (Sigma) (für MPK2. 3 und 4) oder Faktor X (Sigma) (für MPK1) durchgeführt. Dabei wurde jeweils 10 U Protease pro mg Fusionsprotein verwendet.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinproben wurde in einem Volumen von 100 µl nach der Methode von Bradford (1976) mit einem Fertigreagenz (Bio-Rad, München) bestimmt.

2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Minigelapparaturen "Mighty Small" der Firma Hoefer (San Francisco, USA) wurden 10- bis 15%ige Polyacrylamidgele benutzt, die nach dem Protokoll von Laemmli (1970) hergestellt wurden. Die verwendeten Proteinextrakte wurden mit einem Volumen 2xProbenpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8, 8% Glycerin, 8% SDS, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und 3 min auf 95°C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine bei 40 mA wurden die Gele mit "Coomassie Blue G-250"-Lösung gefärbt, für Westernblots verwendet oder autoradiographisch untersucht.

2.4.3 Westernblots

Nach SDS-PAGE wurden Proteine durch "Semi-Dry"-Transfer mit einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen) auf Nitrocellulosemembranen (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (Tab. 6) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm² Membran über 2 h. Nach Trocknen der Membran wurden die Proteine durch Inkubation in "Fast Green"-Lösung (Pierce) und anschließendes Spülen in Wasser gefärbt. Nach Entfärben in 0,2 M NaOH wurde die Membran 14 h bei 4°C in "Blocking"-Puffer (Tab. 6) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 2 h bei RT mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in "Blocking"-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 5mal 20 min mit TBST (Tab. 6) gewaschen und eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Boehringer, Mannheim) (8000fach verdünnt in "Blocking"-Puffer) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 4mal 20 min mit

TBST und einmal 10 min mit TBS (Tab. 6) gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL⁺-System von Amersham entsprechend den Herstellerangaben.

Tab. 6: Puffer für Westernblots

Transferpuffer:	50 mM	Tris
	40 mM	Glycin
	0,04%	SDS
	20%	Methanol
TBST:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	0,1%	Tween 20
TBS	wie TBST, jedoch ohne Tween	
“Blocking“-Puffer	TBST mit 5% fettfreier Trockenmilch (BioRad, München) oder 5% BSA (Serva)	

2.5 Antikörperproduktion

2.5.1 Peptidsynthese

Peptide wurden durch Festphasensynthese unter Verwendung von Fmoc-Aminosäurederivaten, PyBOP (Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden) und eines “Economy Peptide Synthesizer EPS 221“ der Firma ABIMED (Langenfeld) synthetisiert. Nach 16stündiger Abspaltung der Reaktionsprodukte vom Syntheseharz (90% Trifluoressigsäure, 5% H₂O, 5% Trisilan) wurden die Peptide durch Zugabe eines 10fachen Überschusses 80%igen tert.-Butylesters präzipitiert, in Wasser gelöst und lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde durch Reversed-Phase-HPLC mit einer Vydac C₄-Säule (22x250 mm; The Separations Group Hesperia, USA) auf einer HP1090-HPLC-Anlage (Hewlett-Packard, Böblingen) überprüft. Die Sequenz der Peptide wurde durch Peptidsequenzierung auf einem “Proteinsequencer G1000A“ (Hewlett Packard, Avondale, USA) bestimmt.

2.5.2 Gewinnung der Antiseren

Die für die Antikörperproduktion bestimmten Peptide wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) an KLH (“key limpet hemocyanin“ aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus*) gekoppelt und so für die Immunisierung von jeweils 2 Kaninchen pro Peptid verwendet. Dabei wurde ein Gemisch aus 500 µl Antigen- und 500 µl Adjuvantlösung intradermal an verschiedenen Stellen des Tiers injiziert. Die Injektionen wurden 14, 28 und 56 Tage nach der ersten Immunisierung wiederholt. Es wurde Blut vor der Immunisierung (2ml, Präimmenserum) und 38 (2 ml), 66 (22 ml) und 80 Tage (40 ml) nach der ersten Injektion entnommen.

2.6 In-Gel-MBP-Kinasenachweis

In einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel, das mit 0,3 mg/ml MBP (Myelin assoziiertes basisches Protein; Sigma) copolymerisiert worden war, wurden 15 µg Protein (2.3.4) pro Spur elektrophoretisch (40 mA) aufgetrennt (vgl. 2.4.2). Anschließend wurde das Gel zur Entfernung des SDS 4mal 20 min mit Puffer 1 (Tab. 7) gewaschen und dann 2mal 10 min in Puffer 2 (Tab. 7) äquilibriert. Daraufhin wurden die Proteine durch 1 h Schütteln in Denaturierungspuffer (Tab. 7) vollständig denaturiert und in der Folge durch 16 h Inkubation (4°C, ohne Schütteln) in Renaturierungspuffer (Tab. 7) renaturiert. Nach 10 min Äquilibration in Kinasepuffer (Tab. 7) wurde anschließend die In-Gel-Kinasereaktion durch 30 min Inkubation des Gels in Kinasepuffer mit 1 µCi/ml [γ - 32 P]ATP durchgeführt. Durch 5mal Waschen (30 min) mit Stoppuffer (Tab. 7) wurde die Reaktion abgestoppt und nicht inkorporierte Radioaktivität entfernt. Anschließend wurde das Gel getrocknet und mit autoradiographisch analysiert.

Tab. 7: Puffer für In-Gel-MBP-Kinasenachweis

Puffer 1:	50 mM 20%	Tris/HCl, pH 8 Isopropanol
Puffer 2:	50 mM 5 mM	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol
Denaturierungspuffer:	50 mM 5 mM 6 M	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol Guanidin/HCl
Renaturierungspuffer:	50 mM 5 mM 0,04%	Tris/HCl, pH 8 Mercaptoethanol Tween 40
Kinasepuffer:	40 mM 15 mM 2 mM 0,1 mM	HEPES, pH 7,5 MgCl ₂ DTT EGTA
Stoppuffer:	5% 1%	Trichloressigsäure Phosphorsäure

2.7 Immunpräzipitations-Kinasenachweis

Proteinextrakt (50 µg Protein) wurde mit 0,5 µl Antiserum versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden 40 µl einer 50%igen ProteinA-Sepharose CL4B-Suspension (Pharmacia) zugegeben und das Gemisch an einem Rotor inkubiert (4°C, 2 h). Die ProteinA-Sepharose CL4B-Suspension wurde aus lyophilisierter ProteinA-Sepharose CL4B hergestellt. Dazu wurde die gefriergetrocknete Matrix mit tridest-Wasser versetzt, 30 min gerührt, daraufhin unter Verwendung eines Glasfilters intensiv mit Wasser und anschließend mit Puffer A (Tab. 8) gewaschen und schließlich in einem Volumen Puffer A aufgenommen. Die an die Sepharose gebundenen Antikörper-Antigen-Komplexe

wurden durch Zentrifugation präzipitiert und nach Entfernen des Überstands 3mal mit Puffer B, einmal mit Puffer C und einmal mit Puffer D (alle Tab. 8) gewaschen. Anschließend wurde die Kinasereaktion durch 30 min Inkubation in Kinasepuffer A (Tab. 8) bei 28°C unter beständigem Schütteln durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 25 µl 2xProbenpuffer und 3 min Erhitzen abgestoppt. In einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel wurden die Reaktionsprodukte (10 µl) elektrophoretisch aufgetrennt und nach Trocknen des Gels autoradiographisch analysiert.

Tab. 8: Puffer für Immunpräzipitations-Kinasenachweise

Puffer A:	50 mM	Tris/HCl, pH 7,4
	250 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	5 mM	EGTA
	5 mM	NaF
	0,1%	Tween 20
Puffer B:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
Puffer C:	20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1%	Triton X-100
Puffer: D	20 mM	HEPES, pH 7,5
	15 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
	1 mM	DTT
Kinasepuffer A	20 mM	HEPES, pH 7,5
	15 mM	MgCl ₂
	5 mM	EGTA
	1 mM	DTT
	1 mg/ml	MBP
	10 µg/ml	Leupeptin
	10 µg/ml	Aprotenin
	50 µCi/ml	[γ- ³² P]ATP

2.8 Immunlokalisierung

Petersiliezellen wurden mit 4% Formaldehyd fixiert, in Polyethylenglycol eingebettet und in 2 µm dicke Präparate geschnitten (van Lammeren *et al.*, 1985). Diese wurden nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen (5% BSA in TBS) mit verdünntem primärem Antikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, Streptavidin-gekoppelter Peroxidase und Fluoresceintyramid-Reagenz ("Tyramid Signal amplification System", "TSA Green", Du Pont, Boston, USA). Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System

2.9.1 Hefestämme und Plasmide

Für die Arbeiten mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden der Hefestamm PJ69-4A (Tab. 9) und die aufgelisteten Plasmidvektoren (Tab. 10) verwendet.

Tab. 9: Eigenschaften des Hefestamms PJ69-4A

Hefestamm	Genotyp	Ref.
PJ69-4A	MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52his3-200, gal4Δ, gal80Δ, Gal2-Ade2, Lys2::GAL1-HIS3, met2::GAL7-lacZ	James <i>et al.</i> (1996)

Tab. 10: Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendete Plasmidvektoren

Plasmid ¹	Marker ²	Insert	Vektor.
pAD-Gal4	.LEU2, Amp ^r	-	-
pBD-Gal4cam	TRP1, Cam ^r	-	-
pBD-HA.M1	TRP1, Cam ^r	MPK1 aus Petersilie + HA-Epitop	pBD-Gal4cam
p53	TRP1, Amp ^r	p53 aus Maus	pBD-Gal4
pLamin C	TRP1, Amp ^r	humanes LaminC (aa 67-230)	pBD-Gal4
pSV40	LEU2, Amp ^r	SV40 großes T-Antigen	pAD-Gal4

¹ Weitere Angaben zu den Plasmiden finden sich für pAD-GAL4 und pBD-GAL4cam im Handbuch zum "HybriZap™ Two Hybrid Kit" (Stratagene), für p53 in Iwabuchi *et al.* (1993), für pLaminC in Bartel *et al.* (1993b) und für pSV40 in Chien *et al.* (1991).

² Selektion in *E. coli* erfolgte über das Ampicillin-Resistenzgen (Amp^r) oder das Chloramphenicol-Resistenzgen (Cam^r).

2.9.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen

Hefen wurden nach Standardvorschriften auf Platten oder in Flüssigkultur bei 30°C angezogen (Guthrie und Fink, 1991). Um Hefen unter selektierenden Bedingungen anzuziehen, wurden synthetische SD-Minimalmedien (Tab. 11) verwendet, ansonsten wurden die Hefen in YPAD-Medium (Tab. 11) vermehrt. Selektive SD-Medien für die Erhaltung von Plasmiden oder den Nachweis von Interaktionen der Hybridproteine wurden durch Weglassen der entsprechenden Aminosäuren (Tryptophan, Leucin oder Histidin) bzw Adenin aus der "Dropout"-Mischung hergestellt und nach Sterilisation bei 4°C gelagert. Zum Nachweis der β-Galactosidaseaktivität wurde X-Gal-Medium verwendet. Um Platten herzustellen, wurde vor dem Autoklavieren 2% Agar zugesetzt.

Tab. 11: Hefemedien

YPAD-Medium (pH 5,7)	2%	Pepton
	1%	Hefeextrakt
	2%	Glucose
	40 mg/l	Adeninsulphat
SD-Medium (pH 5,7):	2%	Glucose
	0,5%	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,17%	“Yeast Nitrogen Base“
	0,15%	entsprechende “dropout“-Mischung
X-Gal-Medium (pH 7):	2%	Glucose
	0,5%	(NH ₄) ₂ SO ₄
	0,17%	“Yeast Nitrogen Base“
	0,15%	“dropout“-Mischung (-Trp-Leu)
	0,1M	Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄
	40 mg/l	X-Gal
“dropout“-Mischung:	40 mg/l	Adeninsulphat
	20 mg/l	L-Arginin-HCl
	100 mg/l	L-Asparginsäure
	100 mg/l	L-Glutaminsäure
	20 mg/l	L-Histidin-HCl ^a
	30 mg/l	L-Isoleucin
	60 mg/l	L-Leucin ^b
	30 mg/l	L-Lysin-HCl
	20 mg/l	L-Methionin
	50 mg/l	L-Phenylalanin
	375 mg/l	L-Serin
	200 mg/l	L-Threonin
	40 mg/l	L-Tryptophan ^c
	30 mg/l	L-Tyrosin
	20 mg/l	Uracil
	150 mg/l	L-Valin

^a Adeninsulphat oder L-Histidin-HCl wurde weggelassen, um auf Interaktion der Hybridproteine zu selektieren.

^b L-Leucin wurde weggelassen, um auf pAD-Vektoren und den Kontrollvektor pSV40 zu selektieren

^c L-Tryptophan wurde weggelassen, um auf pBD-Vektoren und die Kontrollvektoren p53 und pLaminc zu selektieren

2.9.3 Herstellung des Plasmids pBD-HA.M1

Das HA-Epitop wurde als Sall/PstI Fragment in den Vektor pBD-GAL4cam mit Hilfe der phosphorylierten Oligonukleotide 2Ho1 (Sequenz: TCGACTATCCTTATGATG-TTCCGGATTATGCTCTGCA) und 2Ho2 (Sequenz: GAGCATAATCCGGAACATC-ATAAGGATAG) eingeführt. Das entstandene Plasmid wurde als pBD-HA bezeichnet. Der offene Leserahmen von MPK1 wurde durch PCR amplifiziert (Anhang 1), in pGEM-T subkloniert, sequenziert und anschließend als Sall-Fragment in pBD-HA kloniert.

2.9.4 Hefetransformation

Hefen wurden nach der Methode von Gietz und Woods (1993) transformiert. Dazu wurde eine Hefe-Übernachtskultur 40fach in YPAD-Medium verdünnt (5×10^6 Zellen/ml) und 4-6 h bei 30°C unter Schütteln (200 rpm) inkubiert. Die Zellen (50 ml) wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 5000 rpm), mit 25 ml Wasser gewaschen, zentrifugiert, in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und nochmals abzentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurden die Hefezellen in 0,4 ml Lithiumacetat aufgenommen und die resultierende Suspension auf 10 1,5 ml Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) verteilt. Nach Zentrifugation (30 s, 15000 rpm) und Entfernen des Überstands, wurden folgende Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zugegeben: 240 µl 50% (w/v) PEG (MW 3350, Sigma), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl Lachssperma-DNA (10 mg/ml) (Sigma), 50 µl Wasser + 0,3 µg Plasmid. Die Reaktionsgefäße wurden geschüttelt, bis die Zellen vollständig suspendiert waren, und in der Folge 30 min bei 30°C und anschließend 30 min bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen durch Zentrifugation sedimentiert (30 s, 15000 rpm), in 1 ml Wasser resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert (2-200 µl). Mit dieser Methode konnten Hefen auch mit 2 Plasmiden gleichzeitig transformiert werden.

2.9.5 Screening mit MPK1

Für das Screening wurden Hefen, die bereits das pBD-HA.M1-Plasmid enthielten, nach einem leicht abgeänderten Protokoll transformiert. Die Zellen aus 50 ml Kultur, die wie oben behandelt worden waren, wurden in einem 15 ml Röhrchen (Falcon) mit der 10fachen Menge der oben angegebenen Lösungen und 5 µg Plasmid transformiert. Der Hitzeschock wurde auf 40 min ausgedehnt und die transformierten Zellen am Ende in 10 ml Wasser aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf eine Platte (Durchmesser 13,5 cm) mit SD-His-Medium (-His; -Leu; -Trp) ausplattiert und 3-7 Tage bei 30°C inkubiert.

Kolonien, die in dieser Zeit wuchsen, wurden auf SD-His-, SD-Ade- (-Ade; -Leu; -Trp) und X-Gal-Medium ausplattiert. Aus Kolonien, die auf den beiden Selektionsmedien wuchsen und blaue Farbe auf den X-Gal-Platten zeigten, wurde Plasmid-DNA isoliert, die zur Vermehrung in *E. coli*-DH5α transformiert wurde. Diese Plasmide wurden in PJ69-4A-Hefen retransformiert, die bereits das pBD-HA.M1-, das pLamin C- (Bartel *et al.*, 1993b) oder das p53-Plasmid (Iwabuchi *et al.*, 1993) enthielten. Die Transformanden wurden mit Hilfe des SD-His-, SD-Ade- und X-Gal-Mediums auf Reporterexpression untersucht. Lediglich diejenigen cDNA-Klone wurden als positiv betrachtet, die in dieser Selektionsrunde in Kombination mit pBD-HA.M1 Reporterexpression induzierten, nicht aber in Kombination mit p53 oder pLamin C.

2.9.6 Plasmidpräparation aus Hefe

SD-Flüssigmedium (3 ml) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 2 Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (30 s; 15000 rpm), in 0,2 ml Hefe-Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS) resuspendiert und mit 0,2 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) und 0,3 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser; Sigma) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension 2 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 15000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol vermischt und zentrifugiert (10 min, 15000 rpm). Der entstandene Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in 50 µl TE-Puffer (2.2.5) aufgenommen und für die Transformation kompetenter *E. coli*-DH5α verwendet.

2.9.7 Proteinextraktion aus Hefe

Hefezellen wurden in SD-Flüssigmedium (50 ml) bis zu einer OD von 1,5 angezogen, abzentrifugiert (5 min, 5000 rpm) und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach Zugabe von 50 µl Puffer P (100 mM Tris/HCl pH 6,8, 10% Glycerol, 5% Mercaptoethanol, 3% SDS) und 0,3 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser; Sigma) wurde 2 min geschüttelt. Anschließend wurden 0,4 ml Puffer P zugegeben und die Suspension wurde 3 min auf 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 rpm) wurde der Überstand abgenommen und für SDS-PAGE und Westernblots verwendet.

2.10 Analyse der Reportergenexpression im Protoplastensystem

2.10.1 Proteinextraktion

Der Protoplastenniederschlag (2.2.5) wurde mit 200 µl LUC-Extraktionspuffer (100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,5, 1 mM DTT) versetzt und 30 s geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 min, 15000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und für die Bestimmung der Reporterenzymaktivität benutzt.

2.10.2 Bestimmung der LUC-Aktivität

Zur Bestimmung der LUC-Aktivität (Luciferase) wurden bei Raumtemperatur 10 µl des Protoplastenextrakts mit 100 µl LUC-Substratpuffer (20 mM Tricine pH 7,8, 2,5 mM MgSO₄, 1 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂·5H₂O, 0,1 mM EDTA, 30 mM DDT, 300 µM Coenzym-A, 500 µM ATP, 500 µM Luciferin) (Hartmann *et al.*, 1998) versetzt und die resultierende Lumineszenz mit einem "Luminoscan Ascent" (Labsystems, Helsinki, Finnland) über jeweils 5 s bestimmt.

2.10.3 Bestimmung der GUS-Aktivität

Zur Bestimmung der GUS-Aktivität (β -Glucuronidase) wurden 50 μ l des Protoplastenextrakts mit 50 μ l GUS-Substratpuffer (50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7, 10 mM Mercaptoethanol, 2 mM 4-MUG, 0,1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) versetzt und bei 37°C inkubiert. Nach 1 h und nach 3 h wurden 20 μ l des Reaktionsgemischs zu 150 μ l 0,4 M $\text{Na}(\text{CO}_3)_2$ gegeben und die Fluoreszenz bestimmt (360 nm Excitation /440 nm Emission) (Cytofluor II, Biosearch, Bedford, USA).

2.10.4 Errechnung der normierten GUS-Aktivität

Zur Bestimmung der normierten GUS-Aktivität wurde die Differenz des 1 h- und des 3 h-Fluoreszenzmesswerts gebildet und dieser Wert durch die Luciferaseaktivität (relative Einheiten) geteilt. Aus den parallelen Proben wurde der Mittelwert und die Standardabweichung errechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Petersiliezellen

3.1.1 Nachweis elicitorresponsiver Proteinkinasen mittels In-Gel-MBP-Kinaseversuchen

In-Gel-Kinaseversuche ermöglichen den Nachweis aktiver Proteinkinasen. Dazu werden zelluläre Proteine elektrophoretisch in Polyacrylamidgelen aufgetrennt, in die ein Proteinkinasesubstrat einpolymerisiert ist. Nach Renaturierung der Proteine wird durch Inkubation des Gels mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ eine Kinasereaktion im Gel durchgeführt. Entsprechend dem gewählten Substrat lassen sich so unterschiedliche Proteinkinasen nachweisen.

Während sich durch In-Gel-Kinaseexperimente mit Kasein und Histon keine elicitorresponsiven Proteinkinasen in Petersilieextrakt nachweisen ließen (T. Nürnberger, persönliche Mitteilung), zeigten In-Gel-Kinaseversuche mit Myelin-assoziiertem Protein (MBP) die schnelle und transiente Aktivierung von drei Proteinkinasen durch Elicitierung (Abb. 1). Bereits 3 min nach Pep25-Zugabe waren starke MBP-Kinaseaktivitäten nachweisbar, die in den unbehandelten oder mit Wasser behandelten Zellen (nicht gezeigt) nicht detektiert wurden. Das Maximum der Aktivität wurde nach 5-10 min gefunden, und bis zu 4 h nach Elicitierung war zumindest die größte der Kinasen detektierbar. Damit gehört die MBP-Kinaseaktivierung zu den schnellsten bisher gefundenen Reaktionen der Petersiliezellen auf Elicitierung. Die größte der 3 Kinasen besaß eine apparente Masse von 46 kDa und gab das stärkste und langanhaltendste Signal. Die beiden anderen MBP-Kinasen erschienen bei 44 bzw. 40 kDa und wurden weniger und deutlich transienter aktiviert.

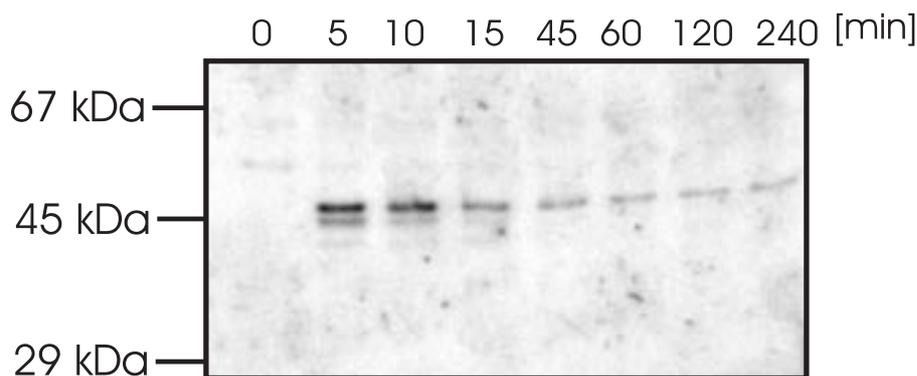


Abb. 1: Nachweis elicitorresponsiver Kinasen durch In-Gel-MBP-Kinaseversuche.

Zellsuspensionskulturen der Petersilie wurden mit 50 ng/ml Pep25 versetzt und zu den angegebenen Zeiten nach Behandlungsbeginn geerntet. Daraus hergestellter Proteinextrakt (15 μg Protein/Spur) wurde mittels SDS-Gelelektrophorese in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt, das 0,3 mg/ml MBP-Substratprotein enthielt. Nach Renaturierung der Proteine wurde das Gel 30 min in einem Kinasepuffer inkubiert, der $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (1 $\mu\text{Ci/ml}$) enthielt, von nicht inkorporierter Radioaktivität befreit, getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert.

3.1.2 Identifizierung der elicitorresponsiven Kinasen als MAPKs

Die Spezifität des In-Gel-Kinasenachweises mit MBP und die Größe der elicitorresponsiven Kinasen ließen die Vermutung zu, daß es sich bei diesen um MAPKs handelt. MAPKs sind eine Klasse von S/T-Proteinkinasen, die in allen eukaryotischen Organismen vorkommen und an der intrazellulären Vermittlung einer Vielzahl von Signalen beteiligt sind (Lewis *et al.*, 1998; Cobb, 1999). Die Aktivierung der MAPKs erfolgt durch Phosphorylierung eines konservierten Threonins und Tyrosins auf der sogenannten Aktivierungsschleife in der Nähe der Proteinkinasedomäne VIII (Payne *et al.*, 1991) durch eine bispezifische Proteinkinase, die sogenannte MAPK-Kinase (MKK) (Cobb und Goldsmith, 1995). Die MKKs werden ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert; die Kinasen, die diese Reaktion katalysieren, werden als MAPK-Kinase-Kinasen bezeichnet (MKKKs) (Marshall, 1994). Das regulatorische Threonin und Tyrosin der MAPKs wird lediglich durch eine einzige Aminosäure getrennt; in den klassischen MAPKs durch ein Glutamat. Auf dieser Grundlage wurde von der Firma Promega ein polyklonaler Antikörper gegen das zweifach phosphorylierte TEY-Peptid entwickelt, der die immunologische Detektion aktivierter MAPKs erlaubt.

Um die Identität der elicitorresponsiven MBP-Kinasen zu ermitteln, wurden die bereits für die In-Gel-Experimente verwendeten Extrakte nach Auftrennung mittels SDS-PAGE auf Nitrocellulose transferiert und mit den oben genannten anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern analysiert. Wie aus Abb. 2 zu ersehen ist, wurden auf den Westernblots alle 3 im In-Gel-Versuch nachweisbaren elicitorresponsiven Kinasen durch den Antikörper erkannt. Während für die 46- und die 44-kDa-Kinase in den In-Gel-Versuchen und den Westernblots die gleiche Stärke der Banden und ein identisches Aktivierungsprofil gefunden wurde, ist die 40-kDa-Bande im Westernblot viel stärker und die Aktivierung länger anhaltend als im In-Gel-Kinaseversuch.

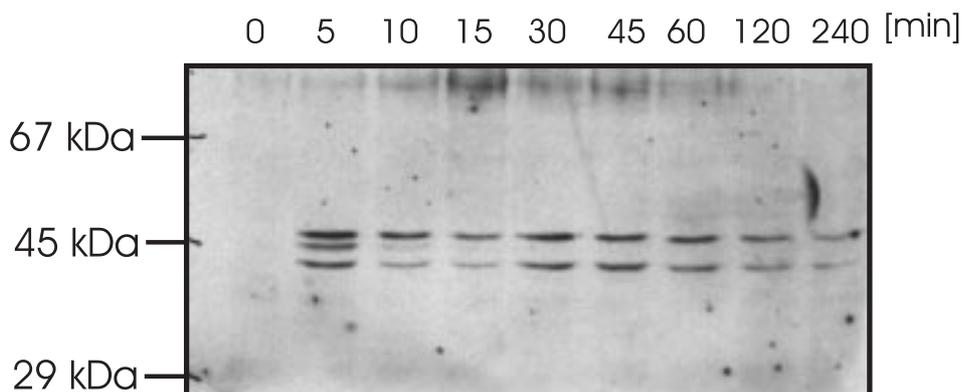


Abb. 2: Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern. Proteinextrakte elicitorbehandelter Zellen (15 µg Protein/Spur) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf Nitrocellulose übertragen. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit TBST/5% BSA wurde die Membran mit 15000fach verdünnten anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern inkubiert, gewaschen, mit Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörper inkubiert und gewaschen. Die Detektion kreuzreagierender Proteine erfolgte mit dem ECL⁺-System (Enhanced-Chemoluminescence/Amersham) und Röntgenfilmen.

3.1.3 Immunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Medicago MAPKs

Aus Arbeiten über MAPKs in Tabak, *Medicago sativa* und *Arabidopsis thaliana* war bekannt, daß die MAPKs in Pflanzen eine Genfamilie bilden (Mizoguchi *et al.*, 1993; Jonak *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1995; Jonak *et al.*, 1995). Unter Verwendung von drei unterschiedlichen polyklonalen Antiseren wurden deshalb gekoppelte Immunpräzipitations-Kinaseexperimente durchgeführt, um festzustellen, ob die elicitorresponsiven MAPKs einer der bekannten Klassen von Pflanzen-MAPKs angehören. Die Seren wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit synthetischen Peptiden, die die 10 C-terminalen Aminosäuren der Medicago MAPKs MMK2 (Jonak *et al.*, 1995), MMK3 (Bögre *et al.*, 1999) bzw. MMK4 (1996) enthielten, hergestellt. Das M11 Serum erkennt spezifisch MMK2, das M14 Serum erkennt spezifisch MMK3, das M7 Serum erkennt aufgrund der hohen Sequenzhomologie im C-Terminus sowohl MMK1 als auch MMK4.

Abb. 3 zeigt, daß lediglich mit dem M7-Serum, nicht jedoch mit den Seren M11 und M14 eine elicitorresponsive MBP-Kinaseaktivität präzipitiert wurde. Die Induktion dieser Kinaseaktivität war ebenso wie die in den In-Gel-Versuchen detektierte Aktivität transient und das Aktivitätsmaximum wurde auch hier 5-10 min nach Elicitorzugabe erreicht.

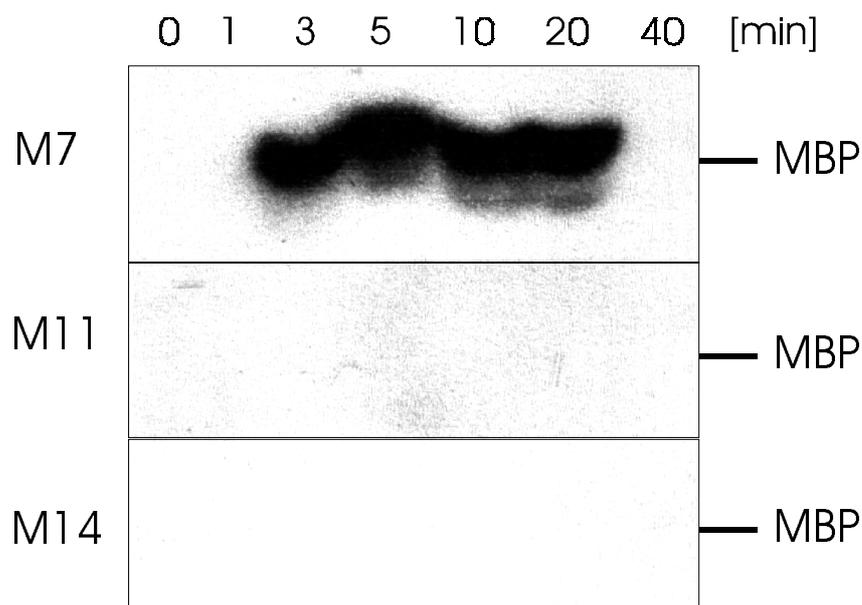


Abb. 3: Immunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Medicago MAPKs.

Proteinextrakte (100 µg) aus Petersiliezellen, die für die angegebenen Zeiträume mit Pep25 (100 ng/ml) behandelt worden waren, wurden mit 0,5 µl M7-, M11- und M14-Antiserum versetzt. Nach Präzipitation der Antikörper-Antigenkomplexe mit Protein-A-Sepharose, wurde das Präzipitat intensiv gewaschen und anschließend in einem Kinasepuffer mit [γ - 32 P]ATP und MBP inkubiert. Die Produkte der *In-Vitro*-Reaktion wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

3.1.4 Westernblot-Analyse von Petersilieproteinen mit M7-Antiserum

Um eine Korrelation zwischen den im In-Gel- und im Westernblotversuch detektierten elicitorresponsiven MAPKs und der präzipitierten Kinaseaktivität zu erreichen, wurde ein Westernblot, der bereits mit dem anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörper inkubiert worden war, von Antikörpern befreit und mit dem M7-Antiserum behandelt. Abb. 4 zeigt, daß der M7-Antikörper lediglich mit einem einzigen, 46-kDa-großen Protein interagiert. Beim Übereinanderlegen der entsprechenden Röntgenfilme wurde deutlich, daß dieses Protein exakt die gleiche Größe wie die elicitorresponsive 46-kDa-Kinase aufweist. Die Menge der elicitorresponsiven 46-kDa-Kinase blieb bis zu 4 h nach Elicitierung konstant.

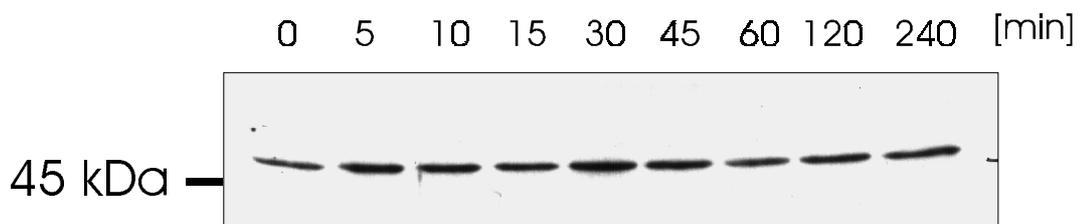


Abb. 4: Westernblot-Analyse der Proteine elicitierter Petersiliezellen mit dem M7-Antiserum. Westernblots, die unter Verwendung von Proteinextrakten Pep25-behandelter Petersiliezellen hergestellt worden waren, wurden mit 8000fach verdünntem M7-Serum und Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper inkubiert. Kreuzreagierende Proteine wurden durch ECL⁺ und Röntgenfilme sichtbar gemacht.

3.2 Signalspezifität der MAPK-Aktivierung

Das Pep13-Elicitorpeptid oder Peptide, die dieses enthalten, wie z. B. Pep25, binden an einen hochaffinen Plasmamembranrezeptor Motiv und aktivieren auf diesem Weg die Abwehrreaktionen der Petersiliezellen (Nürnberger *et al.*, 1994; Hahlbrock *et al.*, 1995). Durch Analoga des Pep13-Peptids, in denen einzelne Aminosäuren durch Alanin ausgetauscht worden waren, konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, daß Veränderungen des Pep13-Motivs, die die Bindungsaffinität zum Rezeptor vermindern, in gleichem Maße die Elicitoraktivität reduzieren (Nürnberger *et al.*, 1994).

Mit Hilfe dieser Peptide wurde untersucht, ob die Aktivierung der MAPKs durch den Pep25-Elicitor ebenfalls ein rezeptorvermittelter Prozeß ist und den gleichen Kriterien gehorcht wie die anderen Elicitorantworten. Dazu wurde nach Behandlung der Zellen mit Pep13, Pep13-A12 (einem aktiven Analog), Pep13-A2 und Pep13-A5 (zwei inaktiven Analoga) in In-Gel- und Immunpräzipitationsversuchen der Aktivierungszustand der MAPKs bestimmt. Dabei zeigte sich, daß lediglich Pep13 und Pep13-A12, die eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzen und in niedrigen Konzentrationen als Elicitor wirken, die MAPKs aktivieren (Abb. 5). Dahingegen waren Pep13-A2 und Pep13-A5 inaktiv.

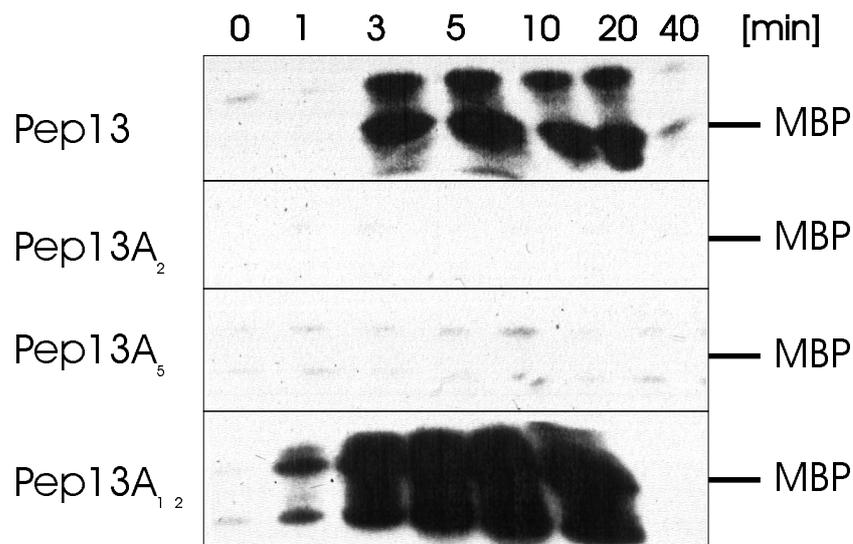


Abb. 5: Aktivierungszustand der MAPKs nach Behandlung mit aktiven und inaktiven Pep13-Analoga. Proteinextrakte (100 µg) von Petersiliezzellen, die für die angegebenen Zeiträume mit Pep13, dem aktiven Pep13-Analog Pep13-A12 oder den inaktiven Pep13-Analoga Pep13-A2 und Pep13-A5 behandelt worden waren (alle 50 nM), wurden in Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten (wie in Abb. 3 beschrieben) mit dem M7-Serum untersucht.

3.3 Einordnung der MAPKs in die Elicitorsignaltransduktionskette

Inhibitor- und Effektorexperimente haben gezeigt, daß die schnellsten messbaren Reaktionen der Petersiliezzellen nach Eliciterung, der Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, die Alkalinisierung des Mediums und der Anstieg der extrazellulären K^+ - und Cl^- -Konzentration notwendig und hinreichend für die Induktion der darauffolgenden Elicitorantworten sind (Jabs *et al.*, 1997). Der nachgeschaltete "oxidative burst" ist ebenfalls an der Auslösung zahlreicher, aber nicht aller Elicitorantworten beteiligt (Jabs *et al.*, 1997; T. Eulgem, persönliche Mitteilung).

3.3.1 Einfluß des Ionenkanalinhibitors A9C auf die MAPK-Aktivierung

Eine Reihe von Ca^{2+} - und Anionenkanalinhibitoren blockiert die elicitorresponsiven Ionenflüsse und alle nachgeschalteten Reaktionen der Petersiliezzellen, wie z. B. den "oxidative burst" und die Phytoalexinsynthese (Jabs, 1994; Jabs *et al.*, 1997). Aus diesen Inhibitoren wurde der Anionenkanalinhibitor A9C (Anthracen-9-carbonsäure) ausgewählt, um die Bedeutung der Ionenflüsse bei der Aktivierung der MAPKs zu untersuchen. In In-Gel-Versuchen und gekoppelten Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten wurde gefunden, daß A9C die Aktivierung der MAPKs vollständig blockiert (Abb. 6).

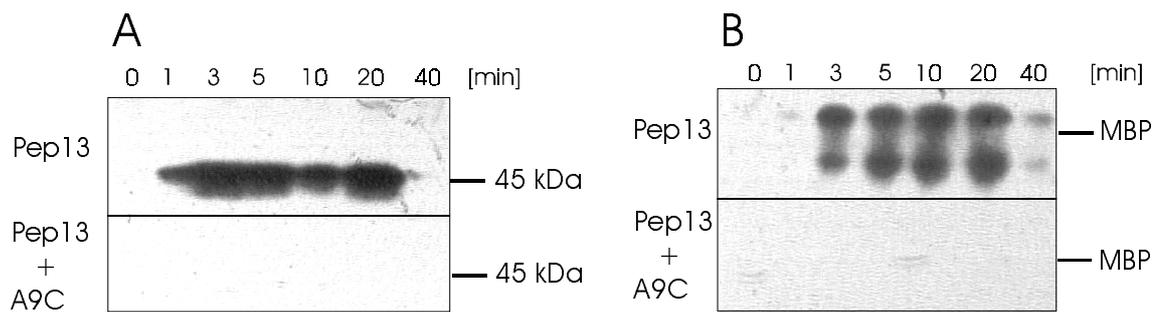


Abb. 6: Inhibition der MAPK-Aktivierung durch A9C.

Petersiliezellen wurden 30 min mit 100 μ M A9C vorinkubiert und dann für die angegebenen Zeiträume mit Pep25-Elicitor (50 ng/ml) behandelt. Ein Proteinextrakt, der aus diesen Zellen und nicht inhibitorbehandelten Zellen gewonnen wurde, wurde in In-Gel-MBP-Kinaseexperimenten (A) und Immunpräzipitations-Kinaseversuchen mit M7-Antiserum (B) auf Aktivierung der MAPKs untersucht.

3.3.2 Einfluß des Polyantibiotikums Amphotericin B auf die MAPK-Aktivität

Das Polyantibiotikum Amphotericin B bildet aufgrund seiner chemischen Struktur Poren in Membranen und macht diese dadurch für Ionen permeabel. Behandelt man Petersiliezellen mit dieser Substanz, so löst dies ein Spektrum von Ionenflüssen aus, das dem nach Elicitierung beobachteten gleicht und zur Auslösung der Abwehrantworten führt (Jabs, 1994; Jabs *et al.*, 1997). Deshalb wurde der Aktivierungszustand der MAPKs in Amphotericin-B-behandelten Zellen untersucht. Dabei zeigte sich, daß auch die elicitorresponsiven MAPKs durch Zugabe von Amphotericin B zum Kulturmedium aktiviert werden (Abb. 7). Die Aktivierung war transient und erfolgte ebenso wie die anderen Reaktionen im Vergleich zur Elicitorantwort zeitlich verzögert.

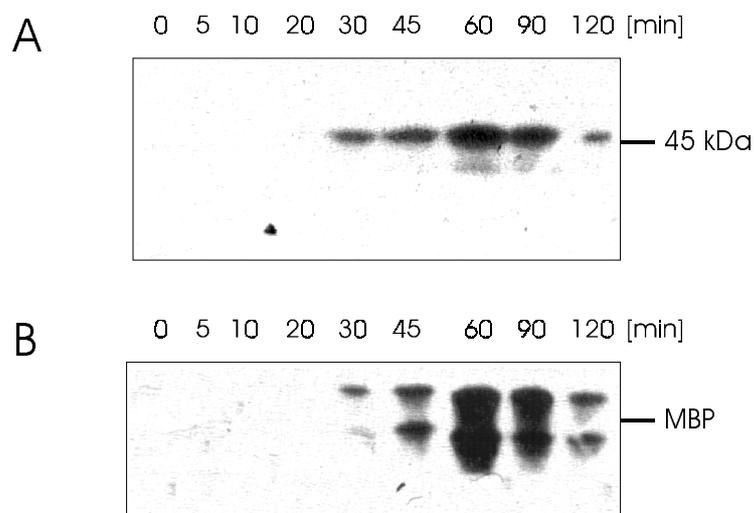


Abb. 7: Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs durch Amphotericin B.

Petersiliezellen wurden mit 50 μ M Amphotericin B versetzt und zu den angegebenen Zeiten nach Beginn der Behandlung geerntet. Proteinextrakte dieser Zellen wurden in In-Gel-MBP-Kinaseexperimenten (A) und Immunpräzipitations-Kinaseversuchen mit M7-Antiserum (B) auf Aktivierung der MAPKs untersucht.

3.3.3 Einfluß des NADPH-Oxidaseinhibitors DPI auf die MAPK-Aktivierung

Der NADPH-Oxidaseinhibitor DPI blockiert die schnelle Produktion von ROS nach Elicitierung und dadurch einen Großteil der folgenden Elicitorantworten (Jabs *et al.*, 1997). Um die Rolle des "oxidative burst" bei der MAPK-Aktivierung zu untersuchen, wurde deshalb der Aktivierungszustand der MAPKs in Zellen bestimmt, die vor Beginn der Elicitorbehandlung mit DPI vorinkubiert worden waren. Weder in In-Gel-Versuchen, noch in Westernblots oder Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten wurde ein signifikanter Unterschied in der Elicitoraktivierung der MAPKs zwischen den inhibitorbehandelten und den nicht inhibitorbehandelten Zellen gefunden (Abb. 8).

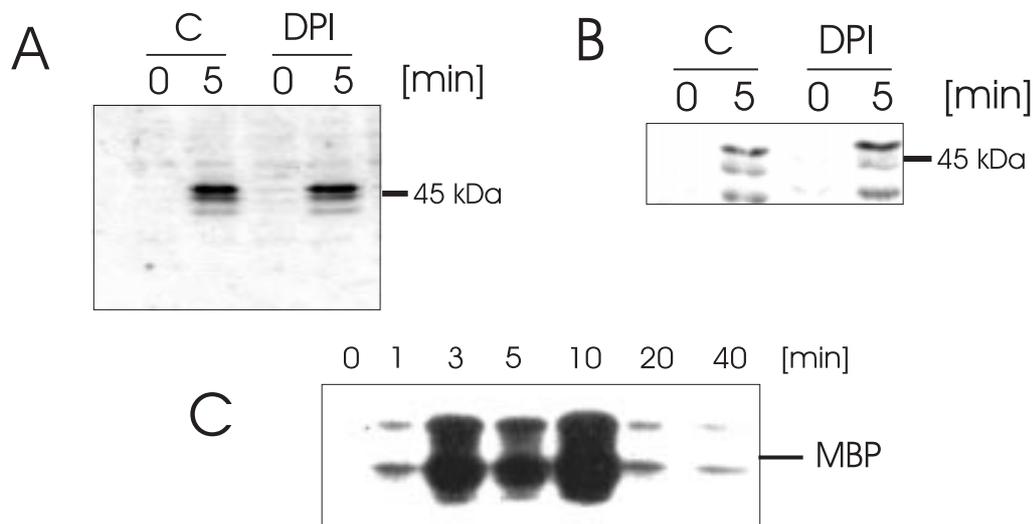


Abb. 8: Einfluß von DPI auf die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs.

Petersiliezellen wurden 30 min mit 50 μ M DPI vorinkubiert und dann für die angegebenen Zeiträume mit Pep25-Elicitor (50 ng/ml) behandelt. Proteinextrakte, die aus diesen Zellen und nicht inhibitorbehandelten Zellen gewonnen wurden, wurden in In-Gel-MBP-Kinaseexperimenten (A), in Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern (B) und in Immunpräzipitations-Kinaseversuchen mit M7-Antiserum (C) auf Aktivierung der MAPKs untersucht.

3.3.4 Immunlokalisierung der elicitorresponsiven MAPK mit M7-Antiserum

Ein zentraler Regulationsmechanismus eukaryotischer Signaltransduktionskomponenten ist neben der Kontrolle ihrer enzymatischen Aktivität durch posttranslationale Modifikationen ihre subzelluläre Lokalisierung. So ist aus Untersuchungen in Säugerzellkulturen bekannt, daß die Signalweiterleitung durch MAPKs neben der Aktivierung durch zweifache Phosphorylierung die Relokalisierung der aktivierten Kinasen in den Kern erfordert (Brunet *et al.*, 1998; Robinson *et al.*, 1998). Aus diesem Grund wurden unter Verwendung des M7-Serums Immunlokalisierungsstudien mit elicitorbehandelten und nicht elicitorbehandelten Petersiliezellen durchgeführt. Während in unbehandelten Petersiliezellen keine Immunfluoreszenz nachweisbar war, waren die

Kerne von Zellen, die für 5 min mit Pep25 behandelt worden waren, durchgängig markiert (Abb. 9). In Zellen, die für 60 min mit Pep25 behandelt worden waren, waren dahingegen nur noch einzelne Kerne angefärbt; in der Mehrzahl dieser Zellen war keine Immunfluoreszenz mehr detektierbar (nicht gezeigt). Die Kernlokalisierung der 46-kDa-Kinase spiegelt also ihr Aktivierungsprofil wieder (vgl. 3.1.1-3).

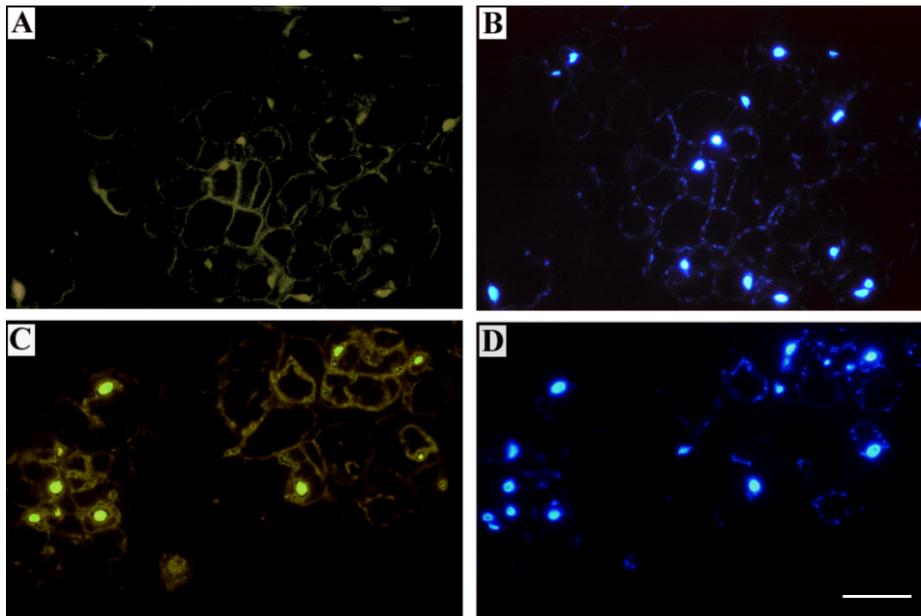


Abb 9: Immunlokalisierung der elicitorresponsiven 46-kDa-MAPK mit Hilfe des M7-Antiserums. Petersiliezellen, die nicht (A und B) oder für 5 min (C und D) mit Pep25 behandelt worden waren, wurden in Formaldehyd fixiert, in Polyethylenglycol eingebettet und in 2 μ m dicke Präparate geschnitten. Diese wurden mit 10000fach verdünntem M7-Antiserum inkubiert, und anschließend wurden die gebundenen primären Antikörper durch biotinylierte sekundäre Antikörper, Streptavidin-gekoppelte Peroxidase und Fluoresceintyramid-Reagenz sichtbar gemacht (A und C). Um die Kerne anzufärben (B und D), wurde DAPI verwendet.

3.3.5 Einfluß von Inhibitoren der MAPK-Kaskade auf die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs und die Phytoalexinproduktion

Die Mehrzahl der Proteinkinaseinhibitoren wirkt auf mehrere Klassen von Proteinkinasen und ist deshalb unspezifisch. Darüber hinaus ist in der Regel vollkommen unbekannt, welche pflanzlichen Proteinkinasen durch welche Inhibitoren in welchem Ausmaß inhibiert werden, da sowohl *In-Vitro*- als auch *In-Vivo*-Daten fehlen. Für die ERK1- und ERK2-Kinasekaskade (extracellular regulated MAPK) in Säugern wurden in den letzten Jahren zwei sehr spezifische Inhibitoren entwickelt. PD 098059 (Alessi *et al.*, 1995) und UO 126 (Favata *et al.*, 1998) inhibieren wirkungsvoll die MKKs MEK1 und MEK2 (MAPK- oder ERK-Kinase), die ERK1 und 2 aktivieren (Cano und Mahadevan, 1995). Die Aktivität anderer Proteinkinasen, insbesondere auch anderer MKKs wird jedoch

nicht beeinflusst. SB 203580 ist dahingegen ein spezifischer Inhibitor der stressresponsiven p38-MAPKs (Tan *et al.*, 1996).

Die drei Inhibitoren wurden in verschiedenen Konzentrationen in Petersiliezellkulturen auf ihre Inhibitorwirkung getestet. Dazu wurden Zellen 30 min mit verschiedenen Konzentrationen (1-200 μM) der Substanzen vorinkubiert, dann mit Elicitor versetzt und anschließend entweder 24 h inkubiert, um die Vitalität der Zellen und die Phytoalexinproduktion zu bestimmen, oder aber nach 8 min geerntet, um in In-Gel- und Immunpräzipitationsversuchen den Einfluß auf die MAPK-Aktivierung zu bestimmen. Dabei zeigte sich, daß weder die MAPK-Aktivierung noch die Phytoalexinproduktion durch die Inhibitoren signifikant beeinflusst wurde (nicht gezeigt).

3.4 Klonierung und Charakterisierung 5 verschiedener Petersilie-MAPK-cDNAs

Eine weitergehende Untersuchung der Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktionskette und die Identifizierung möglicher Regulatoren und Substrate erforderten die Klonierung der drei elicitorresponsiven Petersilie-MAPK-cDNAs. Während die Kreuzreaktion des M7-Serums mit der 46-kDa-Kinase eine Zuordnung dieser MAPK zur Gruppe der MMK1- oder der MMK4-Kinasen erlaubte, war über die 44-kDa- und die 40-kDa-Kinase nichts bekannt. Deshalb sollte in einem ersten Ansatz eine möglichst große Anzahl unterschiedlicher Petersilie-MAPKs kloniert werden, darunter vor allem *MMK1* und *MMK4*-Homologe, und anschließend durch immunologische Studien ihre Beteiligung an der Elicitorsignaltransduktion bestimmt werden.

3.4.1 Screenen einer Petersilie-cDNA-Bank mit einer *MMK1*- und einer *MMK4*-Sonde

Aufgrund der hohen Homologie der MAPKs unterschiedlicher Pflanzenspezies, und um gezielt die *MMK1*- und *MMK4*-Homologen zu klonieren, wurden radioaktiv markierte DNA-Proben verwendet, die die offenen Leserahmen der *MMK1*- und *MMK4*-cDNAs repräsentieren. Damit wurde eine $\lambda\text{ZAP}^{\text{TM}}$ II-cDNA-Bank durchsucht, die mit poly(A)⁺-RNA von elicitorbehandelten Petersiliezellen gewonnen worden war (Wirtz, 1994).

Um die Eignung der Proben zu testen und optimale Hybridisierungsbedingungen zu ermitteln, wurden in Pilotexperimenten Southernblots genomischer Petersilie-DNA unter verschiedenen Stringenzbedingungen mit den heterologen Sonden hybridisiert. Bei wenig stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen war ein komplexes Muster mit zahlreichen einzelnen Banden sichtbar (nicht gezeigt). Diese Bedingungen versprachen die Isolierung einer größtmöglichen Anzahl verschiedener MAPK-cDNA-Klone.

Mit jeder Probe wurden jeweils 6×10^5 Plaques analysiert. Nach zwei Plattierungsrunden verblieben 18 Phagen aus der Analyse mit *MMK1* und ein Phage aus der Analyse mit

MMK4, die mit der jeweiligen Sonde hybridisierten. Die Phagen wurden mit Hilfe von Helferphagen "EXAssistTM" durch *In-Vivo*-Excision in pBluescript-SK-Plasmide überführt. Alle Plasmidvektoren wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen und vom 3'- und 5'-Ende mit den Primern T3 und T7 ansequenziert. Durch Vergleich der Restriktionsmuster und der DNA-Sequenzen in kodierenden und nicht kodierenden Bereichen zeigte sich, daß 8 unterschiedliche Klone isoliert worden waren, die sich 5 unterschiedlichen MAPK-cDNA-Sequenzen zuordnen ließen. Diese unterschiedlichen Petersilie-MAPK-cDNAs (*MPKs*) wurden von 1 bis 5 durchnummeriert (Tab. 12). *MPK1* wird in anderen Publikationen als *ERM1* bezeichnet (Ligterink *et al.*, 1997), doch diese Bezeichnung wurde in der vorliegenden Arbeit aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mehr verwendet.

Tab. 12: Charakterisierung der 5 Petersilie-MAPK-Klone

Bezeichnung	Untergruppe ¹	Länge der cDNA ²	Größe des Proteins	Bemerkungen
<i>MPK1</i>	3	1565 bp	371 Aminosäuren 42,7 kDa	Gesamtlängenklon
<i>MPK2</i>	3	1623 bp	370 Aminosäuren 42,8 kDa	Gesamtlängenklon
<i>MPK3</i>	2	1411 bp	387 Aminosäuren 44,3 kDa	Gesamtlängenklon
<i>MPK4</i>	4	1736 bp	374 Aminosäuren 43,0 kDa	Gesamtlängenklon
<i>MPK5</i>	4	1016 bp	250 Aminosäuren	unvollständige Klone

¹ Angabe der Untergruppe entsprechend Einordnung in Abb. 10 B

² Länge des längsten isolierten cDNA-Klons

3.4.2 Analyse der Sequenzen der MAPK-cDNAs

Pro MAPK wurde mindestens jeweils der längste cDNA-Klon in beide Richtungen vollständig durchsequenziert (Sequenzen im Anhang). Dabei zeigte sich, daß von 4 Kinasen Gesamtlängenkclone vorlagen. Lediglich bei *MPK5* fehlen wahrscheinlich ca. 500 Basen vom 5'-Ende des kodierenden offenen Leserahmens.

Sequenzvergleiche auf der Ebene der Nukleotidsequenzen und der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigten zwischen den Kinasen eine große Homologie über die gesamten kodierenden Bereiche (Abb. 10 A), wobei sich die 5 Kinasen in 3 Untergruppen einordnen ließen. Diese Einordnung wurde auch bei einem Vergleich mit MAPKs aus anderen Pflanzen auf der Ebene der Aminosäuresequenzen gefunden (Abb. 10 B). *MPK1* und *MPK2* sind hoch homolog zueinander (84% identische Nucleotide und 85% identische Aminosäuren) und fallen in eine Gruppe mit *Medicago-MMK4*, *Arabidopsis-MPK3* und *Tabak-WIPK*. *MPK3* ist der einzige Petersilienklon, der sich der Gruppe von *Medicago-MMK1*, *Arabidopsis-MPK6* und *Tabak-SIPK* und *-NTF4* zuordnen läßt. *MPK4* und *MPK5* sind wiederum hoch homolog zueinander (91% identische Nucleotide und 86% identische Aminosäuren) und haben das Tabakhomologe

NTF6, das Medikago-homologe *MMK2* und die Arabidopsis-homologen *MPK4* und *5*. Aus der vierten bekannten Gruppe von pflanzlichen MAPKs wurden in dem Screeningansatz keine entsprechenden cDNAs isoliert, doch wurden in PCR-Ansätzen mit degenerierten Oligonukleotiden und genomischer bzw. cDNA als Template DNA-Fragmente amplifiziert, die aufgrund ihrer Sequenz auf das Vorhandensein von Petersilie-MAPKs der Gruppe 1 schließen lassen (A. Zunker und A. Neining, persönliche Mitteilung).

Abb. 10 (auf Seite 40): Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNA-Klone *MPK1*, *2*, *3* und *4* untereinander (A) und mit bekannten pflanzlichen MAPKs (B).

(A) Das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNA-Klone *MPK1*, *2*, *3* und *4* wurde mit dem Programm DNASIS erstellt. Unterlegte Bereiche zeigen identische Aminosäuren an, Lücken sind durch Striche symbolisiert, Sterne bezeichnen die Positionen des Stopkodons.

(B) Der Stammbaum der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Petersilie-cDNA-Klone *pcMPK1*, *2*, *3* und *4* und bekannter pflanzlicher MAPK-cDNAs wurde mit dem Programm DNASIS erstellt. Im einzelnen wurden neben den Sequenzen der Petersilie-MAPKs (MPKs) die Arabidopsis-MAPKs *MPK1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *6* und *7* (Mizoguchi *et al.*, 1993), der Tabak-MAPKs *WIPK* (Seo *et al.*, 1995), *SIPK* (Zhang und Klessig, 1997), *NTF3* (Wilson *et al.*, 1993), *NTF4* und *NTF6* (Wilson *et al.*, 1995), der Medikago-MAPKs *MMK1* (Jonak *et al.*, 1993), *2* (Jonak *et al.*, 1995), und *4* (Jonak *et al.*, 1996), der Erbsen-MAPK PsD5 (PEAMK; Schafstrom *et al.*, 1993), der Petunien-MAPK PhERK1 (PETMK; Decroocq-Ferrand *et al.*, 1995) und der Hafer-MAPK AsPK9 (OATMK, Huttly und Phillips, 1995) verwendet.

A

		10	20	30	40	50	
PCMPK1.AMI	1	-----	----MANPG	DGOYDFP	AIQTHGGQFIQY	NIFGNLFQVT	50
PCMPK2.AMI	1	-----	----MANPG	DGOYDFP	AIHGGGRFIQY	NIFGNLFQVT	50
PCMPK3.AMI	1	MDGSTQPSDT	VMSDAAPASQ	TAGIENIPAS	LSHGGRFIQY	NIFGNLFQVT	50
PCMPK4.AMI	1	-----	---MESSSA	ATDHTHIKGV	PTHGGRYVQY	NVYGNLFQVT	50
PCMPK5.AMI	1	-----	-----	-----	-----	-----	50
		60	70	80	90	100	
PCMPK1.AMI	51	KKYRPPIMPI	GRGAYGIVCS	IMNTEINEMV	AVKKIANAFD	NYMDAKRTRLR	100
PCMPK2.AMI	51	AKYRPPIMPI	GRGAYGIVCS	IMNTEANEMV	AIKKIANAFD	NYMDAKRTRLR	100
PCMPK3.AMI	51	AKYKPPILPI	GKAYGIVCS	ALNLETNEHV	AIKKIANAFD	NKVDARTRLR	100
PCMPK4.AMI	51	RKYVPPTRFV	GRGAYGIVCA	AMNSDTREEV	AIKKIGNAFD	NRIDAKRTRLR	100
PCMPK5.AMI	51	-----	-----	-----	-----	-----	100
		110	120	130	140	150	
PCMPK1.AMI	101	EIKLLRHLDH	ENVIAITDVI	PPPLRRRFTD	VYIATELMDT	DLHQIIRSNO	150
PCMPK2.AMI	101	EIKLLRHLDH	ENIIALTDVI	PPVRRRNFSD	VYIATELMDT	DLHQIIRSAQ	150
PCMPK3.AMI	101	EIKLLRHMHD	ENVVAIRDII	PPQRGSFND	VYIAYELMDT	DLHQIIRSNO	150
PCMPK4.AMI	101	EIKLLRHMNH	ENVIAIKDII	RPPQIESFND	VYIVYELMDT	DLHQIIRSNO	150
PCMPK5.AMI	101	-----	-----	-----	-----	DLHQIIRSNO	150
		160	170	180	190	200	
PCMPK1.AMI	151	GLSEEHQYF	LYQLLRGLKY	IHSANIHRD	LKPSNLLLNA	NCDLKICDFG	200
PCMPK2.AMI	151	VLSEEHQYF	LYQLLRGLKY	IHSANIHRD	LKPSNLLLNA	NCDLKICDFG	200
PCMPK3.AMI	151	GLSEEHQYF	LYQLLRGLKY	IHSANVLRD	LKPSNLLLNA	NCDLKICDFG	200
PCMPK4.AMI	151	QLTDDHCRYF	LYQLLRGLKY	VHSANVLRD	LKPSNLLLNA	NCDLKICDFG	200
PCMPK5.AMI	151	QLTDDHCRYF	LYQLLRGLKY	VHSANVLRD	LKPSNLLLNA	NCDLKIGDFG	200
		210	220	230	240	250	
PCMPK1.AMI	201	LARHNTDDEF	MTEYVTRWY	RAPELLNNS	DYTVADVWS	VGCYIMELMN	250
PCMPK2.AMI	201	LARNTDDEF	MTEYVTRWY	RAPELLNNS	DYTAADVWS	VGCYIMELMN	250
PCMPK3.AMI	201	LARVTSETDF	MTEYVTRWY	RAPELLNNS	DYTAADVWS	VGCIFMELMD	250
PCMPK4.AMI	201	LARTTSETDF	MTEYVTRWY	RAPELLNCS	EYTAADIVS	VGCILGEVMT	250
PCMPK5.AMI	201	LARTTSETDF	MTEYVTRWY	RAPELLNCS	EYTAADIVS	VGCILGEVMT	250
		260	270	280	290	300	
PCMPK1.AMI	251	RKPLFAGKDH	VHQMRLTEL	LGSPTADLG	FVRNEDAKRF	ILQLPRHPRQ	300
PCMPK2.AMI	251	RTPLFAGRDH	VHKMRLTEL	LAAPTEPDLG	FVRNEDSRRY	ILQLPRRRL	300
PCMPK3.AMI	251	RKPLFPGRDH	VHQLRLMEL	IGTPSEAELE	FL-NENAKRY	IRQLPLRRQ	300
PCMPK4.AMI	251	RQPLFPKDY	VHQLRLTEL	IGSPDDASLG	FLRSDNARRY	VRQLPQYKQ	300
PCMPK5.AMI	251	RQPLFPKDY	VHQLRLTEL	IGSPDDASLG	FLRSDNARRY	VRQLPQYKQ	300
		310	320	330	340	350	
PCMPK1.AMI	301	PLRQLYPOVH	PLAIDLIDKM	LTFDPKSKRIT	VEEALAHPYL	ARLHDIADDP	350
PCMPK2.AMI	301	SLRMLYPOVH	PVAIDLIDKM	LTFDPKSKRIT	VEEALAHPYL	ERLHDVSDDP	350
PCMPK3.AMI	301	SLTEKPFNVH	PSAIDLVEKM	LTFDPKRRRLT	VEDALAHPYL	TSLHDIADDP	350
PCMPK4.AMI	301	QFSARFLNKS	PGALDLEKEM	LIFDPNRRIT	VDEALCHPYL	AALHDINEEP	350
PCMPK5.AMI	301	LFSARFLNKS	PGALDLEKEM	LIFDPNRRIT	VDEALCHPYL	APLHDINEEP	350
		360	370	380	390		
PCMPK1.AMI	351	ICTKPFSEF	ETAHLGEEQI	KMIYQEALA	FNPDCA*...	400	
PCMPK2.AMI	351	VCSKPFSEF	ETAHLGEEQI	KMIYQEALS	FNPGMA*...	400	
PCMPK3.AMI	351	VCAAPFSEF	EQHALTEEOM	RELIYREALA	FNPBHQOM*	400	
PCMPK4.AMI	351	VCPRPFSDF	EQPTCTEENI	KELIWKESVK	FNPDPIL*	400	
PCMPK5.AMI	351	VCPQPFSEF	EQPSCTEENI	KELIWRSEVK	FNPDPIT*	400	

B

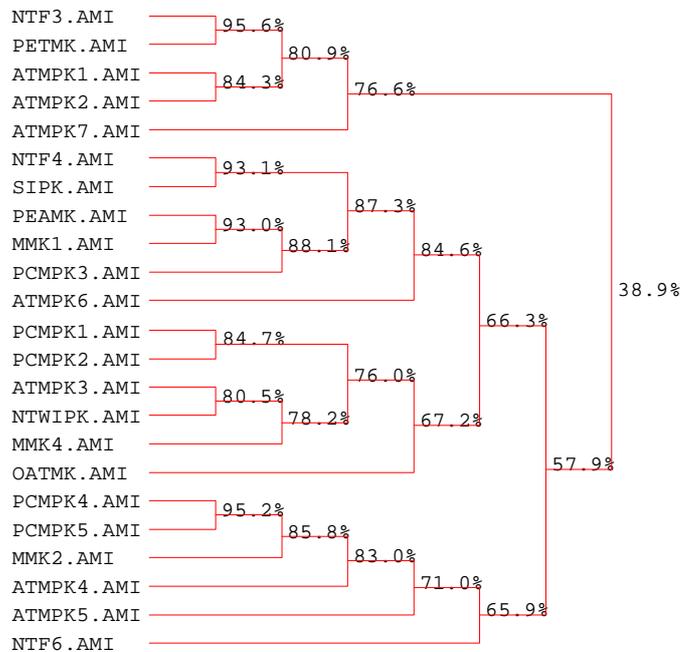


Abb. 10 (Legende auf Seite 39): Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der cDNA-Klone *MPK1*, *2*, *3* und *4* untereinander (A) und mit bekannten pflanzlichen MAPKs (B).

3.4.3 Southern-Analyse genomischer DNA mit *MPK1*-, *MPK2*- und *MPK3*-Sonden

Southernblots genomischer Petersilie-DNA wurden mit radioaktiv markierten DNA-Proben hybridisiert, die den kodierenden Bereichen der *MPK1*-, *MPK2*- und *MPK3*-cDNAs entsprachen (Abb. 11). Während die Ergebnisse mit der *MPK1*- und der *MPK2*-Sonde darauf hindeuteten, daß im Petersiliengenom keine weiteren Vertreter dieser Gruppe vorhanden sind, ließ der Versuch mit *MPK3* darauf schließen, daß noch ein oder zwei Homologe dieser MAPK in der Petersilie existieren.

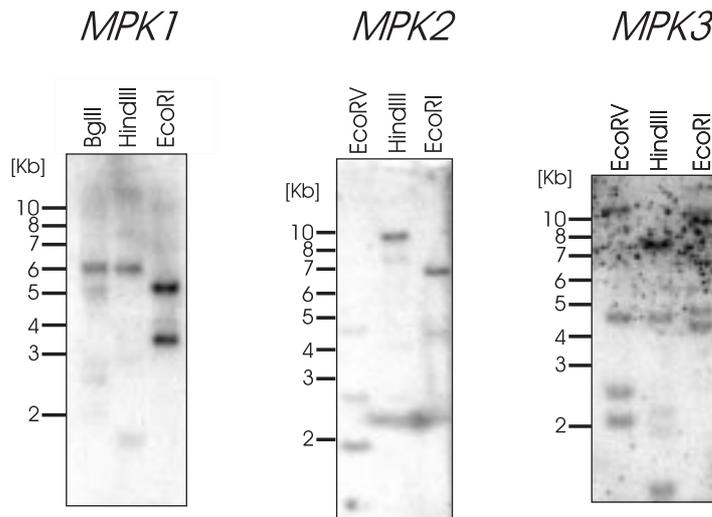


Abb. 11: Southernblot-Analyse genomischer Petersilie-DNA mit *MPK1*-, *MPK2*- und *MPK3*-Sonden. Genomische DNA aus Petersilie (jeweils 20 µg) wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und BglII (für *MPK1*) bzw. EcoRV (für *MPK2* und *3*) verdaut und in Southernblot-Experimenten mit radioaktiv markierten DNA-Proben hybridisiert, die die Leserahmen der oben angegebenen cDNAs repräsentieren.

3.4.4 Expression von *MPK1*, *MPK2*, *MPK3* und *MPK4* in *E. coli*

Die Petersilie-MAPKs *MPK1*, *MPK2*, *MPK3* und *MPK4* wurden unter Verwendung von Vektoren der pGEX-Serie der Firma Pharmacia als GST-Fusionsproteine (Glutathion-S-Transferase) in *E. coli* exprimiert. Nach Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG und Lyse der Bakterien lagen die rekombinanten Proteine in löslicher Form vor und ließen sich über Affinitätschromatographie an Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia) aufreinigen. Bei Analyse des Eluats mit SDS-PAGE war im Coomassieblau-gefärbten Proteingel lediglich eine einzige Bande von 67 kDa (*MPK1*, *MPK2* und *MPK4*) bzw. 69 kDa (*MPK3*) sichtbar (Abb. 12A). Durch Proteaseverdau mit Factor X (*MPK1*) bzw. Thrombin (*MPK2*, *MPK3*, *MPK4*) ließ sich der GST-Anteil abspalten. Die so erhaltenen rekombinanten Kinasen zeigten bei Untersuchung durch SDS-PAGE (Abb. 12B) eine apparente Masse, die jeweils 1-2 kDa größer war, als diejenige, die für die abgeleiteten Aminosäuresequenzen errechnet worden waren. *MPK3* zeigte im Proteingel eine Masse von 46 kDa, *MPK1*, *2* und *4* eine Masse von 44 kDa. Bei 26 kDa war das abgespaltene GST sichtbar.

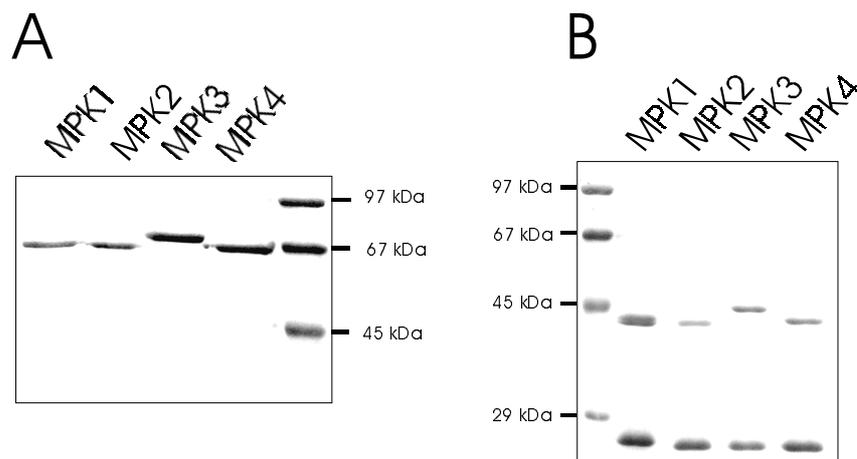


Abb. 12: SDS-PAGE der rekombinanten MAPKs MPK1, 2, 3 und 4. Coomassieblau-gefärbte SDS-PAGEs der affinitätsgereinigten (A) und der affinitätsgereinigten und Faktor X- bzw. Thrombin-gespaltenen (B) rekombinanten MAPKs MPK1, 2, 3 und 4 (jeweils 1 $\mu\text{g}/\text{Spur}$).

3.4.4.1 Bestimmung der Kinaseaktivität des rekombinanten MPK1

Zur Untersuchung der Aktivität der so erhaltenen rekombinanten Proteine wurde für GST:MPK1 in *In-Vitro*-Versuchen die Autophosphorylierungsaktivität und die Kinaseaktivität gegenüber MBP bestimmt. Dabei zeigte sich, daß das rekombinante Protein stark autophosphoryliert und auch gegenüber dem Substrat MBP kinaseaktiv ist (Abb. 13A und B).

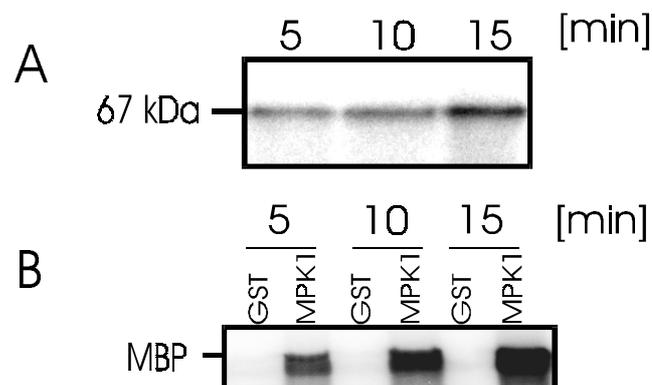


Abb. 13: Nachweis der Kinaseaktivität des rekombinanten GST:MPK1.

(A) Rekombinantes GST:MPK1 (50 ng) wurde für die angegebenen Zeiten in Kinasepuffer inkubiert, der $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ enthielt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

(B) Rekombinantes GST:MPK1 (2 ng) wurde zusammen mit MBP (0,5 μg) für die angegebenen Zeiten in Kinasepuffer inkubiert, der $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ enthielt. Die Reaktionsprodukte wurden wie in (A) analysiert.

3.4.5 Kreuzreaktion des M7- und des M11-Serums mit den rekombinanten Kinasen

Durch das M7-Serum, das gegen den C-Terminus der Medicago-MAPK MMK4 gerichtet ist, aber aufgrund der hohen Sequenzidentität auch MMK1 erkennt, wurde in Petersilieextrakten eine 46 kDa große, elicitorresponsive MAPK detektiert (3.1.3 und 3.1.4). Dahingegen ließ sich mit Hilfe des M11-Serums, das gegen den C-Terminus von MMK2 gerichtet ist, keine elicitorresponsive Kinase in Petersilie nachweisen (3.1.3). Mit beiden Seren wurden in der Folge Westernblots der rekombinanten Kinasen analysiert. Dabei zeigte sich, daß die M7-Antikörper sehr gut MPK3 erkennen, wesentlich schlechter allerdings auch MPK1 (Abb. 14A). Das M11-Serum reagierte dahingegen ausschließlich mit MPK4 (Abb. 14B).

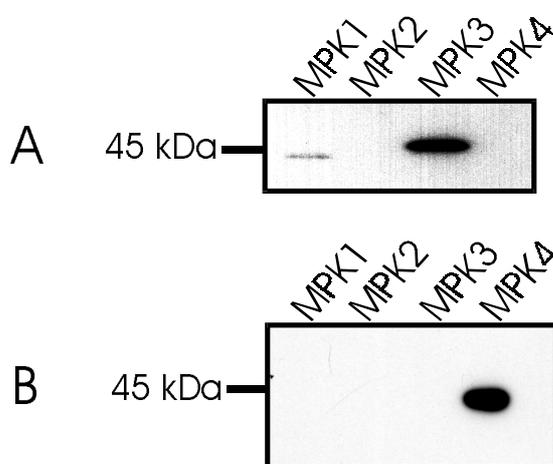


Abb. 14: Kreuzreaktion der Antiseren M7 (A) und M11 (B) mit den rekombinanten MAPKs. Westernblots mit den rekombinanten MAPKs MPK1-4 (25 ng/Spur) wurden (A) mit dem M7-Serum (8000fach verdünnt) und (B) dem M11-Serum (5000fach verdünnt) analysiert.

3.4.6 Produktion von Antikörpern gegen N- und C-terminale Peptide der Kinasen MPK1, 3 und 4

Die klonierten Kinasen sind so homolog, daß spezifische Antikörper, die eindeutig zwischen den einzelnen Isoformen diskriminieren, nur durch Immunisierung mit Peptiden aus heterologen Sequenzbereichen erhalten werden können. Dies sind vor allem die ersten 15-30 Aminosäuren des N-Terminus, ein kleiner Bereich von 10 Aminosäuren um Aminosäure 305 von MPK3 und die letzten 25 Aminosäuren des C-Terminus (Abb. 10A). Diese Sequenzbereiche der Kinasen MPK1, 2, 3 und 4 wurden mit verschiedenen Programmen auf ihre Antigenizität hin überprüft und anschließend die in Tabelle 13 aufgeführten Peptide zur Immunisierung ausgewählt. Aufgrund der großen Sequenzhomologie zwischen MPK1 und 2 erschien es uns wenig aussichtsreich, Peptidantikörper zu erhalten, die zwischen den beiden Kinasen diskriminieren. Die Peptide wurden mittels Festphasensynthese hergestellt, nach Überprüfung der Reinheit der Syntheseprodukte durch HPLC-Analyse und Bestätigung der Aminosäuresequenz durch Peptidsequenzierung an KLH gekoppelt und für die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen verwendet.

Tab. 13: Übersicht über die für die Immunisierung verwendeten Peptide und die erhaltenen Seren

Kinase	Bereich (Positionen der Aminosäuren)	Sequenz	Serum
MPK1	N-Terminus (1-14)	MANPGDGQYTDFPAC	P00 und P01
MPK1	C-Terminus (355-370)	KDMIYQEALAFNPDC	P97 und P98
MPK3	N-Terminus (2-15)	DGSTQPSDTVMSDAC	P81 und P82
MPK3	C-Terminus (361-371)	CEQHALTEEQMRE	P124 und P125
MPK4	C-Terminus (360-374)	CIWKESVKFNPDPIIL	P37 und P38

3.4.7 Kreuzreaktion der Antiseren mit den rekombinanten Kinasen und mit Petersilieproteinen

Durch Dotplot- und Westernblot-Experimente mit den rekombinanten Kinasen und Petersilieproteinextrakt wurden geeignete Inkubationsbedingungen ermittelt und die Spezifität der Seren überprüft. Die gegen den N-Terminus von MPK1 gerichteten Seren P00 und P01 ergaben keine Signale mit dem rekombinanten MPK1 und wurden deshalb nicht weiter verwendet. Das gegen den C-Terminus von MPK1 gerichtete Serum P97 erkannte mit hoher Spezifität rekombinantes MPK1 (Abb. 15A). Daneben wurde, allerdings weitaus schwächer, MPK2 detektiert. In Westernblot-Analysen mit Petersiliegesamtprotein detektierte P97 zwei Banden der Größen 42 und 50 kDa (Abb. 15B), deren Intensität nach Elicitierung gleich blieb (nicht gezeigt).

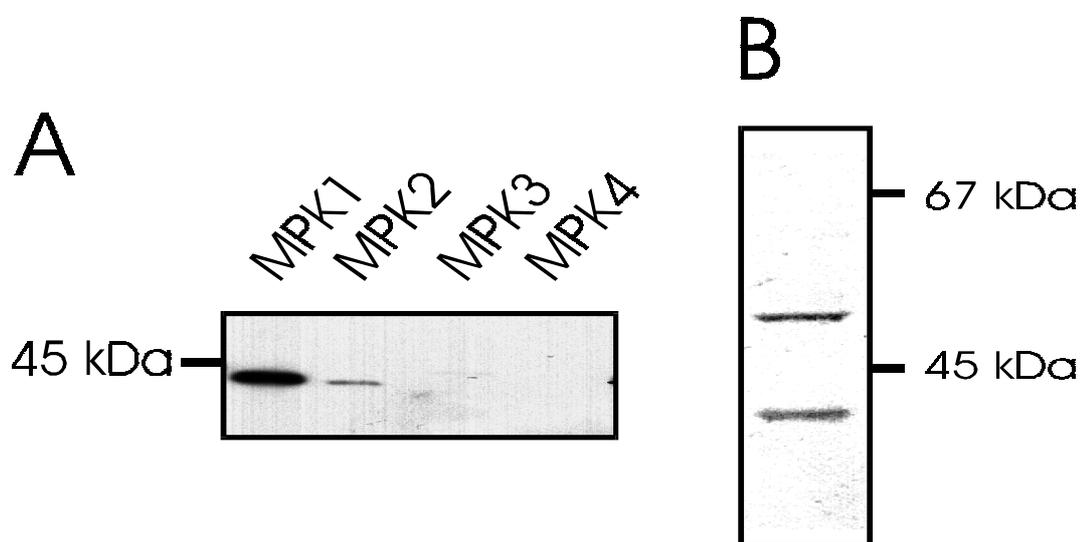


Abb. 15: Spezifität des Serums P97.

Westernblots mit den rekombinanten MAPKs MPK1-4 (25 ng/Spur) (A) und Petersilieproteinextrakt (20 µg/Spur) (B) wurden mit dem P97-Serum (x5000) analysiert.

Das gegen den N-Terminus von MPK3 gerichtete Serum P82 detektierte auf Westernblots von den rekombinanten Kinasen ausschließlich MPK3 (Abb. 16A). In Westernblots von Petersilieproteinextrakt kreuzreagierte es lediglich mit einer einzigen Bande von 46 kDa (Abb. 16B).

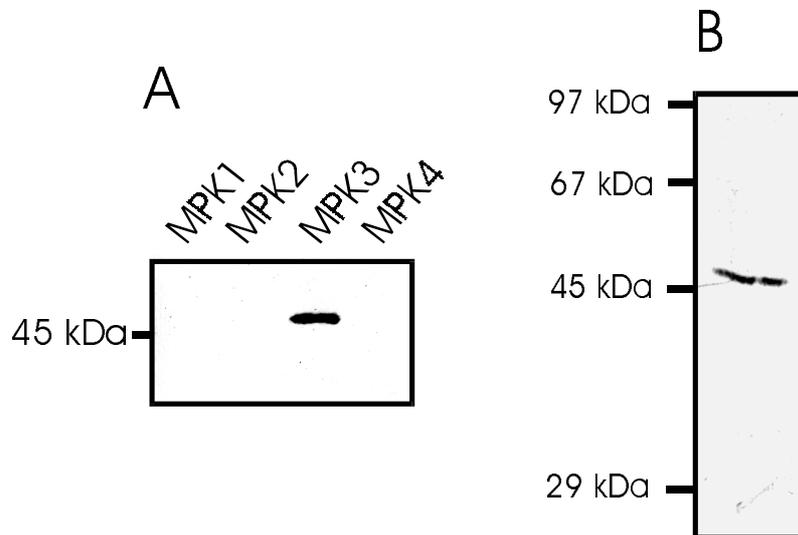


Abb. 16: Spezifität des Serums P82.

Westernblots mit den rekombinanten MAPKs MPK1-4 (25 ng/Spur) (A) und Petersiliengesamtproteinextrakt (20 µg/Spur) (B) wurden mit dem P82-Serum (x8000) analysiert.

Die Seren P124 und P125, die gegen den C-Terminus von MPK3 gerichtet sind, reagierten auf Westernblots mit rekombinatem MPK3 und wesentlich schwächer auch mit MPK1. In Westernblots von Petersilieproteinextrakt erkannte das Serum P124 eine einzelne Bande von 46 kDa (nicht gezeigt). Da der Antikörpertiter in Seren der zweiten und dritten Blutung stark absank, wurden diese Antikörper nicht weiterverwendet.

Die gegen den C-Terminus von MPK4 gerichteten Seren P37 und P38 detektierten von den rekombinanten Kinasen auf Westernblots ausschließlich MPK4 (nicht gezeigt).

3.4.8 Immunpräzitationsexperimente mit den Seren P82, P97, P37 und P38

Die oben dargestellten Ergebnisse deuteten darauf hin, daß die elicitorresponsive 46-kDa-MAPK, die durch das M7-Serum präzipitiert wurde, identisch mit MPK3 ist. Um diese Schlußfolgerung zu verifizieren und um zu untersuchen, ob MPK1 oder MPK4 ebenfalls elicitorresponsiv sind, wurden Immunpräzitations-Kinaseexperimente mit den Seren P82, P97, P37 und P38 durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß lediglich das Serum P82 eine elicitorresponsive MAPK-Aktivität präzipitierte, während P97 (Abb. 17A), P37 und P38 (nicht gezeigt) unwirksam waren. Die Aktivierungskinetik der durch P82 präzipitierten Kinase (Abb. 17B) entsprach der der 46-kDa-MAPK, und die Fällung der Aktivität ließ sich durch Zugabe eines Peptids kompetieren, das den N-Terminus von MPK3 enthielt (Abb. 17C).

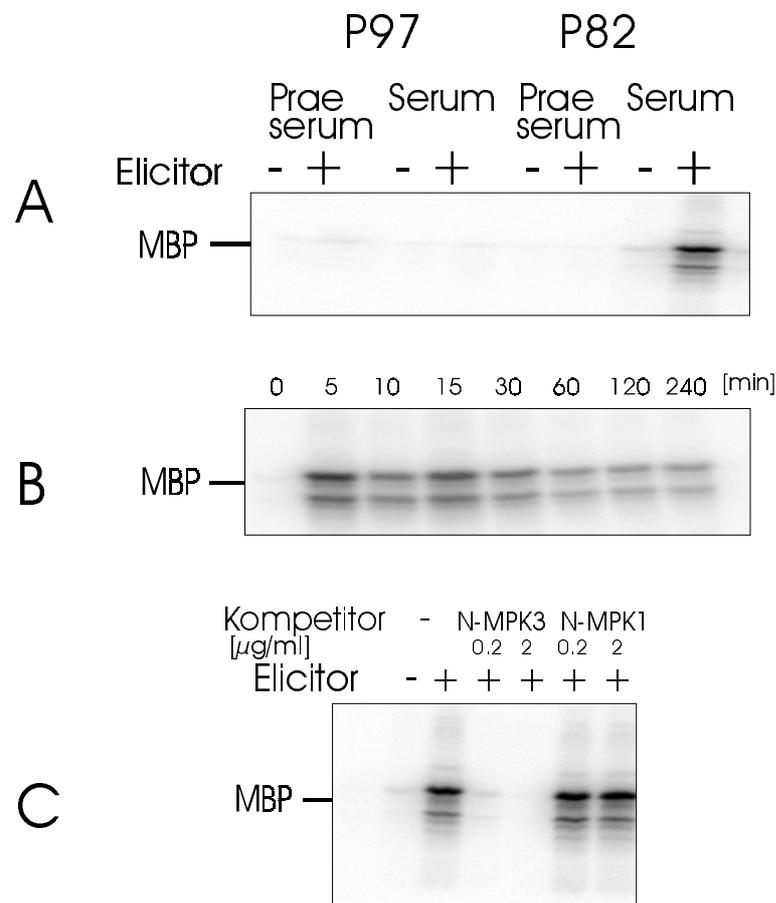


Abb. 17: Immunpräzipitationsexperimente mit P82 und P97.

(A) Proteinextrakte (100 μg) aus nicht elicitierten Zellen und Zellen, die für 5 min mit Pep25 (50 ng/ml) behandelt worden waren, wurden mit dem P82- oder P97-Serum in Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten untersucht (wie unter Abb. 3 beschrieben).

(B) Immunpräzipitations-Kinaseexperimente (wie unter Abb. 3 beschrieben) wurden mit P82-Serum und Proteinextrakten (100 μg) aus nicht elicitierten Zellen und Zellen, die für die angegebenen Zeiten mit Pep25 (50 ng/ml) behandelt worden waren, durchgeführt.

(C) Immunpräzipitations-Kinaseexperimente (wie unter Abb. 3 beschrieben) wurden mit P82-Serum und Proteinextrakten (100 μg) aus nicht elicitierten Zellen und Zellen, die für 5 min mit Pep25 (50 ng/ml) behandelt worden waren, durchgeführt. Dem Proteinextrakt aus elicitierten Zellen wurde in den angegebenen Proben vor Zugabe der Antikörper ein Peptid zugesetzt (0,2 oder 2 $\mu\text{g/ml}$), das die 15 N-terminalen Aminosäuren von MPK3 oder MPK1 enthielt.

3.5 Suche nach Interaktionspartnern von MPK1 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal die rezeptorvermittelte Aktivierung von MAPKs in elicitorbehandelten Pflanzenzellen gezeigt werden. Die anderen Komponenten dieses Signalmoduls sind jedoch noch unbekannt. Dies gilt sowohl für die

Substrate als auch für die Regulatoren der MAPKs. Bisher sind keine relevanten Substrate für pflanzliche MAPKs bekannt, und obwohl einige MKKs aus unterschiedlichen Pflanzenspezies kloniert worden sind (Mizoguchi *et al.*, 1997), ist bisher keine Zuordnung zu einem gegebenen Modul möglich. Deshalb wurde versucht, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems MAPK-Interaktionspartner zu klonieren.

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist ein genetisches System zum Nachweis und zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen und erlaubt, mit einem Protein der Wahl geeignete DNA-Banken nach Interaktionspartnern zu durchsuchen (Bartel *et al.*, 1993a; Phizicky und Fields, 1995). Es basiert auf der Fähigkeit zweier Hybridproteine, von denen eines eine DNA-bindende Domäne und eines eine transkriptionsaktivierende Domäne enthält, zu interagieren und die Transkription eines Reportergens zu aktivieren (Fields und Song, 1989).

Das Schema in Abb. 18 verdeutlicht die Funktionsweise des von uns benutzten Systems. Zu Anfang werden Plasmide konstruiert, die für die beiden Hybridproteine kodieren. Ein Hybridprotein besteht aus der DNA-bindenden Domäne des Hefe Transkriptionfaktors GAL4 fusioniert mit einem Testprotein X ("bait"), das andere aus der transaktivierenden Domäne des GAL4 fusioniert mit einem Testprotein Y ("prey"). Die Plasmide werden in einen Reporterhefestamm transformiert, der stabil im Genom integrierte Reportergene besitzt, deren Promotoren GAL4-bindende-DNA-Sequenzen (UAS_G) enthalten. Jedes der Hybridproteine für sich ist nicht in der Lage, die Transkription der Reportergene zu aktivieren. Das "bait"-Hybrid nicht, weil es keine transkriptionsaktivierende Domäne enthält, das "prey"-Hybrid nicht, weil es nicht an die GAL4-bindenden DNA-Sequenzen binden kann. Nur wenn die beiden Testproteine X und Y interagieren, werden die beiden Domänen des GAL4 zusammengeführt und seine Funktion rekonstituiert, was in der Folge zu Reporterexpression führt (Fields und Song, 1989; Bartel *et al.*, 1993a).

Für einen genetischen Screen nach Interaktionspartnern eines gewählten Proteins mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems benötigt man eine DNA-Bank (genomisch oder cDNA) in demjenigen Plasmid, das für die transaktivierende Domäne kodiert (Chien *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995). Diese Bank wird gemeinsam mit dem Plasmid, das für das Hybridprotein aus DNA-bindender Domäne und Testprotein kodiert, in den Reporterhefestamm kotransformiert. Anschließend werden die Transformanten auf Reporterexpression selektiert, positive Kolonien vereinzelt und die Plasmide, die die Reporteraktivierung vermitteln, isoliert und sequenziert (Bartel *et al.*, 1993a). Bei einem solchen Screen ist es von besonderer Bedeutung, durch geeignete Kontrollen die Interaktion positiver Klone mit dem Testprotein zu verifizieren (Bartel *et al.* 1993b; Wong und Naumovski, 1997).

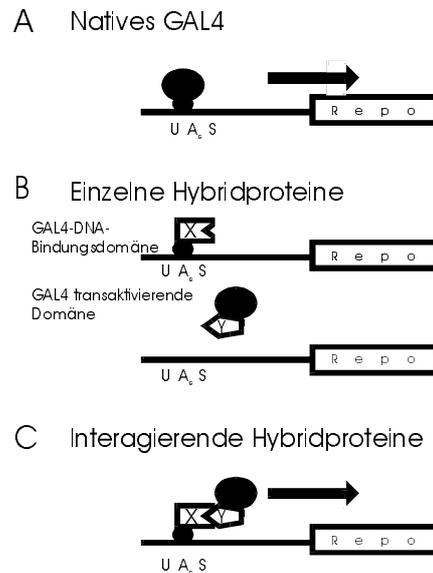


Abb. 18: Das Hefe-Zwei-Hybrid-System (nach Fields und Song, 1989).

(A) Der Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4 besitzt eine DNA-bindende Domäne, die an definierte Promotor-DNA-Sequenzen (UAS_G) bindet, und eine transkriptionsaktivierende Domäne, die zur Expression des unterhalb von UAS_G liegenden Reportergens führt.

(B) Die Hybridproteine sind alleine nicht in der Lage, die Transkription des Reportergens zu aktivieren.

(C) Binden die Testproteine X und Y aneinander, werden die DNA-bindende und die transaktivierende Domäne des GAL4 wieder zusammengebracht und die Transkription des Reportergens wird aktiviert.

3.5.1 Herstellung einer Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank aus Petersilie-mRNA

Da keine für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen geeignete Petersilie-cDNA-Bank verfügbar war, wurde eine solche unter Verwendung des "HybriZAP™ Two-Hybrid Predigested Vector Kit" (Stratagene) und RNA aus unbehandelten und für 30, 60 und 120 min elicitorbehandelten Petersiliezellen hergestellt. Die primäre Phagenbank enthielt 3×10^6 unabhängige pfu. Die PCR Analyse von 40 Phagen ergab, daß 94% Inserts enthielten, deren durchschnittliche Länge 1,2 kB betrug. Nach einmaliger Amplifikation der Bank wurde unter Verwendung von Helferphagen eine *In-Vivo*-Massenexcision vorgenommen, um die für den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen benötigte Plasmidbank herzustellen. Die Analyse von 36 einzelnen Klonen der so erhaltenen Bank durch Restriktionsanalyse ergab, daß 91% der Plasmide Inserts mit einer durchschnittlichen Größe von 1,1 kb enthielten.

3.5.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit *MPK1*

Zum Zeitpunkt der beschriebenen Arbeiten war lediglich *MPK1* kloniert, und aufgrund der Immunpräzipitationsexperimente mit dem M7-Antiserum wurde angenommen, daß diese Kinase elicitorresponsiv ist. Deshalb wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit *MPK1* durchgeführt. Dazu wurde das Konstrukt pBD-HA.M1 hergestellt, das für ein

MPK1-Hybridprotein kodiert, dessen N-Terminus von der DNA-bindenden Domäne des GAL4 gebildet wird und am C-Terminus ein HA-Epitop besitzt. Zum Screenen wurde der Reporterhefestamm PJ69-4A verwendet, der die Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* unter Kontrolle der GAL4-bindenden Promotoren der *GAL2*-, *GAL1*- und *GAL7*-Gene enthält (James *et al.*, 1996). *ADE2* und *HIS3* erlauben eine Selektion auf Adenin- bzw. Histidin-Auxotrophie auf SD-Ade- bzw. SD-His-Agar. Die *lacZ*-Expression läßt sich mit X-Gal-Platten oder einem *In-Vitro* Aktivitätsnachweis detektieren.

3.5.2.1 Kontrollen zur Eignung des pBD-HA.M1-Konstrukts für einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen

Um die Eignung des MPK1-Hybridproteins für einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen zu überprüfen, wurden PJ69-4A-Zellen mit pBD-HA.M1 und dem Kontrollplasmid pSV40 kotransformiert. Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein aus dem großen SV40 T-Antigen und der transaktivierenden Domäne von Gal4 (Chien *et al.*, 1991), von dem angenommen wurde, daß es nicht mit dem MPK1-Hybridprotein interagiert. Als weitere Kontrollen wurden Kotransformationen von pSV40 und pLamin C oder p53 verwendet, die für ein Fusionsprotein aus der DNA-bindenden Domäne des Gal4 und Lamin C bzw. p53 kodieren (Iwabuchi *et al.*, 1993; Bartel *et al.*, 1993b). Da p53 mit dem SV40-Antigen interagiert, nicht aber mit Lamin C, führt die Kombination p53-pSV40 zu Reporterexpression, nicht aber die Kombination pLamin C-pSV40.

Lediglich die positive Kontrolle, die die Konstrukte für die interagierenden SV40-Antigen- und P53-Hybridproteine enthielt, zeigte Reporterexpression (Tab. 14). In der negativen Kontrolle (pLamin C-pSV40) und in der Kombination pBD-HA.M1-pSV40 wurde keine Reporterexpression gefunden.

Tab. 14: Kontrolltransformationen zur Untersuchung der Eignung des pBD-HA.M1-Konstrukts für einen Zwei-Hybrid-Screen.

Prey-Konstrukt	Bait-Konstrukt	SD-His ¹	SD-Ade ¹	X-Gal ²	Interaktion
pLamin C	pSV40	-	-	w	nein
p53	pSV40	+	+	b	ja
pBD-HA.M1	pSV40	-	-	w	nein

¹ Kein Wachstum (-) oder Wachstum (+) auf SD-His- bzw. SD-Ade-Agar.

² Farblose (w) oder blaue (b) Kolonien auf X-Gal-Agar.

Um nachzuweisen, daß das MPK1:HA-Hybridprotein in transformierten Hefezellen auch tatsächlich exprimiert wird, wurden von PJ69-4A Hefezellen, die p53- oder pBD-HA.M1-Plasmid enthielten, Proteinextrakte hergestellt, und diese mit Hilfe von HA-Antikörpern in Westernblots untersucht. Nur bei den Extrakten derjenigen Hefezellen, die pBD-HA.M1 enthielten, war bei 64 kDa, der Größe des MPK1:HA-Hybridproteins, ein Signal sichtbar (Abb. 19).

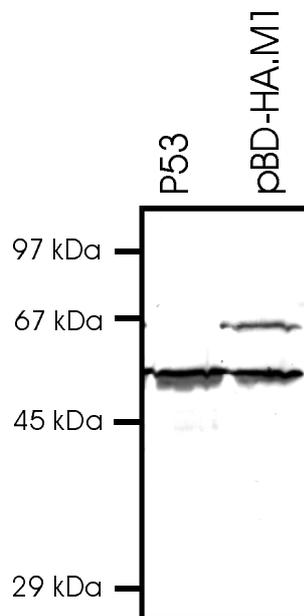


Abb.19: Westernblot mit HA-Antikörpern zum Nachweis des MPK1:HA-Hybridproteins in Hefeextrakten.

Westernblots wurden unter Verwendung von Gesamtproteinextrakt (20 µg/Spur) von Hefezellen, die das Plasmid pBD-HA.M1 oder p53 enthielten, hergestellt und mit HA-Antikörpern analysiert.

3.5.2.2 Ergebnis des Screens

Es wurden 2 Screens durchgeführt, in denen jeweils 1×10^6 Primärtransformanden analysiert wurden. Dabei wurden 25 Klone isoliert, von denen nach der zweiten Selektionsrunde 2 positive verblieben. Diese beiden cDNA-Klone, die als *2H1* und *2H4* bezeichnet wurden, interagierten im Hefe-Zwei-Hybrid-System spezifisch mit MPK1, nicht aber mit Lamin C oder p53 (Tab. 15).

Tab. 15: Reportergenaktivierung durch die cDNA-Klone 2H1 und 2H4

Prey-Konstrukt	Bait-Konstrukt	SD-His ¹	SD-Ade ¹	X-Gal ²
pLamin C	p2H1	-	-	w
p53	p2H1	-	-	w
pBD-HA.M1	p2H1	+	+	b
pLamin C	p2H4	-	-	w
p53	p2H4	-	-	w
pBD-HA.M1	p2H4	+	+	b

¹ Kein Wachstum (-) oder Wachstum (+) auf SD-His- bzw SD-Ade-Agar

² Farblose (w) oder blaue (b) Kolonien auf X-Gal-Agar.

3.5.2.3 Analyse der Sequenzen der Klone 2H1 und 2H4

Die DNA-Sequenz der beiden positiven cDNA-Klone wurde durch automatische DNA-Sequenzierung bestimmt (Anhang 9 und 10). Die cDNA des Klons 2H1 ist 745 bp lang und enthält als größten offenen Leserahmen eine Sequenz von 555 bp, die das gleiche Leseraster wie die stromaufwärts gelegene Gal4-Sequenz besitzt und in Fusion mit dieser ist. Sequenzvergleiche mit Datenbanken und Motivanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenz ergaben keine Hinweise auf eine mögliche Funktion des Gens. Allerdings wurde zwischen den Aminosäuren 66-83 ein putatives zweigeteiltes Kernlokalisierungssignal identifiziert.

Die cDNA des Klons 2H4 ist 749 bp lang und enthält als größten offenen Leserahmen eine Sequenz von 561 bp, die das gleiche Leseraster wie die stromaufwärts gelegene GAL4-Sequenz besitzt und in Fusion mit dieser ist. Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Datenbanksequenzen zeigten, daß es in allen Organisationsformen stark konservierte Homologe des 2H4-Gens gibt (Abb. 20). Eine Funktion für diese Gene ist allerdings nicht bekannt. Auch konnten in der abgeleiteten 2H4-Aminosäuresequenz oder den Sequenzen der Homologen keine Sequenzmotive identifiziert werden, die einen Hinweis auf eine mögliche Funktion erlaubten. Aus dem Vergleich mit der hochhomologen Arabidopsis-Sequenz ließ sich der Schluß ableiten, daß wahrscheinlich annähernd der gesamte kodierende Bereich der 2H4-mRNA in dem isolierten Klon enthalten ist - es fehlen vermutlich lediglich ca. 20 Basen am 5'-Ende.

2H4 .AMI	1	KLGRSTNS--	----A-PILK	IQRGDITRWF	VDASSDAI--	-----VNP	50
ATHAL .AMI	1	MASGDEGAVF	NLSDS-SLLK	ILKGDITKWS	VDSSSDAIFD	LGSLFROVNP	50
CELEG .AMI	1	MAAAKISEIK	VAKNVLGRIS	VWDGDITK--	--LSVDAI--	-----VNA	50
ECOLI .AMI	1	MKT-RIHVV--	-----	--QGDITK--	--LAVDVI--	-----VNA	50
REUTR .AMI	1	MSGEHLQVV-	-----	--HGDITR--	--MEVDAL--	-----VNA	50
PHORIKOS .AMI	1	M-----	-----ITMFK	IVRGDITKFR	-----AEAL--	-----VNA	50
		60	70	80	90	100	
2H4 .AMI	51	ANERMLGGGG	ADGAIHRAAG	P-E---LRES	CYSVPEVRPG	VRCPTGEART	100
ATHAL .AMI	51	ANERMLGGGG	ADGAIHRAAG	P-Q---LRAA	CYEVPEVRPG	VRCPTGEART	100
CELEG .AMI	51	ANSRLAGGGG	VDGAIHRAAG	RKQ---LQEE	C---QQYNG	--CAVGDVAV	100
ECOLI .AMI	51	ANPSLMGGGG	VDGAIHRAAG	P-A---LLDA	CLKVRQQQGD	--CPTGHAVI	100
REUTR .AMI	51	ANSGLLGGGG	VDGAIHRAAG	S-A---IKEA	CRAIRDTQGG	--CPTGEAVI	100
PHORIKOS .AMI	51	ANKYLEHGGG	VAYALAKAAS	GDVSEYTRIS	KEEMRQLGK	DWIEHGEVVV	100
		110	120	130	140	150	
2H4 .AMI	101	TPGFRLLP--	ASHVIHTVGP	-IY-DVDSNP	AASLRGSYRN	SLHVAKDNNI	150
ATHAL .AMI	101	TPGFNLLP--	ASRVIHTVGP	-IY-DSVNP	QESLTNSVKN	SLRVAKENNI	150
CELEG .AMI	101	TSGCNLH--	IKKIHTVGP	QVYGNVTDER	RENLVACYRT	SLDIATENGGM	150
ECOLI .AMI	101	TLAGDLP--	AKAVVHTVGP	-VWRGGEONE	DQLLQDAYLN	SLRLVAANSY	150
REUTR .AMI	101	TTGGHLLP--	APYVIHAVGP	-VWQGGDQGE	DELLANAYRN	SIRLAAQHLL	150
PHORIKOS .AMI	101	TPPMKLEKNG	VKYVIHTVGP	YCCGVWSKDK	EEKLKLALIG	ALKKADLEGV	150
		160	170	180	190	200	
2H4 .AMI	151	KFIAPPAISC	GVYGYPYGEA	ATLAISTVKE	YANGLNEV-H	FVLFEE----	200
ATHAL .AMI	151	KYIAPPAISC	GIYGYPFDEA	AAIGISTIKQ	FSTDFKEV-K	ISFSCLE----	200
CELEG .AMI	151	KSIAPCCIST	GVYGYPNDDA	AKVTINFLTE	YLEKNDTIER	IVLVTFLLDID	200
ECOLI .AMI	151	TSVAFPAIST	GVYGYPRAAA	AEIAVKTIVSE	FITERHALPEQ	VYFVQY---D	200
REUTR .AMI	151	RRLAFPNIST	GIYAFPRERA	ADIALAAVRE	ALAAAPFIEQ	VTFVQY---D	200
PHORIKOS .AMI	151	KSIAPPAISA	GIYGCPLKEV	VRTFKEVKE	FLKVVANVKE	VYLVLY---S	200
		210	220	230	240	250	
2H4 .AMI	201	---SVYNVV	LSKANELLQT	*.....	250
ATHAL .AMI	201	---DCCTSR	*	250
CELEG .AMI	201	NEHYNKYFGD	YAASKDQSIA	*.....	250
ECOLI .AMI	201	ENAHLY-ER	LLTQQGDE*	250
REUTR .AMI	201	DENYRLYRER	LS*.....	250
PHORIKOS .AMI	201	ERDYKLALET	IGLGDNDESR	*.....	250

Abb. 20: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des cDNA-Klons 2H4 mit Homologen aus verschiedenen Organismen.

Das Alignment wurde mit dem Programm DNASIS erstellt. Unterlegte Bereiche symbolisieren identische Aminosäuren, Striche symbolisieren Lücken. Die mit Hilfe einer "blast"-Suche identifizierten Homologen haben die folgenden Genbank-Zugangsnummern: ATHAL aus *Arabidopsis thaliana* AAB87596, CELEG aus *Caenorhabditis elegans* CAA97408, ECOLI aus *Escherichia coli* AAC74129, REUTR aus *Ralstonia eutropha* I39569, PHORIKOS aus *Pyrococcus horikoshii* BAA30621.

3.6 Transiente Überexpression von *MPK1, 2, 3* und *4* in Petersilieprotoplasten

Um die Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktion und der Aktivierung von Abwehrgenen zu charakterisieren, war es von zentraler Bedeutung, in einem *loss-of-function*-Ansatz die Signaltransduktion an der Stelle der MAPK-Aktivierung zu unterbrechen. Das Petersiliesystem ist jedoch einer genetischen Bearbeitung unzugänglich, und anders als z. B. in Arabidopsis ist es unmöglich, Insertionsmutanten für interessierende Gene zu isolieren. Ein "Antisense"-Ansatz in stabil transformierten Zellkulturen ist aufgrund der hohen Homologie zwischen den einzelnen Petersilie-MAPK sehr unspezifisch. Ein großer Vorteil des Petersiliesystems ist jedoch, daß die Petersiliezellen auch nach Protoplastierung elicitorresponsiv sind und die Protoplasten sich durch Elektroporation oder PEG/Ca²⁺-vermittelten DNA-Transfer transient transformieren lassen. Dies ist in der Vergangenheit vor allem für die detaillierte Analyse von elicitor- und lichtresponsiven Promotoren und Transkriptionsfaktoren genutzt worden (Schulze-Leffert *et al.*, 1989; van de Löcht, 1990; Weisshaar *et al.*, 1991; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Feldbrügge *et al.*, 1994; Korfhage *et al.*, 1994; Rushton *et al.*, 1996).

Die Möglichkeiten des Petersilieprotoplastensystems wurden genutzt, indem in Kotransformationsexperimenten der Einfluß der Überexpression aktiver und inaktiver MAPK-Konstrukte auf die Aktivierung elicitorresponsiver Promotorfragmente der Petersiliegene *PR1.1* (Rushton *et al.*, 1996) und *PR2* (van de Löcht, 1990) untersucht wurde. Derartige Experimente mit dominant negativ interferierenden Mutanten von MAPK-Kaskadekomponenten haben vor allem in Hefe und in Säugerzellkulturen wichtige Aufschlüsse über die MAPK-Kaskaden geliefert (Cowley *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994; Madhani *et al.*, 1997).

3.6.1 Konstrukte zur Überexpression aktiver und inaktiver MAPK-Varianten

Für diese Überexpressionsversuche wurden durch Punktmutagenese folgende MAPK-Varianten geschaffen (Tab. 16):

1. Durch Austausch eines Lysins gegen ein Arginin in der ATP-Bindungstasche in Subdomäne II wurde eine kinaseinaktive Version hergestellt (Robbins *et al.*, 1993).
2. Durch Austausch eines Tyrosins gegen ein Phenylalanin auf der Aktivierungsschleife wurden nicht aktivierbare Formen hergestellt (Robbins *et al.*, 1993).
3. Durch Austausch eines Aspartats gegen ein Asparagin im C-Terminus wurden Kinasen mit voraussichtlich stark reduzierter Affinität zu MPK3-ähnlichen Phosphatasen hergestellt. Diese Varianten bleiben nach Phosphorylierung länger aktiv, da die Dephosphorylierung und damit die Deaktivierung drastisch verzögert ist (Brunner *et al.*, 1994; Camps *et al.*, 1998).

Die offenen Leserahmen der unmodifizierten und modifizierten Kinasen wurden in die pflanzlichen Expressionsvektoren pBT4 (Feldbrügge *et al.*, 1994) oder pRT100 (Töpfer

et al., 1987) kloniert, die beide den CaMV-35S-Promotor tragen, der eine starke konstitutive Expression in Pflanzen vermittelt.

Tab. 16: MAPK-Konstrukte für die transiente Überexpression

Kinase	Mutation	Plasmid-Bezeichnung	Bemerkung
MPK1	-	pBTM1.1	alle mit C-terminalem HA-Epitop
	K72R	pBTM1.2	
	D337N	pBTM1.3	
MPK2	-	pBTM2.1	-
	Y198F	pBTM2.2	
	D336N	pBTM2.3	
MPK3	-	pBTM3.1	-
	Y214F	pBTM3.2	
	D348N	pBTM3.3	
MPK4	-	pRT4.1	-
	Y200F	pRT4.2	

3.6.2 Akkumulation von MPK1:HA in transient transformierten Petersilieprotoplasten

In Vorversuchen sollte sichergestellt werden, ob und mit welchem Zeitverlauf die MAPKs in den transformierten Protoplasten akkumulieren. Da angenommen wurde, daß nur 10-20% der Protoplasten transformiert werden, war es wünschenswert, selektiv das Produkt des Transgens nachweisen zu können. Deshalb wurde pBTM1.1 so konstruiert, daß das entstehende MPK1 C-terminal mit einem HA-Epitop fusioniert und somit mit monoklonalen HA-Antikörpern immunologisch nachweisbar war. Die anderen Konstrukte wurden ohne HA-Epitop kloniert, um die Struktur der Kinasen und damit ihre Funktion möglichst wenig zu modifizieren.

Protoplasten wurden in der Folge mit pBTM1.1 oder pRT-100 transformiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transformation geerntet. Daraus hergestellte Proteinextrakte wurden auf Westernblots mit HA-Antikörpern analysiert. In untransformierten Protoplasten, in pRT100-transformierten Protoplasten und bis zu 4 h nach Transformation mit pBTM1.1 war kein MPK1:HA nachweisbar (Abb. 21). Erst 8 h nach Transformation war eine starke Bande bei 44 kDa sichtbar, was auf das Vorliegen signifikanter Mengen von MPK1 schließen ließ. Bis zu 48 h nach Transformation nahm die Proteinmenge leicht zu.

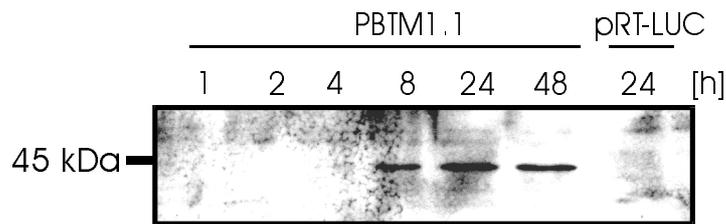


Abb. 21: Kinetik der Akkumulation von MPK1:HA in pBTM1.1-transformierten Petersilieprotoplasten. Petersilieprotoplasten wurden mit pBTM1.1 oder pRT-LUC transformiert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transformation geerntet. Daraus hergestellter Proteingestamtextrakt (10 µg/ Spur) wurde mittels SDS/PAGE aufgetrennt, auf Nitrocellulose transferiert und mit monoklonalen HA-Antikörpern analysiert.

3.6.3 Kotransformationsexperimente mit MAPK-Varianten

In den daraufhin durchgeführten Kotransformationsexperimenten wurden durch PEG/Ca²⁺-Transformation die verschiedenen MAPK-Effektorkonstrukte zusammen mit einem Reporterplasmid und einem Normierungsplasmid in die Protoplasten kotransformiert (Abb. 22). In den Kontrollen wurde leerer pRT100-Vektor mit Reporter- und Normierungskonstrukt kotransformiert. Als Reporterstrukturen wurden die Plasmide PR1.1-GUS oder PR2-GUS benutzt, die die elicitorresponsiven Promotorbereiche der Petersiliengene PR1.1 bzw. PR2 vor dem Reporter gen β -Glucuronidase (GUS) tragen (van de Löcht, 1990; Rushton, 1996). Zur Normierung der GUS-Reporteraktivität wurde das Normierungsplasmid pRT-LUC benutzt, das für die "Firefly"-Luziferase (LUC) kodiert und den konstitutiven CaMV-35S-Promotor trägt. Die einzelnen Transformationsansätze wurden geteilt und nach 8 h entweder mit Wasser oder mit Elicitor versetzt. 14 h nach Beginn der Elicitorbehandlung wurden die Protoplasten geerntet und in daraus hergestellten Proteinextrakten die GUS- und LUC-Aktivität bestimmt. In den einzelnen Experimenten wurden für jedes Konstrukt vier oder fünf parallele Transformationen durchgeführt und die erhaltenen normierten GUS-Aktivitäten gemittelt.

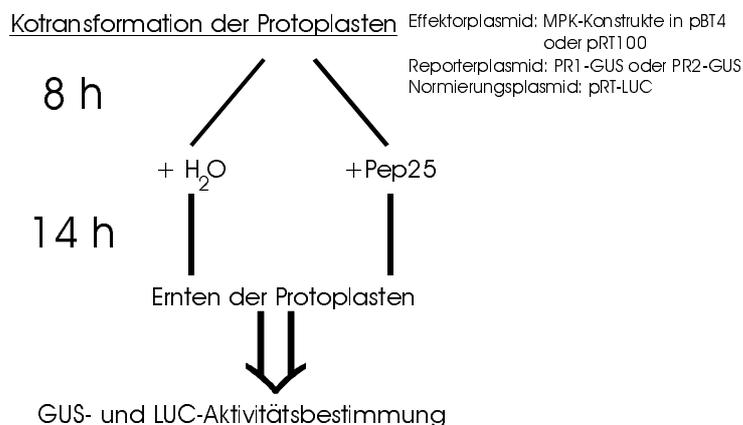


Abb. 22: Schema zum Aufbau der Überexpressionsexperimente.

Wie erwartet, wurde in den Kontrollen bei Verwendung von PR1.1-GUS und PR2-GUS nach Elicitierung ein starker Anstieg der GUS-Aktivität gefunden. Im Vergleich zu den nicht elicitierten Proben stieg die normierte GUS-Aktivität in den elicitierten Proben bei Benutzung von PR1.1-GUS um das 5-10fache an, bei Benutzung von PR2-GUS um das 15-25fache (Abb23). Dabei ist anzumerken, daß die Variabilität zwischen einzelnen Experimenten besonders in Bezug auf die Absolutwerte der gemessenen GUS- und LUC-Aktivitäten beträchtlich war. Auch der Einfluß der Überexpression einzelner Konstrukte auf die Reporterogenaktivierung variierte z. T. stark zwischen den verschiedenen Experimenten. Allgemeine Aussagen basieren deshalb auf dem Vergleich mehrerer Einzelexperimente.

Überexpression von MPK3 und MPK3^{Y214F} (der unmodifizierten und der nicht aktivierbaren Form von MPK3) hatte nur einen geringen Einfluß auf die GUS-Aktivität in den nicht elicitierten Proben - der elicitierungsbedingte Anstieg der Reporterogenaktivität wurde jedoch stark reduziert (Abb. 23). So wurde die GUS-Aktivität in den elicitierten Proben im Vergleich zu den Kontrollen durch MPK3-Überexpression um das 2-3fache verringert, durch MPK3^{Y348F}-Überexpression um das 4-6fache. Im Gegensatz dazu wurde die Elicitorresponsivität der Protoplasten durch MPK3^{D348N}-Überexpression nicht beeinträchtigt. Nach Elicitierung wurde in den MPK3^{D348N}-überexprimierenden Protoplasten genau so hohe GUS-Aktivität gefunden wie in den elicitierten Kontrollen. Damit war die Elicitorresponsivität in Protoplasten, die MPK3^{D348N}-überexprimierten um ein Vielfaches größer als in den MPK3- und MPK3^{Y214F}-überexprimierenden Proben.

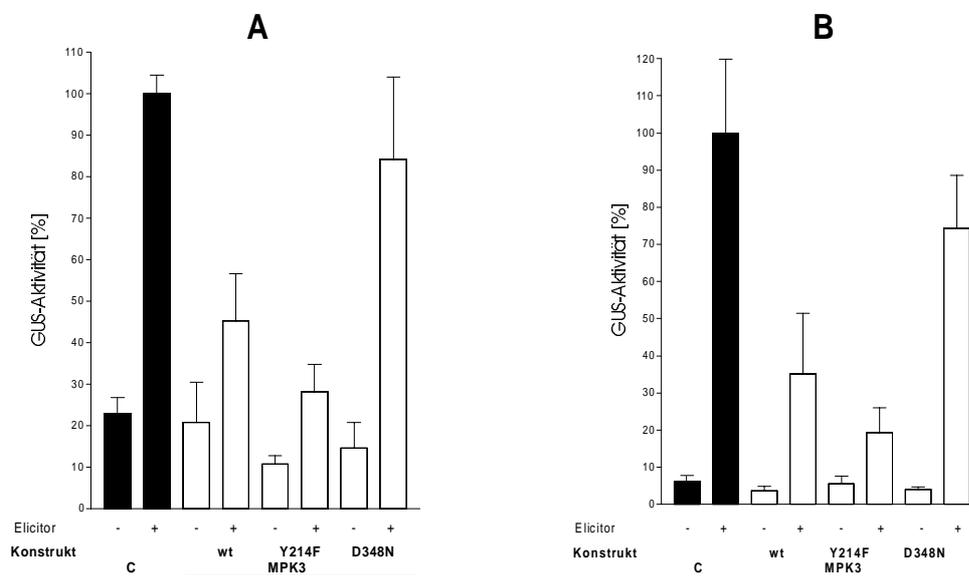


Abb. 23: Einfluß überexprimierter MPK3, MPK3^{Y214F} und MPK3^{D348N} auf die Aktivierung der *PR1.1*- (A) und *PR2*-Promotorfragmente (B) durch Elicitierung.

Petersilieprotoplasten wurden mit dem Normierungsplasmid RT100, einem Effektorplasmid (pBTM1.1, 2 oder 3) und dem Reporterplasmid PR1.1-GUS (A) oder PR2-GUS (B) cotransformiert. Die ermittelte GUS-Aktivität wurde durch die LUC-Aktivität geteilt und, da für jedes Effektorplasmid 4-5 parallele Transformationen durchgeführt wurden, der Mittelwert und die Standardabweichung aus den Parallelen gebildet. Die normierte GUS-Aktivität der elicitorbehandelten Kontrolle wurde gleich 100 gesetzt.

Auch die Überexpression von MPK1, MPK1^{K72R}, MPK2 und MPK2^{Y198F} führte zu einer signifikanten Reduktion der Reporterogenaktivität in den elicitierten Proben (Abb. 24). Diese Verringerung war jedoch deutlich geringer als bei Überexpression der entsprechenden MPK3-Varianten. Dies gilt besonders im Vergleich der inaktiven Versionen. MPK3^{Y214F}-Überexpression reduzierte die Reporterogenaktivierung um das 4-6fache, während MPK1^{K72R}- und MPK2^{Y198F}-Überexpression nur eine 2-3fache Reduktion bewirkten. Dahingegen hatte die Überexpression von MPK1^{D337N} und MPK2^{D336N} keinen negativen Einfluß auf die elicitierungsbedingte Reporterogenaktivierung. Ebenso wie bei MPK3^{D487N}-Überexpression entsprachen bei MPK1^{D337N}- und MPK2^{D336N}-Überexpression die GUS-Aktivitäten in den elicitierten Proben denjenigen in den elicitorbehandelten Kontrollen (nicht gezeigt). Auch die Überexpression von MPK4 und MPK4^{Y200F} reduzierte im Vergleich zu den Kontrollen die Reporterogenexpression nach Elicitierung nicht signifikant.

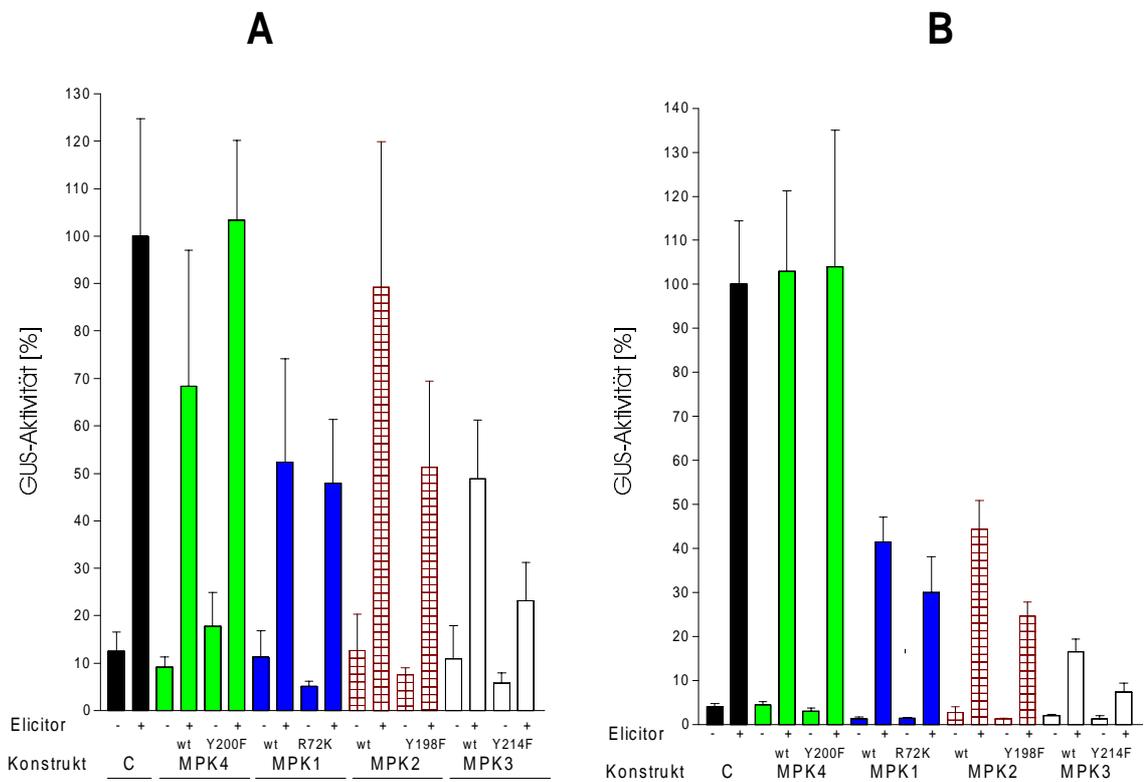


Abb. 24: Auswirkung der Überexpression unmodifizierter und inaktiver MAPKs auf die Reporterogenaktivierung in den Kotransformationsexperimenten mit PR1.1-GUS (A) und PR2-GUS (B). In Kotransformationsexperimenten mit PR1.1-GUS (A) oder PR2-GUS (B) als Reporterplasmid wurden die Effektorplasmide pBTM1.1 und 2, pBTM2.1 und 2, pBTM3.1 und 2 und pBTM4.1 und 2 getestet (Durchführung und Auswertung wie in Abb. 23).

3.6.4 Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante der humanen MEK1

Weil keine konstitutiv aktiven Formen der MAPKs durch Punktmutationen oder Deletionen generiert werden können (Cobb und Goldsmith, 1995; Canagarajah *et al.*, 1997) und da die für die Aktivierung der einzelnen Pflanzen-MAPKs verantwortlichen MKKs oder MKKKs nicht bekannt sind, wurde eine konstitutiv aktive Form der humanen MKK MEK1 (Mansour *et al.*, 1994) in das Plasmid pRT100 kloniert. Dieses Konstrukt wurde alleine oder gemeinsam mit pBTM3.1 oder pBTM3.2 im transienten System getestet. Weder alleine noch in Kombination mit MPK3-Überexpression löste die Überexpression der konstitutiv aktiven MEK1 elicitorunabhängige Aktivierung der GUS-Expression oder Phytoalexinproduktion in den Protoplasten aus (nicht gezeigt).

4 Diskussion

Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen sind zentrale Mechanismen in der eukaryotischen Signaltransduktion. In Pilz- und Tiersystemen ist gezeigt worden, daß die daran beteiligten Proteinkinasen wichtige Regulatoren in den meisten Adaptations- und Entwicklungsprozessen sind. In vielen Signalwegen sind die entsprechenden Kinasen kloniert und pharmakologisch, biochemisch und genetisch eingehend charakterisiert worden.

In Pflanzen ist die Situation grundlegend anders. Zwar wird davon ausgegangen, daß wie in anderen Eukaryoten ca. 2% der pflanzlichen Gene für Proteinkinasen kodieren (Stone und Walker, 1995; Hunter und Plowman, 1997), abgesehen von einigen gut untersuchten Vertretern ist über sie jedoch wenig bekannt. Mittlerweile ist eine Vielzahl von pflanzlichen Proteinkinasen kloniert worden, doch die Signalwege, in denen sie wirken, und ihre Regulatoren und Substrate müssen vielfach erst noch identifiziert werden. Es ist allerdings deutlich, daß die Proteinkinasen auch in Pflanzen wichtige Regulatoren in fast allen Lebensprozessen sind, z. B. der Regulation des Primär- und Sekundärstoffwechsels, der Zellzyklusregulation, der vegetativen Entwicklung und der Licht- und Stressignaltransduktion (Martin *et al.*, 1993; Kieber *et al.*, 1993; Stone und Walker, 1995; Clark *et al.*, 1997; MacKintosh, 1998; Lee *et al.*, 1999; Frankhauser *et al.*, 1999)

4.1 Die Aktivierung von MAPKs in der pflanzlichen Pathogenabwehr

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Petersilie zum ersten Mal die rezeptorvermittelte Aktivierung pflanzlicher MAPKs gezeigt werden. Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern und In-Gel-MBP-Kinase-Versuche zeigten übereinstimmend die schnelle und transiente Aktivierung von 3 MAPKs der Größen 40, 44 und 46 kDa in elicitorbehandelten Petersiliezellen. Während in anderen pflanzlichen Zellsuspensionskulturen die Grundaktivität einzelner MAPKs aufgrund der durch das Schütteln verursachten mechanischen Reizung vergleichsweise hoch ist (Bögre *et al.*, 1996), war in den unbehandelten Petersiliezellen keine MAPK-Aktivität nachweisbar. Die posttranslationale Modifikation der Kinasen durch Phosphorylierung des TEY-Motifs auf der MAPK-Aktivierungsschleife erfolgte innerhalb von 5 min nach Elicitorzugabe und ging mit der Aktivierung der Enzymaktivität einher. Das Aktivitätsmaximum wurde 5-10 min nach Elicitierung erreicht, danach setzte die Deaktivierung und Dephosphorylierung der Kinasen ein. Die Aktivierung der 40- und der 46-kDa-Kinase hielt jedoch auf niedrigerem Niveau für einige Stunden an, während die 44-kDa-Kinase bereits nach 30 min vollständig inaktiviert war.

Das Muster der elicitorinduzierten MAPK-Aktivierung in Petersilie gleicht demjenigen, das nach Elicitierung von Tabakzellsuspensionskulturen gefunden wurde. Cf9-exprimierende Tabakzellen, die mit avr9 behandelt wurden, und Tabakzellen, die mit

einer Zellwandpräparation von *Phytophthora parasitica* elicitiert wurden, zeigten übereinstimmend die schnelle und transiente Aktivierung einer 44- und einer 48-kDa MAPK (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Durch immunologische Studien konnte gezeigt werden, daß es sich bei der 48-kDa-MAPK um SIPK (salicylate-induced protein kinase) und bei der 44-kDa-MAPK um WIPK (wound-induced protein kinase) handelte (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Auch hier wurde die 48-kDa-MAPK viel stärker aktiviert und zeigte bis zu 4 h nach Elicitorzugabe eine erhöhte Aktivität, während die 44-kDa-MAPK eine geringere Aktivität hatte und schneller deaktiviert wurde (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Ein vergleichbares Induktionsmuster wurde auch in Tabakpflanzen nach Infiltration der Blätter mit den gleichen Elicitoren gefunden (Zhang *et al.*, 1998, Romeis *et al.*, 1999). In diesen Infiltrationsexperimenten war neben der lang anhaltenden Aktivierung, die auf die Elicitoren zurückzuführen ist, jedoch auch eine viel transientere, nur einige Minuten andauernde Wundaktivierung der gleichen Kinasen zu beobachten (Zhang und Klessig, 1998a; Romeis *et al.*, 1999). Offensichtlich sind die 44- und die 48-kDa-MAPK auch durch Verwundung induzierbar, sie werden jedoch innerhalb von 15-30 min vollständig deaktiviert (Usami *et al.*, 1995; Zhang und Klessig, 1998a; Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). Verschiedene Autoren berichten allerdings, daß sie nach Verwundung jeweils nur eine der beiden Kinasen (WIPK oder SIPK) detektieren konnten (Usami *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 1995; Klessig und Zhu, 1998a; Seo *et al.*, 1999). Vermutlich ist dies auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bei den Proteinextraktionen, den In-Gel-MBP-Kinaseversuchen und den Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten zurückzuführen. Denn in Tabak (Romeis *et al.*, 1999) und Medikago (W. Ligterink und H. Hirt, persönliche Mitteilung) wurde unter geeigneten Bedingungen die transiente Wundaktivierung der 44- und der 48-kDa-MAPK gefunden.

Auch nach Infektion von Tabakpflanzen mit Tabak-Mosaik-Virus (TMV) wird eine R-Gen-abhängige Aktivierung der 44- und der 48-kDa-MAPKs gefunden (Zhang und Klessig, 1998b). Abgesehen von einer verzögerten Kinetik unterscheidet sich die Aktivierung der Kinasen dadurch, daß die posttranslationale Aktivierung der 44-kDa-WIPK durch Phosphorylierung durch ihre transkriptionelle Aktivierung und die Akkumulation des Proteins begleitet wird. In unbehandelten Tabakpflanzen wurde von den Autoren kein WIPK-Protein detektiert (Zhang und Klessig, 1998b). Dies steht in gewisser Diskrepanz zu anderen Arbeiten (Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). Hier wurde auch in unbehandelten Tabakpflanzen WIPK-Protein nachgewiesen; nach Elicitierung und Verwundung blieb das Protein-Niveau konstant.

Die Aktivierung einer 40-kDa-MAPK wird in den besprochenen Elicitor- oder Wundexperimenten nicht beschrieben, was vermutlich an der geringen Aktivität dieser Kinase im In-Gel-Nachweis liegt. Interessanterweise wird jedoch nach Behandlung von Tabakzellen mit Elicitinen, die außer der Aktivierung von Abwehrantworten auch Zelltod auslösen, neben der 44- und der 48-kDa-Kinase auch eine 40-kDa-MBP-Kinase aktiviert (Zhang *et al.*, 1998). Die Aktivierungskinetik der MAPKs nach Elicitinbehandlung unterscheidet sich grundsätzlich von der, die in den anderen Elicitorexperimenten gefunden wurde. Die 48-kDa-MAPK wird innerhalb von 5 min aktiviert und diese Aktivität bleibt bis zum Einsetzen des Zelltods nach ca. 4 h konstant hoch. Die

Aktivierung der 40- und der 44-kDa-Kinase erfolgt verzögert. Erst nach 15-60 min sind diese Kinaseaktivitäten nachweisbar und ihre Aktivität nimmt bis zum Einsetzen des Zelltods zu (Zhang *et al.*, 1998).

Während sich die Aktivierungsprofile der 44- und 46-kDa-MAPK in den In-Gel- und den Westernblot-Versuchen entsprechen, fällt bei der 40-kDa-MAPK der Unterschied zwischen der geringen Aktivität im In-Gel-Versuch und den deutlichen Signalen im Westernblot auf. Da auch bei Verwendung von Extrakten, die unter denaturierenden Bedingungen erhalten wurden, ein ebenso starkes Signal in den Westernblots gefunden wurde, ist auszuschließen, daß es sich bei der 40-kDa-Bande um ein nach der Extraktion entstandenes, wenig kinaseaktives Abbauprodukt einer elicitorresponsiven MAPK handelt. Obwohl die Kinase offensichtlich das TEY-Motiv enthält, deutet die geringe Aktivität in den In-Gel-Versuchen darauf hin, daß sie nicht so effizient renaturiert oder das MBP schlechter als Substrat akzeptiert. Ein weiterer Unterschied zu den bisher charakterisierten MAPKs aus Pflanzen ist die geringe Größe, die mindestens 2 kDa unter derjenigen der bisher klonierten oder detektierten pflanzlichen MAPKs liegt (Jonak *et al.*, 1998). Möglicherweise handelt es sich bei der 40-kDa-MAPK deshalb um einen Vertreter einer neuen Unterfamilie pflanzlicher MAPKs. Auch in Hefen und in Tieren wurden verschiedene MAPK-Unterfamilien mit deutlich unterschiedlichen Substratspezifitäten gefunden (Cano und Mahadevan, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Neben den zuerst identifizierten ERKs (extracellular signal-regulated kinase), denen die bisher klonierten pflanzlichen MAPKs am stärksten gleichen, existieren in Säugern die p38- und die JUN-(c-JUN N-terminal-protein) Kinaseunterfamilie (Lewis *et al.*, 1998), die anstelle des Glutamats im TEY-Motiv ein Glycin bzw. ein Prolin besitzen. Obwohl bisher keine pflanzlichen p38- oder JNK-Homologe beschrieben wurden, deuten die Westernblot-Experimente auf das Vorkommen zusätzlicher MAPK-Unterfamilien in Pflanzen hin.

Die unterschiedlichen Aktivierungsprofile der MAPKs nach den verschiedenen Stimuli (verschiedene Elicitoren, Verwundung, Infektion) lassen vermuten, daß für die Signalspezifität der pflanzlichen MAPK-Kaskaden nicht nur entscheidend ist, welche verschiedenen MAPK-Isoformen aktiviert werden, sondern auch wie lange ihre Aktivierung andauert. Denn vor allem wenn einzelne Signalkomponenten in verschiedenen Signalwegen aktiviert werden, kann ihr zeitliches Aktivierungsprofil Signalspezifität vermitteln und die Antwort des Systems determinieren. Die Bedeutung der Dauer der MAPK-Aktivierung für die Antwort einer Zelle auf einen gegebenen Stimulus wurde vor allem durch Arbeiten über die ERK1/2-Kinase in menschlichen Zellkulturen deutlich (Marshall, 1995; Cobb, 1999). So ist in der neuronalen Zelllinie P12 eine langandauernde Aktivierung von ERK1/2 notwendig und hinreichend für die Auslösung eines Differenzierungsprozesses und einen Arrest im Zellzyklus, während eine transiente Aktivierung der ERKs zu Zellproliferation führt (Traverse *et al.*, 1992; Heasley und Johnson, 1992; Cowley *et al.*, 1994; Traverse *et al.*, 1994). Wahrscheinlich bestimmt das ERK2-Aktivierungsprofil, wie effizient und langanhaltend einzelne Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die für die Auslösung des Differenzierungsprozesses benötigt werden (Marshall, 1995).

Über den Prozeß, der zur Deaktivierung der elicitorresponsiven MAPKs in Petersilie führt, ist wenig bekannt. Die Korrelation der MAPK-Aktivität mit der Phosphorylierung des TEY-Motivs deutet allerdings darauf hin, daß die elicitorresponsiven MAPKs ebenso wie MAPKs in Hefe- oder Säugerzellen durch spezifische Proteinphosphatasen dephosphoryliert und inaktiviert werden (Keyse, 1998). Möglicherweise werden diese Phosphatasen ebenso wie in anderen Systemen transkriptionell aktiviert (Ward *et al.*, 1994; Millar *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1997), denn in Medicago und Tabak wurde gefunden, daß für die Deaktivierung einer wundresponsiven MAPK die Transkription und Translation eines deaktivierenden Proteins, wahrscheinlich einer Proteinphosphatase, notwendig ist (Usami *et al.*, 1994; Bögre *et al.*, 1997). In Medicago wurde zudem gezeigt, daß die Deaktivierung der wundresponsiven MAPK MMK4 von der Transkription und Translation einer Proteinphosphatase 2C (MP2C) begleitet wird (Meskiene *et al.*, 1998). MP2C interferiert in Hefe negativ mit der MAPK-Kaskade des Pheromonsignalwegs, und die Zugabe von rekombinantem MP2C zu Proteinextrakten verwundeter Medicagoblätter führt zur Deaktivierung der wundresponsiven MMK4 (Meskiene *et al.*, 1998). Welche Kinasen der MMK4-Kaskade MP2C *in vivo* dephosphoryliert, ist jedoch noch nicht bekannt.

4.2 Die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ist ein rezeptorvermittelter Prozeß

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, daß die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ein rezeptorvermittelter Prozeß ist. Durch die Verwendung aktiver und inaktiver Pep13-Analoga konnte demonstriert werden, daß die MAPK-Aktivierung durch die Bindung des Pep13-Peptids an den plasmamembranständigen Pep13-Rezeptor ausgelöst wird. Obwohl die Natur des Pep13-Rezeptors noch unbekannt ist und die Kette von Signalschritten, die zur MAPK-Aktivierung und zur Auslösung der anderen Elicitorantworten führt, nur sehr unvollständig charakterisiert ist, ist die elicitorvermittelte Aktivierung der MAPKs ein eindringliches Beispiel für die Konservierung von Signalketten in Eukaryoten.

Vergleichbare, durch Peptidsignale aktivierte MAPK-Signalwege wurden in vielen Organismen beschrieben. Die am besten untersuchte Signalkaskade ist der Pheromon-Signalweg in Hefe. Nach Bindung eines Peptidpheromons an einen G-Proteingekoppelten Rezeptor wird durch wenige Signalschritte eine MAPK-Kaskade aktiviert, an deren Ende FUS3-Aktivierung steht (Herscowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Diese MAPK modifiziert Cytoskelettkomponenten und Regulatoren der Transkription und löst letztendlich die Fusion haploider Hefezellen aus. In Säugern führt die Bindung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, bei denen es sich ebenfalls um Peptide handelt, an Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung von ERK1 und 2. Diese MAPKs modifizieren eine Vielzahl von Substraten (z. B. Transkriptionsfaktoren aktivieren) und lösen so Differenzierung oder Proliferation aus (Robinson und Cobb., 1997; Lewis *et al.*, 1998 ; Cobb, 1999).

4.3 Einordnung der elicitorresponsiven MAPKs in die Elicitorsignalkette

Die *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Experimente mit A9C und Amphotericin B zeigen deutlich, daß die Aktivierung der MAPKs in der Elicitorsignalkette unterhalb des Anstiegs der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und der elicitorstimulierten Ionenflüsse liegt und kausal mit diesen verknüpft ist. Welche Signalschritte zwischen den Ionenflüssen und der Aktivierung der MAPK-Kaskaden liegen, ist allerdings vollkommen unbekannt. Da die MAPKs eindeutig unterhalb der elicitorstimulierten Ionenflüsse lokalisiert sind, müssen die Angaben von Zhang *et al.* (1998) über die Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktionskette, die aus Inhibitorexperimenten mit Staurosporin und K252a abgeleitet worden sind, in Zweifel gezogen werden. Die Autoren fanden, daß Staurosporin und K252a in Tabakzellen die Aktivierung der MAPKs, die Alkalinisierung des Kulturmediums und die *PAL*-Transkription nach Elicitorbehandlung blockierten, und schlußfolgerten daraus, daß die MAPK-Aktivierung notwendig für die Protonenaufnahme und die *PAL*-Expression ist (Zhang *et al.*, 1998). Da K252a und Staurosporin eine sehr früh aktivierte Kinase inhibieren, die bereits an der Auslösung der elicitorstimulierten Ionenflüsse beteiligt ist (Grosskopf *et al.*, 1990; Conrath *et al.*, 1991; Viard *et al.*, 1994), ist die Inhibition der MAPK-Aktivierung als ein sekundärer Effekt anzusehen. Folglich lassen sich aus diesen Experimenten keine spezifischen Funktionen der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktion ableiten.

Die Beobachtung, daß die Inhibierung des "oxidative burst" durch DPI die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs nicht blockiert, wirft die Frage auf, ob die MAPKs oberhalb des "oxidative burst" wirken oder in einem parallelen Signalweg lokalisiert sind. Experimente in Tabakzellkulturen, in denen gezeigt wurde, daß der MEK1-Inhibitor PD 098059 (Alessi *et al.*, 1995) zwar die Aktivierung der MAPKs, nicht aber die Produktion von ROS inhibiert (Romeis *et al.*, 1999), sprechen für eine Rolle der MAPKs in einem "oxidative burst"-unabhängigen Signalweg. Daß ein derartiger Signalweg in *Petersilie* existieren muß, wird durch die Tatsache deutlich, daß die Expression des Transkriptionsfaktors WRKY1, dessen Transkript bereits 15 min nach Elicitorapplikation detektierbar ist (Rushton *et al.*, 1996), durch DPI nicht inhibiert wird (T. Eulgem, persönliche Mitteilung). In Zukunft wird es deshalb von besonderem Interesse sein, mit Hilfe des Inhibitors DPI und des Effektors KO_2 (Jabs *et al.*, 1997) festzustellen, welche der elicitorresponsiven *Petersilie*gene durch den "oxidative burst" reguliert werden und welche nicht. Da die momentan verfügbaren spezifischen Inhibitoren der MAPK-Kaskade in *Petersilie*zellen unwirksam sind, lassen sich bezüglich der MAPKs zur Zeit keine vergleichbaren Experimente durchführen (vgl. 4.8).

4.4 Die Genfamilie der MAPKs in *Petersilie*

Die bisher klonierten pflanzlichen MAPK-cDNAs lassen sich aufgrund der Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen in 4 Gruppen einteilen (Mizoguchi *et al.*, 1997; Jonak *et al.*, 1999). Vermutlich spiegelt die Zugehörigkeit zur gleichen Gruppe gleiche

Funktionen der jeweiligen Kinasen in den unterschiedlichen Spezies wieder, bisher konnte allerdings für keine dieser Kinasen eine definierte Signalfunktion oder ein relevantes endogenes Substrat bestimmt werden. Für einige der pflanzlichen MAPKs wurde jedoch die posttranslationale und teilweise auch die transkriptionelle Aktivierung nach verschiedenen Stimuli und in verschiedenen Entwicklungsprozessen gezeigt. Dazu gehören u. a. Verwundung, Trockenheit, Phytohormone, Mitose und Pathogeninfektion (Mizoguchi *et al.*, 1997; Hirt, 1997; Jonak *et al.*, 1999).

Auch in Petersilie konnten MAPKs aus allen 4 Gruppen nachgewiesen werden. MPK1 und 2 haben hohe Homologie zu Tabak-WIPK und Medicago-MMK4, für die u. a. Wund-, Kälte-, Berührungs- und Elicitorresponsivität beschrieben wurde (Jonak *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). MPK3 ist homolog zur Tabak-SIPK, die durch Verwundung, SA, Elicitoren und Pathogene aktiviert wird (Zhang und Klessig, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Zhang und Klessig, 1998a; Zhang und Klessig, 1998b), und zur Medicago-MMK1 (Jonak *et al.*, 1993), die wund- und elicitorresponsiv ist (W. Ligterink und H. Hirt, persönliche Mitteilung). Southernblot-Experimente deuten darauf hin, daß es noch mindestens ein zusätzliches MPK3-Homolog im Petersilienom gibt, während MPK1 und 2 die einzigen Vertreter ihrer Gruppe in Petersilie zu sein scheinen. MPK4 und 5 besitzen hohe Homologie zu NTF6 aus Tabak (Wilson *et al.*, 1995), MMK2 (Jonak *et al.*, 1995) und MMK3 (Bögre *et al.*, 1999) aus Medicago und MPK4 und 5 (Mizoguchi *et al.*, 1993) aus Arabidopsis. Während für MMK3 und NTF6 Aktivierung innerhalb der Mitose beschrieben wurde (Calderini, 1998 ;Bögre *et al.*, 1999), sind für die anderen Kinasen dieser Gruppe keine aktivierenden Stimuli bekannt. Aus der vierten Gruppe von pflanzlichen MAPKs (Mizoguchi *et al.*, 1994; Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995) ist bisher kein Petersilieklon isoliert worden. PCR-Experimente mit cDNA und genomischer DNA aus Petersilie zeigen jedoch, daß es auch MAPKs dieser Gruppe im Petersilienom gibt (A. Zunker und A. Neininger, persönliche Mitteilung). Welche Bedingungen zur Aktivierung dieser Kinasen führen, ist unbekannt. Der in Kapitel 4.1 diskutierte Vergleich der Ergebnisse der In-Gel-Versuche und der Westernblots mit den anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern und die Situation in anderen Eukaryoten deuten darauf hin, daß es neben den bisher bekannten MAPKs in Pflanzen noch zusätzliche MAPK-Unterfamilien gibt.

In Zukunft wird es von großer Bedeutung sein, durch die Analyse transgener Pflanzen, die induzierbar konstitutiv aktive Komponenten der MAPK-Kaskaden exprimieren, und "knock out"-Mutanten die Signalfunktion der einzelnen MAPKs zu untersuchen. Interessanterweise besitzen Pflanzen Paare hoch homologer MAPKs, wie z. B. Petersilie MPK1 und 2 bzw. MPK4 und 5 und Arabidopsis MPK4 und 5. Es stellt sich die Frage, ob diese Kinasen differentiell reguliert werden oder redundante Funktionen haben. Untersuchungen in Hefe haben beispielsweise gezeigt, daß dort jeder MAPK ein bestimmter Signalweg und definierte Signalfunktionen zugeordnet werden können (Gustin *et al.*, 1998).

4.5 Immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven Kinasen

Durch die immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs wurden wichtige Informationen über die Aktivierung der klonierten Petersiliekinasen in der Elicitorantwort gewonnen. Ein zentrales Hilfsmittel waren dabei die bakteriell exprimierten MAPKs MPK1, 2, 3 und 4, mit deren Hilfe die Kreuzreaktion der verwendeten Seren bestimmt wurde. Zudem war von entscheidender Bedeutung, daß mit Peptiden aus heterologen Sequenzbereichen Antikörper generiert werden konnten, die trotz der großen Homologie der verschiedenen Petersilie-MAPKs spezifisch zwischen den einzelnen Kinasegruppen diskriminierten.

Durch die Experimente mit den Seren P37, P38 und M11 kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, daß MPK4 oder 5 durch Elicitierung aktiviert werden. Alle 3 Seren erkannten mit hoher Spezifität das rekombinante MPK4, fällten in Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten aber keine elicitorresponsive MBP-Kinaseaktivität. Es ist davon auszugehen, daß sich diese Ergebnisse auf MPK5 übertragen lassen, da sich der für die Antigenizität relevante Teil des C-Terminus von MPK5 nur in einer Aminosäure vom MPK4-C-Terminus unterscheidet. Zu dem für die Herstellung des M11-Serums verwendeten Peptid weisen der MPK4- und 5-C-Terminus sogar die gleiche Identität auf. Deshalb ist davon auszugehen, daß beide Kinasen gleich gut durch die M11-Antikörper detektiert werden. Die Homologen aus *Medicago* (MMK2 und MMK3) werden ebenfalls nicht durch Elicitierung (H. Hirt, persönliche Mitteilung) und auch nicht durch Verwundung (Bögre *et al.*, 1997) aktiviert und sind stattdessen möglicherweise in die Regulation der Zellwandsynthese involviert (Bögre *et al.*, 1999).

Die Experimente mit dem M7- und dem P82-Serum zeigen, daß MPK3 die elicitorresponsive 46-kDa-MAPK ist, die in den In-Gel-Versuchen und in Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern identifiziert wurde. Durch beide Seren wurde das 46-kDa-große rekombinante MPK3 und in Petersilieproteinextrakt ein einziges, ebenso großes Protein detektiert. Gleichzeitig wurde mit beiden Seren eine elicitorresponsive MBP-Kinase präzipitiert, die das gleiche Aktivierungsprofil wie die 46-kDa-Kinase aufwies. Aufgrund der hohen Spezifität des P82-Serums, das ausschließlich MPK3 erkennt, und der hohen Sequenzheterogenität im N-Terminus der pflanzlichen MAPKs kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß eine andere MAPK als MPK3 die elicitorresponsive 46-kDa-MAPK ist. Daß neben MPK3 noch eine zusätzliche 46-kDa-MAPK aktiviert wird, kann durch die durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber sehr unwahrscheinlich. Um Eindeutigkeit in dieser Frage zu schaffen, sollten Proteinextrakte nicht elicitierter und elicitierter Zellen mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Westernblot-Analyse mit den P82- und den anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern analysiert werden. Auch in anderen Pflanzen wird durch Elicitierung die Aktivität von MPK3-Homologen induziert. Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, werden die 48-kDa-SIPK aus Tabak (Zhang *et al.*, 1998) und MMK1 aus *Medicago* (H. Hirt und W.

Ligterink, persönliche Mitteilung) nach Elicitorbehandlung mit ähnlichem Aktivitätsprofil wie MPK3 aktiviert. Der Vergleich mit diesen Systemen läßt die Vermutung zu, daß MPK3 auch durch andere Streßformen, insbesondere durch Verwundung aktiviert wird. Spezifisch für die Elicitorantwort scheint aber die zuerst transiente und dann langanhaltende Aktivierung zu sein.

Das mit einem C-terminalen Peptid von MPK1 hergestellte Serum P97 detektierte mit hoher Spezifität MPK1, kreuzreagierte jedoch auch in geringem Maße mit MPK2. Da es in Immunpräzipitationsexperimenten keine MBP-Kinaseaktivität fällte, ist davon auszugehen, daß MPK1 entgegen unserer früheren Vermutung (Ligterink *et al.*, 1997) nicht elicitorresponsiv ist. Ob dahingegen MPK2 elicitorresponsiv ist, kann aufgrund der schlechten Erkennung durch das P97-Serum nicht beantwortet werden. Diese Frage soll jedoch in Zukunft untersucht werden, da die Homologen von MPK1 und 2 (WIPK bzw. MMK4) in Tabak- (Romeis *et al.*, 1999) und Medicago-Zellkulturen (Hirt und Ligterink, persönliche Mitteilung) durch Elicitierung aktiviert werden und die Identifizierung der elicitorresponsiven 44-kDa-MAPK in Petersilie noch aussteht. Um ein spezifisches Serum für die immunologische Charakterisierung von MPK2 herzustellen, sollte ein Peptid gewählt werden, das die letzten 10 C-terminalen Aminosäuren von MPK2 enthält. Dieses zeigt ausreichende Sequenzunterschiede zu den entsprechenden MPK1- und MPK3-Bereichen und verspricht die Produktion eines selektiven Serums.

4.6 Elicitorstimulierter Kerntransport von MPK3

In Hefen und in Tiersystemen sind MAPKs oft unmittelbar an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Diese Funktion an der Schnittstelle zwischen cytosolischer Signaltransduktion und transkriptioneller Kontrolle der Genexpression spiegelt sich in der Beobachtung wieder, daß verschiedene MAPKs nach Phosphorylierung und Aktivierung im Zellkern akkumulieren (Chen *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand, 1993). Der Mechanismus, durch den der Kerntransport erfolgt, ist bisher jedoch weitgehend unbekannt, weil MAPKs - von Ausnahmen abgesehen - kein NLS ("nuclear localisation signal") besitzen. Untersuchungen mit ERK2 haben allerdings erste Erkenntnisse über den Prozeß geliefert. Nicht aktiviertes ERK2 bindet an seinen Aktivator MEK1, der ein funktionelles Kernexportsignal besitzt und in gleicher Menge wie ERK2 in der Zelle vorliegt (Fukuda *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1997). Dadurch wird die nicht aktivierte MAPK im Cytoplasma zurückgehalten. Nach Phosphorylierung von ERK2 zerfällt der Komplex, und aktiviertes ERK2 akkumuliert im Nukleus. Das Modell, daß inaktives ERK2 im Cytoplasma durch seinen gleich abundanten Aktivator zurückgehalten wird, bietet eine Erklärung für die Beobachtung, daß ERK2 nach Überexpression präferentiell im Nukleus gefunden wird (Fukuda *et al.*, 1997). Andere Arbeiten haben gezeigt, daß ERK2 nach Aktivierung dimerisiert und in Form dieser Dimere in den Kern transportiert wird (Canagarajah *et al.*, 1997; Khokhlatchev *et al.*, 1998). Wird die Fähigkeit zur Dimerisierung zerstört, verbleiben die Kinasen auch in phosphorylierter Form im Cytoplasma. Weil die Kernlokalisierung in verschiedenen Systemen essentiell für die MAPK-Funktion ist (Robinson *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1999), wurden in der

vorliegenden Arbeit Immunlokalisierungen mit dem M7-Serum und dem P82-Serum vorgenommen. Bei Verwendung des M7-Serums zeigte sich, daß die 46-kDa-Kinase nach Phosphorylierung im Kern akkumuliert, wo sie möglicherweise an der Aktivierung der Transkription elicitorresponsiver Gene beteiligt ist. Die Kernlokalisierung ist ebenso wie die Aktivierung durch Phosphorylierung transient. Während nach 5 min alle Kerne deutlich gefärbt sind, sind nach 60 min, wenn geringere MAPK-Aktivität detektiert wird, nur noch einzelne Kerne angefärbt. Der aufgrund der großen Vakuole nur sehr kleine Cytoplasmasaum der Suspensionszellen wird durch die gewählte Fixierung nur sehr schlecht konserviert. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß weder in den nicht behandelten noch in den behandelten Zellen eine Immunfärbung des Cytoplasmas sichtbar ist.

Bei Verwendung des P82-Serums in Immunlokalisationsexperimenten ließ sich der Kerntransport nicht zeigen. Es war lediglich eine starke Fluoreszenz der Zellwände in den behandelten und den unbehandelten Zellen sichtbar, die Kerne zeigten eindeutig keine Immunfluoreszenz. Eine Ursache für dieses Ergebnis ist möglicherweise, daß der N-Terminus im Gegensatz zum C-Terminus nach der Fixierung mit Formaldehyd für die Antikörper nicht mehr zugänglich ist. Um dieses zu überprüfen, wäre die Immunlokalisation mit P82-Serum in anders fixiertem Material notwendig. Mögliche Techniken wären Gefriersubstitution oder die Fixierung von Protoplasten durch Methanol (Neumann *et al.*, 1987). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß MPK3 vor der Kernlokalisation N-terminal prozessiert wird. Ein solcher Prozeß wurde für MAPKs bisher nicht beschrieben und erscheint ausgeschlossen, da bei Westernblot-Analyse von Gesamtprotein elicierterter und nicht elicierterter Zellen mit P82- und M7-Serum lediglich eine einzige Bande von 46 kDa detektiert wird. Schließlich besteht die Möglichkeit, daß das M7-Serum neben MPK3 eine weitere elicitorresponsive 46-kDa-MAPK erkennt, die durch das P82-Serum nicht detektiert wird und im Gegensatz zu MPK3 im Kern akkumuliert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßte Petersiliegesamtprotein in einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-Transfer mit M7- und P82-Serum analysiert werden.

4.7 Eignung von Proteinkinaseinhibitoren für die funktionelle Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs

Der schnelle Kerntransport von MPK3 deutet darauf hin, daß zumindest einzelne der elicitorresponsiven MAPKs die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren und damit unmittelbar an der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen beteiligt sind. Um diese Hypothese zu untersuchen oder andere Funktionen der MAPKs in der Elicitorantwort zu bestimmen, sind *loss-of-function*-Experimente, in denen die Signalkette spezifisch auf der Ebene der MAPK-Kaskade unterbrochen wird, und *gain-of-function*-Experimente, in denen spezifisch die MAPK-Kaskade aktiviert wird, notwendig. Ein wichtiges Hilfsmittel für *loss-of-function*-Untersuchungen sind Inhibitoren. Der überwiegende Teil der Proteinkinaseinhibitoren hat jedoch ein sehr breites Wirkungsspektrum und war deshalb für die Bestimmung der MAPK-vermittelten

Abwehrantworten ungeeignet. Die Inhibitoren UO 126 (Favata *et al.*, 1998) und PD 096059 (Alessi *et al.*, 1995) inhibieren zwar sehr spezifisch die humane MEK1, erwiesen sich aber in Petersiliezellen als unwirksam in der Inhibition der MAPK-Aktivierung. In anderen Pflanzenzellkulturen scheinen sie jedoch wirksam zu sein. So wurde in Tabakzellkulturen gezeigt, daß die elicitorinduzierte Aktivierung der MAPKs WIPK und SIPK durch PD 096059 und durch UO 126 inhibiert wird (Romeis *et al.*, 1999; J. Lee, persönliche Mitteilung).

Für beide Inhibitoren wurde in *In-Vitro*-Untersuchungen gezeigt, daß sie nur MEK1 und 2, nicht aber andere MKKs wie z. B. MKK3, 4 und 6 inhibieren (Alessi *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998). Angesichts dieser hohen Spezifität der Inhibitoren ist es erstaunlich, daß sie pflanzliche MKKs inhibieren, die, sofern ihre Sequenz bekannt ist, wesentlich geringere Sequenzhomologien zu MEK1 und 2 besitzen als die oben genannten Säuger MKKs (Morris *et al.*, 1997). Deshalb wird abschließende Gewißheit über die Aussagekraft und Spezifität der Inhibitorexperimente erst gegeben sein, wenn die elicitorresponsiven MKKs isoliert worden sind und die in *In-Vivo*-Versuchen erhaltenen Ergebnisse mit *In-Vitro*-Experimenten korreliert werden können. Besonders aufschlußreich wird hier ein Vergleich der *in vitro* und *in vivo* bestimmten IC50-Werte sein.

4.8 Kotransformationsexperimente

Da im Petersiliesystem keine Möglichkeit besteht, *loss-of-function*-Mutanten der MAPK-Kaskade zu isolieren, wurde eine Kotransformationsstrategie entwickelt, in der der Einfluß der Überexpression inaktiver und aktiver MAPKs auf die Elicitorsignaltransduktion untersucht werden kann. Derartige transiente Überexpressionsexperimente mit dominant negativ interferierenden MAPKs haben wichtige Ergebnisse zu den MAPK-Kaskaden in Säugerzellkulturen geliefert (Sontag *et al.*, 1993; Kortenjann, *et al.*, 1994; Cowley *et al.*, 1994; Minden *et al.*, 1995; Mahani *et al.*, 1997). Die Überexpression inaktiver MAPKs kann dabei auf drei Ebenen mit einer endogenen MAPK-Kaskade interferieren: auf der Ebene der Aktivatoren, der Ebene der aktivierten MAPKs und der Ebene der Substrate.

Über die Aktivatoren pflanzlicher MAPKs ist wenig bekannt. Zwar sind zahlreiche MKKs und MKKKs kloniert worden, vor allem aus Arabidopsis, doch ihre Zuordnung zu den einzelnen MAPK-Kaskaden ist unbekannt (Mizoguchi *et al.*, 1997; Jouannic *et al.*, 1999a; Jouannic *et al.*, 1999b). Aus Tiersystemen und aus Hefe weiß man, daß die MAPK-Kaskaden in Komplexen organisiert sind, die aufgrund von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammenhalten, und in dieser Form subzellulär genau lokalisiert sind (Whitmarsh und Davis, 1998). Einige MAPK-Komplexe werden durch direkte Interaktionen der einzelnen Kinasen der MAPK-Kaskade zusammengehalten (Posas und Saito, 1997; Su *et al.*, 1997; Xu und Cobb, 1997), in anderen Systemen werden die MAPK-Module durch Adapterproteine organisiert (Elion, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998), die neben den Kinasen der MAPK-Kaskade auch andere Signalmoleküle binden und in den Signalprozeß integrieren können (Inoye *et al.*,

1997; Leeuw *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1998). Derartige Adapterproteine werden vor allem dort angetroffen, wo einzelne MKKs oder MKKKs in verschiedenen MAPK-Kaskaden involviert sind und erst durch die Zusammensetzung der einzelnen Signalkomplexe Signalspezifität gewährleistet wird (Gustin *et al.*, 1998). In diesen Fällen wird die zelluläre Antwort nicht dadurch bestimmt, welche MKK oder MKKK aktiviert wird, sondern in welchem Kontext diese Aktivierung erfolgt und welche MAPK am Ende der Kaskade induziert wird. Bei Überexpression einer inaktiven MAPK kann diese die endogene Kinase aus dem Signalkomplex verdrängen und so die Signalweiterleitung unterbrechen. Der Effekt kann jedoch auch unspezifisch sein, wenn eine überexprimierte MAPK aufgrund ihrer hohen Abundanz eine andere MAPK aus ihren Aktivator-komplexen verdrängt und somit einen Signalweg unterbricht, in den sie nicht involviert ist. Dann sollte die Inhibition des Signalweges jedoch unabhängig von der Aktivität der überexprimierten Kinase sein, da diese auch in aktivierter Form den gegebenen Signalweg blockiert.

Inaktive MAPKs können allerdings auch aufgrund ihrer Wechselwirkung mit aktivierten MAPKs eine MAPK-Kaskade negativ beeinflussen. Aus kristallographischen Untersuchungen und Mikroinjektionsstudien mit ERK2 ist bekannt, daß phosphoryliertes ERK2 Homodimere mit aktiviertem und Heterodimere mit nicht aktiviertem ERK2 bildet und daß diese phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung notwendig für den Kerntransport der aktivierten Kinase ist (Canagarajah *et al.*, 1997; Khokhlatchev *et al.*, 1998). Viele MAPK-Substrate wie z. B. Steroidrezeptoren, basische Helix-Loop-Helix-Proteine und Leucin-Zipper-Proteine bilden ebenfalls Dimere (Hunter und Karin, 1992; Karin 1995; Kallunki *et al.*, 1996) und werden möglicherweise bei einer einzigen Interaktion mit dem aktiven MAPK-Dimer phosphoryliert und aktiviert. Bei einem Überschuß an inaktiver MAPK bilden sich nach einem Stimulus vorwiegend hemiaktive Dimere, die zwar in den Kern transportiert werden, aber nur eine Untereinheit der Substrate phosphorylieren können (Khokhlatchev *et al.*, 1998). Die daraus resultierende unvollständige Aktivierung der Substrate führt zu einer reduzierten Antwort der Zelle.

Ein drittes Modell, um den dominant negativen Effekt nicht aktiver MAPKs auf einen gegebenen Signalweg zu erklären, beruht auf der Beobachtung, daß einige MAPKs in inaktiver Form an ihre Substrate binden und dadurch denjenigen Signalweg, den sie nach einem geeigneten Stimulus aktivieren, bei Ausbleiben dieses Stimulus zusätzlich reprimieren. Die Hefe MAPK KSS1, die bei Stickstoffmangel filamentöses Wachstum von Hefezellen induziert, bindet beispielsweise in unphosphorylierter Form an den Transkriptionsfaktor STE12 und reprimiert dadurch unter nicht induzierenden Umweltbedingungen filamentöses Wachstum (Madhani *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998). In *kss1*-Nullmutanten wird bei Stickstoffmangel, obwohl der MAPK-Weg unterbrochen ist, filamentöses Wachstum über einen parallelen Signalweg ausgelöst. Bei Expression einer kinaseinaktiven Form von KSS1 in *kss1*-Nullmutanten erfolgt unter den gleichen Umweltbedingungen kein filamentöses Wachstum (Madhani *et al.*, 1997). Mutationen in KSS1, die die Bindung mit STE12 blockieren, lösen unter induzierenden Bedingungen Hyperfilamentation aus. Werden diese Mutationen gemeinsam mit Mutationen, die die Kinaseaktivität zerstören und für sich alleine genommen Filamentation unterdrücken, in *KSS1* eingeführt, so erfolgt filamentöses Wachstum

(Madhani *et al.*, 1997). Durch einen ähnlichen Mechanismus kann eine im Überschuß vorliegende inaktive MAPK an Substrate binden und dadurch die Signalweiterleitung durch aktivierte Kinasen blockieren.

Die Kotransformationsexperimente in Petersilieprotoplasten mit unterschiedlichen MPK3-Varianten zeigen, daß in Abhängigkeit von der Aktivität des überexprimierten MPK3 ein dominant negativer Effekt auf die elicitorstimulierte Expression eines elicitorresponsiven Reportergens ausgeübt wird. Überexpression von unmodifiziertem MPK3 und Überexpression einer nicht aktivierbaren Variante von MPK3 reduzieren die elicitorresponsive Expression des Reportergens *GUS*. Überexpression einer MPK3-Variante, die voraussichtlich langanhaltend aktiviert bleibt, hat keinen reduzierenden Einfluß auf die elicitorinduzierte Reporterexpression. Diese Ergebnisse, die bei Verwendung elicitorresponsiver *PR1.1*- und *PR2*-Promotorfragmente gefunden wurden, deuten darauf hin, daß die elicitorresponsive MAPK MPK3 an der Regulation von Transkriptionsfaktoren und an der Induktion der Genexpression nach Elicitierung beteiligt ist.

Der dominant negative Effekt der nicht modifizierten MPK3 läßt sich damit erklären, daß bei MPK3-Überexpression aller Voraussicht nach nur ein geringer Anteil des gesamten MPK3-Pools nach Elicitierung phosphoryliert und aktiviert wird. Durch die Überexpression der MAPKs in Petersilie wird vermutlich ihre subzelluläre Lokalisierung gestört, was die Aktivierung der falsch lokalisierten Kinasen verhindert. Eine solche Aufhebung der korrekten subzellulären Lokalisation bei MAPK-Überexpression wurde in vielen Systemen gefunden. So finden sich beispielsweise überexprimierte ERKs und p38 nicht nur im Cytoplasma sondern überwiegend im Kern, wo sie ansonsten erst nach Aktivierung lokalisiert sind (Lenormand *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1997). Zudem ist wahrscheinlich die Kapazität der stromaufwärts gelegenen Aktivatoren nicht ausreichend, um nach Stimulierung die Gesamtheit des überexprimierten MPK3 zu aktivieren. Untersuchungen in Säugerzellen haben gezeigt, daß MAPKK und MAPK oftmals im gleichen stöchiometrischen Verhältnis vorliegen, während wesentlich weniger MKKK präsent ist (Ferrell, 1996; Huang und Ferrell; 1996). Eine Signalamplifikation erfolgt deshalb bei der Aktivierung des MKK-Pools durch die wenig abundante MKKK, nicht aber auf der Stufe der MAPK. Bereits 10 min nach Elicitierung setzt in den Petersiliezellen die Deaktivierung des MAPK-Weges ein. Diese wird voraussichtlich durch Proteinphosphatasen vermittelt und ist auf allen Ebenen der Kaskade wirksam. Die resultierende, bis zu 4 h nach Elicitorzugabe nachweisbare MPK3-Aktivität wird deshalb eher durch das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und deaktivierenden Komponenten bestimmt, insbesondere durch die Menge an MPK3-Phosphatasen und aktiver MPK3-Kinase, als durch die absolute Menge an MPK3. Ein Anstieg der MPK3-Menge resultiert deshalb aller Voraussicht nach nicht in einer Zunahme von aktiver sondern von inaktiver MPK3.

Die Überexpression unmodifizierter MPK3 führt deshalb wahrscheinlich dazu, daß nach Elicitierung ein kleiner Anteil des gesamten zellulären MPK3 aktiv ist, während der Überschuß inaktiv bleibt und durch die Bildung hemiaktiver Dimere und Konkurrenz um Substrat dominant negativ mit dem Signalweg interferiert. Dies könnten die Gründe

dafür sein, daß die Überexpression der unmodifizierten MPK3 qualitativ den gleichen negativen Effekt auf die Induktion des *PR1.1*- und *PR2*-Promotorfragments hat wie die Überexpression inaktiver MPK3.

Bei Überexpression von MPK3^{D-N} wird die Elicitorresponsivität der Zellen dahingegen nicht reduziert. Unter der Annahme, daß MPK3^{D-N} tatsächlich in der Interaktion mit deaktivierenden Phosphatasen gestört ist und dadurch nicht oder nur verzögert inaktiviert wird, ist bei dieser Isoform mit einer nicht transienten sondern lang anhaltend starken Aktivierung von MPK3 zu rechnen. Es wird also möglicherweise für Stunden das Niveau aktiver MPK3 gehalten, das ansonsten nur für 5-10 min präsent ist. Der Anteil aktiver MPK3 am gesamten MPK3-Pool ist dadurch lange Zeit viel höher als bei Überexpression der nicht modifizierten MPK3, was zu einer effizienten Phosphorylierung der MPK3-Substrate und einer Aktivierung des MPK3-abhängigen Signalwegs führt. Die Tatsache, daß die Aktivierung elicitorresponsiver Promotorfragmente bei MPK3-Überexpression von der Aktivität der überexprimierten MPK3-Varianten bestimmt wird, deutet darauf hin, daß MPK3 tatsächlich in die Regulation dieser Promotoren involviert ist und daß die gefundenen Effekte nicht auf einer unspezifischen Interaktion mit dem Elicitorsignalweg oder einer Interferenz mit einer anderen MAPK-Kaskade beruhen.

Auch die Überexpression unmodifizierter und inaktiver MPK1 und 2 interferiert mit dem Signalweg, der zur *PR1.1*- und *PR2*-Transkription führt - allerdings schwächer als bei Verwendung der entsprechenden MPK3-Varianten,. Die D-N-Mutation kompensiert auch bei diesen Kinasen den reduzierenden Effekt. Zwar konnte eine Elicitoraktivierung, wie sie für MPK3 gezeigt wurde, für MPK1 und 2 nicht nachgewiesen werden, doch deuten die in Abschnitt 4.5 diskutierten Ergebnisse auf die Möglichkeit hin, daß zumindest eine dieser Kinasen nach Elicitierung aktiviert wird und identisch mit der elicitorresponsiven 44-kDa-MAPK ist. Die Resultate der Kotransformationsexperimente lassen zwei mögliche Schlußfolgerungen zu: Entweder haben MPK1 und 2 mit MPK3 überlappende Aktivatoren und Substrate und können so im gleichen Signalweg funktionieren, oder die Aktivierung von Kinasen aus beiden Gruppen ist für die vollständige Induktion der *PR1.1*- und *PR2*-Expression notwendig. In jedem Fall deuten die Ergebnisse der Kotransformationsexperimente darauf hin, daß MPK3 und vielleicht auch MPK1 und 2 eine zentrale Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung elicitorresponsiver Gene haben. MPK4-Überexpression interferiert dahingegen nicht mit der elicitorstimulierten Aktivierung des *PR1.1*- und *PR2*-Promotors. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß MPK4 und 5 nicht in die Elicitorantwort impliziert sind.

Um die Interpretation der Kotransformationsexperimente experimentell abzusichern, ist es notwendig, in Zukunft das Aktivierungsprofil der überexprimierten MAPKs nach Elicitierung zu verfolgen. Dazu muß durch Immunpräzipitations-Kinaseexperimente verifiziert werden, ob die D-N-Mutante nach Elicitierung die postulierte langanhaltende Aktivierung zeigt. Dafür ist jedoch eine Epitopmarkierung der Kinasen erforderlich, wie sie in der vorliegenden Arbeit lediglich für die MPK1-Konstrukte vorgenommen wurde, weil in den Transformationsexperimenten nur 10-20% der Protoplasten transformiert werden. Infolgedessen liegt ein hohes Niveau endogener MAPKs vor, was eine

Interpretation von Immunpräzipitationsexperimenten mit MAPK-Antikörpern unmöglich macht.

Ein weiteres wichtiges Hilfsmittel für die Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs in Petersilie wären *gain-of-function*-Versionen von Komponenten der Elicitor-MAPK-Kaskade. Da konstitutiv kinaseaktive Versionen der MAPKs nicht bekannt sind und nach Analyse der kristallographisch ermittelten Struktur der aktivierten und nicht aktivierten MAPKs nicht durch Deletionen oder einzelne Aminosäure-Austausche hergestellt werden können (Cobb und Goldsmith, 1995; Canagarajah *et al.*, 1997), müssten derartige *gain-of-function*-Versionen von den MKKs oder den MKKKs hergestellt werden. Die elicitorresponsiven MKKs und MKKKs sind bisher jedoch noch nicht identifiziert worden, und eine konstitutiv aktive Version der humanen MEK1 erwies sich im Protoplastensystem als inaktiv. Das Protoplastensystem bietet sich jedoch als Hilfsmittel an, um elicitorresponsive MKKs und MKKKs zu identifizieren. Dazu müssten durch Deletionen und Punktmutationen in bekannten pflanzlichen MKKKs und MKKs, beispielsweise den Arabidopsis-Kinasen, konstitutiv aktive Varianten hergestellt werden. Anschließend könnte man mit verschiedenen Reporterkonstrukten testen, ob die aktiven Kinasen in der Lage sind, elicitorunabhängig Reporteragenaktivierung zu induzieren.

Schließlich sollten in zukünftigen Experimenten Reporterkonstrukte mit den Promotoren von Genen benutzt werden, die schneller nach Elicitierung transkribiert werden als *PR1.1* und *PR2*. Die Transkripte beider Gene sind erst 1-2 h nach Elicitierung nachweisbar (van de Löcht *et al.*, 1990; Rushton *et al.*, 1996), und *PR1.1*-Transkription verlangt die Expression zusätzlicher Gene, die vermutlich für Transkriptionsfaktoren kodieren (T. Eulgem und I. Somssich, persönliche Mitteilung). Ein schnell induziertes Petersiliegen ist *WRKY1*, dessen Transkription bereits 15 min nach Elicitierung unabhängig von Proteinsynthese induziert wird. Der *WRKY1*-Promotor, der mittlerweile gut untersucht ist, stellt damit einen putativen Zielpromotor für Transkriptionsfaktoren dar, deren Aktivität unmittelbar durch elicitorresponsive MAPKs reguliert wird, und sollte in Zukunft in Kotransformationsexperimenten getestet werden. Vielleicht findet sich hier ein Bindeglied zwischen cytoplasmatischer Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation der Genexpression.

4.9 Identifizierung zusätzlicher Signalkomponenten durch einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Der genetische Screen nach interagierenden Proteinen mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems bietet prinzipiell die Möglichkeit, Regulatoren und Substrate des MAPK-Weges zu identifizieren. So sind beispielsweise für MKKKs, MKKs, Adapterproteine, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren Protein-Protein-Wechselwirkungen mit MAPKs beschrieben und z. T. auch mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nachgewiesen worden (Printen und Sprague, 1994; Zanke *et al.*, 1996; Whitmarsh *et al.*, 1998; Bardwell *et al.*, 1996; Madhani *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der Erstellung einer Petersilie-cDNA-Bank und der Etablierung geeigneter Screeningbedingungen die Grundlagen für ein Screening nach Substraten und Regulatoren der elicitorresponsiven MAPKs gelegt. Mit MPK1 wurden 2×10^6 Primärtransformanten gescreent und bereits 2 positive Klone identifiziert. Da die Bank eine Komplexität von 3×10^6 unabhängigen Klonen aufweist, sollten für eine vollständige Analyse der Bank noch mindestens 4×10^6 Transformanten untersucht werden. In Zukunft sollte die Bank natürlich auch mit MPK3 und - wenn Elicitorresponsivität gezeigt werden kann - auch mit MPK2 durchsucht werden.

Eine Protein-Protein-Interaktion positiver Zwei-Hybrid-Klone mit dem "bait"-Protein, die im Hefesystem gezeigt wurde, muß zusätzlich *in vitro* verifiziert werden (Bartel *et al.*, 1993b; Wong *et al.*, 1997). Für die beiden mit MPK1 isolierten Klone *2H1* und *2H4* steht dieser Nachweis noch aus, ist aber, da bakteriell exprimiertes MPK1 vorliegt, einfach durchzuführen. Da *2H1* ein putatives Kernlokalisierungssignal besitzt, sollte, wenn sich die Interaktion mit MPK1 *in vitro* bestätigen läßt, ein Gesamtlängenklon isoliert werden, der möglicherweise Aufschlüsse über eine Funktion von *2H1* zuläßt. Die isolierte *2H4*-cDNA enthält nach Vergleichen mit Homologen in anderen Pflanzen und Bakterien vermutlich fast den gesamten offenen Leserahmen der entsprechenden mRNA. Aus ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz läßt sich keine Funktion ableiten, was eine funktionelle Analyse dieses Gens extrem schwierig macht. Da das Gen in allen Organisationsformen gefunden wird, kann jedoch angenommen werden, daß es eine essentielle Funktion in den unterschiedlichen Organismen erfüllt. Die Verifikation dieser Hypothese und eine Funktionsanalyse ließen sich am einfachsten durch die Analyse von *Knock-Out*-Mutanten in Bakterien oder Hefen überprüfen.

4.10 Ausblick

Zukünftige Arbeiten über die elicitorresponsiven MAP-Kinasen in Petersilie sollten die Charakterisierung der 40- und der 44-kDa MAPK, die Identifizierung von Regulatoren und Substraten von MPK3 und die weitere Aufklärung der Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktion zum Ziel haben.

Da die 40-kDa-MAPK wahrscheinlich einer bisher nicht beschriebenen Untergruppe pflanzlicher MAPK angehört, führt der direkteste Weg zu ihrer Identifizierung über die Aufreinigung des Proteins. Dabei kann die Kreuzreaktion mit dem anti-ActiveTM-MAPK-Antikörper sowohl als aktivitätsunabhängiges Reinigungskriterium als auch für eine sehr effiziente Immun-Affinitätschromatographie genutzt werden. Durch Herstellung eines MPK2-spezifischen Serums läßt sich in Zukunft die Frage beantworten, ob es sich bei der 44-kDa-Kinase um MPK2 handelt.

Zur Identifizierung von Regulatoren und Substraten von MPK3 bieten sich vor allem 3 verschiedene Wege an. Die in der vorliegenden Arbeit erstellte Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank sollte mit einem MPK3-Konstrukt unter den etablierten Screeningbedingungen nach Interaktionspartnern durchsucht werden. Positive Klone aus

diesem Screen können nach bakterieller Expression in Kopräzipitationsexperimenten auf *In-Vitro*-Interaktion mit bakteriell exprimiertem MPK3 getestet werden. Sollten auf diesem Weg potentielle Substrate der MAPK gefunden werden, so könnten diese in *In-Vitro*-Kinaseexperimenten mit immunpräzipitierter aktiver MPK3 untersucht werden. MKKs oder Proteinphosphatasen, die auf diesem Weg isoliert werden, können in *In-Vitro*-Experimenten bezüglich ihres Einflusses auf die Aktivität aktiver bzw. inaktiver MPK3 getestet werden. Ein anderer Ansatz, um Substrate von MPK3 zu isolieren, besteht im Screening einer Petersilieexpressions-cDNA-Bank mit immunpräzipitierter aktiver MPK3 und [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (Fukunaga und Hunter, 1997). *In-Vitro*-Substrate, die auf diesem Weg identifiziert werden, ließen sich in der Folge in *In-Vivo-Labeling*-Studien und Kopräzipitationsexperimenten näher charakterisieren. Eine weitere Möglichkeit, Interaktionspartner von MPK3 zu isolieren, bieten Kopräzipitationsexperimente mit dem sehr spezifischen P82-Serum. Aus Kernextrakten lassen sich auf diesem Weg unter Umständen mit MPK3 interagierende Transkriptionsfaktoren aufreinigen, aus der cytoplasmatischen Fraktion Komponenten der MAPK-Kaskade.

Wie bereits in Kapitel 4.8 diskutiert wurde, sollte in Zukunft durch Verwendung des *WRKY1*-Promotors in Kotransformationsexperimenten festgestellt werden, ob die Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren, die die Expression dieses unmittelbar elicitorinduzierten Gens aktivieren, durch MAPKs reguliert werden. Wenn dies der Fall ist, sollte versucht werden die Faktoren zu klonieren, um den Mechanismus ihrer Regulation durch MAPKs näher charakterisieren zu können. Dies würde entscheidend zum Verständnis des Wechselspiels zwischen cytosolischer Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation der Genexpression beitragen.

5 Zusammenfassung

Die hier vorgestellten Arbeiten haben zum ersten Mal die rezeptorvermittelte Aktivierung pflanzlicher MAPKs gezeigt. Nach Bindung eines Elicitorpeptids an einen Rezeptor der Plasmamembran von Petersiliezellen werden über einen weitgehend unbekanntem Signalweg drei verschiedene MAPKs (40, 44 und 46 kDa) aktiviert. Die Aktivierung der MAPKs erfolgt durch Phosphorylierung des konservierten TEY-Motivs auf der MAPK-Aktivierungsschleife. In In-Gel-MBP-Kinasenachweisen zeigte die elicitorresponsive 40-kDa-MAPK deutliche Unterschiede zu der 44- und der 46-kDa-MAPK und gehört möglicherweise einer bisher nicht bekannten Unterfamilie pflanzlicher MAPKs an.

Es wurde gezeigt, daß elicitorstimulierte Ionenströme über die Plasmamembran hinreichend und notwendig für die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs sind. Der "oxidative burst", der ebenfalls eine wichtige Signalkomponente in der Petersilie-Elicitorantwort darstellt, liegt dahingegen unterhalb der MAPK-Induktion oder in einem parallelen Signalweg. Es konnten 5 verschiedene Petersilie-MAPK-cDNAs aus 3 unterschiedlichen Untergruppen kloniert werden (*MPK1-5*), von denen vier funktionell in Bakterien exprimiert wurden. Durch die Verwendung von Peptiden aus heterologen Sequenzbereichen konnten trotz der hohen Homologie der klonierten Petersilie-MAPKs Antiseren gewonnen werden, die spezifisch zwischen den verschiedenen Untergruppen diskriminieren. Mit ihnen und mit Seren gegen Medicago-MAPKs wurden die elicitorresponsiven MAPKs immunologisch charakterisiert. Dabei konnte nachgewiesen werden, daß die größte der elicitorresponsiven MAPKs (46 kDa) identisch mit MPK3 ist und daß MPK1, 4 und 5 nicht elicitorresponsiv sind.

Durch Immunlokalisierungsstudien wurde demonstriert, daß MPK3 nach Elicitierung im Zellkern akkumuliert. Dieser schnelle elicitorstimulierte Kerntransport läßt vermuten, daß MPK3 unmittelbar an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist, die die Transkription elicitorresponsiver Gene aktivieren. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde ein Protoplasten-Kotransformationsexperiment etabliert, mit dem die Beteiligung der MAPKs an der transkriptionellen Regulation elicitorresponsiver Gene analysiert werden konnte. Dieses System erlaubte es, den Einfluß der Überexpression aktiver und inaktiver Varianten der MAPKs auf die Expression eines Reportergens zu untersuchen, dessen Transkription durch ein elicitorresponsives Promotorfragment des Petersilie-*PR1.1*- bzw. -*PR2*-Gens reguliert wurde. Mit Hilfe der Kotransformationen konnten Hinweise gewonnen werden, daß MPK3 und eine Kinase aus der MPK1/2-Gruppe an der elicitorstimulierten Aktivierung der Transkription des *PR1.1*- und des *PR2*-Gens beteiligt sind. MPK4 scheint dahingegen nicht in die Regulation dieser Gene involviert zu sein.

Um Regulatoren und Substrate der elicitorresponsiven MAPKs in Petersilie zu isolieren, wurde unter Verwendung von Poly(A)⁺-RNA aus elicitierten und nicht-elicitierten Petersiliezellen eine cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System konstruiert. Diese Bank wurde mit MPK1 durchsucht, wobei zwei potentielle Interaktionspartner dieser MAPK identifiziert werden konnten.

6 Literatur

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Stascawicz, B. J., Daniels, M. J., Parker, J. E. (1998) Different requirements for *EDS1* and *NDR1* by disease resistance genes define at least two *R* gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 10306-10311.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D., Saltiel, A. R. (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. J. Biol. Chem. 270, 27489-27494.
- Allen, J. B., Walberg, M. W., Edwards, M. C., Elledge, S. J. (1995) Finding prospective partners in the library: the two-hybrid system and phage display find a match. Trends Biochem. Sci. 20, 511-516.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucl. Acid Res. 25, 3389-3402.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishakawa, A., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic network in the establishment of plant immunity. Cell 92, 773-784.
- Arias, J. A., Dixon, R. A., Lamb, C. J. (1992) Dissection of the functional architecture of a plant defense gene promoter using a homologous *in vitro* transcription initiation system. Plant Cell 5, 485-496.
- Bailey, J. A., Mansfield, J. W. (1982) Phytoalexins. John Wiley and Sons, New York.
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. Ann. Rev. Phytopath. 33, 299-321.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Baggott, D. M., Martinez, A. R., Thorner, J. (1998) Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. Genes Dev. 12, 2887-2898.
- Bardwell, L., Cook, J. G., Voora, D., Chang, E. C., Cairns, B. R., Thorner, J. (1996) Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. Mol. Cell. Biol. 16, 3637-3650.

- Bartel, P. A., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993a) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: Cellular interactions and development: A practical approach. (Hartley, D. A., ed.) IRL Press, New York, pp 153-179.
- Bartel, P. A., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993b) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14, 920-924.
- Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N. S., Hirt, H., Heberle-Bors, E. (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11 (1), 101-114.
- Bögre, L., Ligterink, W., Heberle-Bors, E., Hirt, H. (1996) Mechanosensors in plants. *Nature* 383, 489-490.
- Bögre, L., Ligterink, W., Meskine, I., Barker, P. J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N. S., Hirt, H. (1997) Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9, 75-83.
- Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 189-214.
- Bostock, R. M., Kuc, J. A., Laine, R. A. (1981) Eicosapentaenoic and arachidonic acids from *Phytophthora infestans* elicit fungitoxic sesquiterpenes in potato. *Science* 212, 67-69.
- Bowles, D. J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 873-907.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R., Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6, 1703-1712.
- Brunet, A., Roux, D., Lenormand, P., Dowd, S., Keyse, S., Pouyssegur, J. (1999) Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.* 18 (3), 664-674.
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W. H., Zipursky, S. L., Hafen, E. (1994) A gain-of-function mutation in drosophila MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76, 875-888.

- Calderini, O., Bögre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E., Wilson, C. (1998) A cell cycle-regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* 11, 3091-3100.
- Camps, M., Nichols, A., Gillieron, C., Antonsson, B., Muda, M., Chabert, C., Boschert, U., Arkinstall, S. (1998) Catalytic activation of the phosphatase MPK-3 by ERK2 mitogen-activated protein kinase. *Science* 280, 1262-1265.
- Canagarajah, B., Khokhlatchev, A. V., Cobb, M. H., Goldsmith, E. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.
- Cano, E., Mahadevan, L. C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem. Sci.* 20, 117-122.
- Cassab, G. I. (1998) Plant cell wall proteins. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 281-310.
- Century, K. S., Holub, E. B., Stascawicz, B. J. (1995) *NDR 1*, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6597-6601.
- Century, Shapiro, A. D., Repetti, P. P., Dahlbeck, D., K. S., Holub, E. B., Stascawicz, B. J. (1997) *NDRI*, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science* 278, 1963-1965.
- Chandra, S., Low, P. S. (1997) Measurement of Ca^{2+} fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28274-28280.
- Chen, R.-H., Sarnecki, C., Blenis, J. (1992) Nuclear localization of *erk*- and *rsk*-encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 12, 915-927.
- Chien, C.-T., Bartel, P. A., Sternglanz, R., Fields, S. (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582.
- Clark, S. E., Williams, R. W., Meyrowitz, E. M. (1997) The *CLAVATA1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in arabidopsis. *Cell* 89, 575-585.
- Cobb, M. H. (1999) MAP kinase pathways. *Progr. Biophys. Mol. Biol.* 71, 479-500.
- Cobb, M. H., Goldsmith, E. J. (1995) How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.* 270 (25), 14843-14846.
- Conrath, U., Jeblinck, W., Kauss, H. (1991) The protein kinase inhibitor, K252a, decreases elicitor induced Ca^{2+} uptake and K^+ release, and increases coumarin synthesis in parsley cells. *FEBS Lett.* 279, 141-144.

- Cook, S. J., Beltmann, J., Cadwallader, K. A., MacMahon, M., McCormick, F. (1997) Regulation of MAP kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent pathways in rat-1 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 13309-13319.
- Cosio, E. G., Frey, T., Verduyn, R., Van Boom, J., Ebel, E. (1990) High affinity binding of a synthetic heptaglycoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* 175, 309-315.
- Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P., Marshall, C. J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is sufficient for P12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell* 77, 841-852.
- Cross, A. R., Jones, O. T. G. (1986) The effect of diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. *Biochem. J.* 237, 111-116.
- da Costa e Silva, O., Klein, L., Schmelzer, E., Trezzini, G. F., Hahlbrock, K. (1993) BPF-1, a pathogen-induced DNA-binding protein involved in the plant defense response. *Plant J.* 4, 125-135.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A., Richberg, M. H. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8, 1793-1807.
- Dangl, J. L., Hauffe, K. D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1987) Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J.* 6, 2551-2556.
- De Wit, P. J. G. M. (1997) Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. *Trends Plant Sci.* 2, 452-458.
- Decroocq-Ferrant, V., Decroocq, S., Went, J. V., Schmidt, E., Kreis, M. (1995) A homologue of the MAP/ERK family of protein kinase genes is expressed in vegetative and female reproductive organs of *Petunia hybrida*. *Plant Mol. Biol.* 27, 339-350.
- Dellaporte, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1 (4), 19-21.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide signal functions in plant disease resistance. *Nature* 394, 585-588.
- Després, C., Subramaniam, R., Matton, D. P., Brisson, N. (1995) The activation of the potato *PR-10a* Gene requires the phosphorylation of the nuclear factor PBF-1. *Plant Cell* 7, 589-598.
- Dietrich, A., Mayer, J. E., Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265, 6360-6368.

- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-97.
- Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 316-323.
- Dröge-Laser, W., Kaiser, A., Lindsay, W. P., Halkier, B. A., Loake, G. J., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. (1997) Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein G/HBF-1, during the induction of early transcription factor-dependent defense. *EMBO J.* 16 (4), 726-738.
- Dron, M., Clouse, S. D., Lawton, M. A., Dixon, R. A., Lamb, C. (1988) Glutathione and fungal elicitor regulation of a plant defense gene promoter in electroporated protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 6738-6742.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxid, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328-10333.
- Ebel, J, Cosio, E. G. (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148, 1-36.
- Ebel, J., Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206, 335-348.
- Ebel, J., Scheel, D. (1992) Elicitor recognition and signal transduction. In: *Plant gene research. Genes involved in plant defense* (Boller, T., Meins, F., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 183-205.
- Ebel, J., Scheel, D. (1997) Signals in host-parasite interaction. In: *The Mycota, Part A, Plant Relationships* (Carroll, G., Tudzynski, P., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 85-105.
- Falk, A., Feys, B. J., Frost, L. N., Jones, J. D. G., Daniels, M. J., Parker, J. E. (1999) *EDS1*, an essential component of R-gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 3292-3297.
- Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R. L., Scherel, P. A., Trzaskos, M. (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273 (29), 18623-18632.
- Feldbrügge, M., Sprenger, M., Dinkelbach, M., Yazaki, K., Harter, K., Weisshaar, B. (1994) Functional analysis of a light responsive plant bZIP transcriptional regulator. *Plant Cell.* 6, 1607-1621.

- Felix, G., Grosskopf, D. G., Regenass, M., Boller, T (1991) Rapid changes in protein phosphorylation are involved in transduction of the elicitor signal in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 8831-8834.
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4, 307-316.
- Felix, G., Regenass, M., Spanu, P., Boller, T. (1994) The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labeling with [³³P]-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 952-956.
- Feng, Y., Song, L. Y., Kincaid, E., Mahanty, S. K., Elion, E. A. (1998) Functional binding between Gβ and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr. Biol.* 8, 267-278.
- Ferrell, J. E. (1996) Tipping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch like outputs. *Trends Biochem. Sci.* 21, 460-466.
- Fields, S., Song, O.-K. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Flor, H. H. (1971) Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopath.* 9, 275-296.
- Frankhauser, C., Yeh, K.-C., Lagarias, J. C., Zhang, H., Elich, T. D., Chory, J. (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in arabidopsis. *Science* 284, 1539-1541.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y, Nishida, E. (1996) Cytoplasmic localisation of MAP kinase kinase directed by its NH₂-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as nuclear export signal. *J. Biol. Chem.* 271, 20024-20028.
- Fukuda, M., Gotoh, Y, Nishida, E. (1997) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.* 16 (8), 1901-1908.
- Fukunaga, R., Hunter, T. (1997) MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *EMBO J.* 16, 1921-1933.
- Gelli, A., Higgins, V. J., Blumwald, E. (1997) Activation of plant plasma membrane Ca²⁺-permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* 113, 269-279.

- Gietz, R. G., Woods, R. A. (1993) High efficiency transformation with lithium acetate. In: Cellular interactions and development: A practical approach. (Hartley, D. A., ed.), IRL Press, New York, pp. 181-196.
- Glazebrook, J. L., Ausubel, F. M. (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interaction with bacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 8955-8959.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., Ausubel, F. M. (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* 143, 973-982.
- Glazebrook, J., Rogers, E. E., Ausubel, F. M. (1997a) Use of *Arabidopsis* for genetic dissection of plant defense. *Ann. Rev. Gen.* 31, pp.547-570.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E. E., Crute, I. R., Holub, E. B., Hammerschmidt, R., Ausubel, F. M. (1997b) Phytoalexin deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that *PAD4* encodes a regulatory factor and that four *PAD* genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* 146, 381-392.
- Gonzalez, F. A., Seth, A., Raden, D. L., Bowman, D. S., Fay, F. S., Davis, R. J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell Biol.* 122, 1089-1101.
- Greenberg, J. T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 525-545-275.
- Grosskopf, D. G., Felix, G., Boller, T. (1990) K252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitor *in vivo* and their microsomal protein kinase *in vitro*. *FEBS Lett.* 275, 177-180.
- Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., Davenport, A. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264-1300.
- Guthrie, C., Fink, G. R. (1991) Guide to Yeast genetics. *Methods in Enzymologie* Vol. 194, Academic press, London.
- Hahlbrock, K. (1975) Further studies on the relationship between the rates of nitrite uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant suspension cultures. *Planta* 124, 311-318.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W., Schmelzer, E. (1995) Oligopeptide elicitor -mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4150-4157.
- Hahn, M. G. (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 387-412.

- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 575-607.
- Hanania, U., Avni, A. (1997) High affinity binding site for ethylene inducing xylanase elicitor in *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J.* 12, 113-120.
- Hartmann, U., Valentine, W. J., Christie, J. M., Hays, J., Jenkins, G. I., Weisshaar, B. (1998) Identification of UV/blue light-responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a heterologous protoplast transient expression system. *Plant Mol. Biol.* 36, 741-754.
- Haufler, K. D., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1986) Elicitor-stimulated furanocoumarin biosynthesis in parsley cells: S-adenosyl-L-methionine:bergapton and S-adenosyl-L-methionine:Xantholol-O-methyltransferases. *Z. Naturforsch.* 41c, 228-239.
- Heasley, L. E., Johnson, G. L. (1992) The β PDGF receptor induces neuronal differentiation of P12 cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 545-553.
- Heath, M. C. (1998) Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* 104, 117-124.
- Herscovitz, I. (1995) MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* 80, 187-197.
- Hill, C. S., Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: Mechanisms and specificity. *Cell* 80, 199-211.
- Hirt, H. (1997) Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 2 (1), 11-15.
- Hopp, T. P., Woods, K. R. (1981) Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 3824-3828.
- Huang, C.-Y., Ferrell, J. E. (1996) Ultrasensitivity in the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10078-10083.
- Hunter, T., Karin, M. (1992) The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 70, 375-387.
- Hunter, T., Plowman, G. D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biol. Sci.* 22, 18-21.
- Huttley, A., Phillips A. L. (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kinases that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 27, 1043-1052.

- Innes, R. W. (1998) Genetic dissection of *R* gene signal transduction pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 299-304.
- Inoye, C., Dhillon, N., Thorner, J. (1997) Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4-promoted oligomerization for yeast pheromone signaling. *Science* 278, 103-106.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.
- Jabs, T. (1994) Beteiligung von elicitorresponsiven Ionenkanälen an der Signaltransduktion zur Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie. Dissertation an der Universität Tübingen.
- Jabs, T., Dietrich, R. A., Dangl, J. L. (1996) Extracellular superoxide initiates runaway cell death in an *Arabidopsis* mutant. *Science* 273, 1853-56.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 4800-4805.
- Jahnen, W., Hahlbrock, K. (1988) Cellular localization of nonhost resistance reactions of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection. *Planta* 173, 197-204.
- James, P., Halladay, J., Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P. J., Huskisson, N. S., Hirt, H. (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11274-11279.
- Jonak, C., Kiegerl, S., Lloyd, C., Chan, J., Hirt, H. (1995) MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol. Gen. Genet.* 248, 686-694.
- Jonak, C., Ligterink, W., Hirt, H. (1999) MAP kinases in plant signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 204-213.
- Jonak, C., Páy, A., Bögre, L., Hirt, H., Heberle-Bors, E. (1993) The plant homolog of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ-specific manner. *Plant J.* 3, 611-617.
- Joosten, M. H. A. J., Cozijnsen, T. J., Wit, P. J. G. M. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base pair change in an avirulence gene. *Nature* 367, 384-386.

- Jouannic, S., Hamal, A., Leprince, A. S., Tregear, J. W., Kreis, M., Henry, Y. (1999a) Characterisation of novel plant genes encoding MEKK/STE11 and RAF-related protein kinases. *Gene* 229, 171-181.
- Jouannic, S., Hamal, A., Leprince, A. S., Tregear, J. W., Kreis, M., Henry, Y. (1999b) Plant MAP kinase kinase kinase structure, classification and evolution. *Gene* 233, 1-11.
- Kalunki, T., Deng, T., Hibi, M., Karin, M. (1996) c-Jun can recruit JNK to phosphoralyte dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 87, 929-939.
- Kamada, Y., Muto, S. (1994) Protein kinase inhibitors inhibit stimulation of inositol phospholipid turnover and induction of phenylalanine ammonia-lyase in fungal elicitor-treated tobacco suspension culture cells. *Plant Cell Physiol.* 35 (3), 405-409.
- Kamoun, S., Huitema, E., Vleeshouwers, V. G. A. A. (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci.* 4 (5), 196-200.
- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 16483-16486.
- Kauss, H., Jeblick, W., Domard, H. (1989) The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* 178, 385-392.
- Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D., Somssich, I. E. (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *J. Biol. Chem.* 268, 2189-2194.
- Kawalleck, P., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1995) Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase. *Mol. Gen. Genet.* 247 (4), 444-452.
- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. (1998) A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91^{phox} subunit gene encodes a plasma membrane protein with calcium binding motifs. *Plant Cell* 1998 10, 255-266.
- Keyse, S. M. (1998) Proteinphosphatases and the regulation of MAP kinase activity. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9, 143-152.
- Khokhlatchev, A. V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E., Cobb, M. H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93, 605-615.

- Kieber, J. J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldman, K. A., and Ecker, J. R. (1993) *CTR1*, a negative regulator of the ethylene response pathway in arabidopsis, encodes for a member of Raf family of protein kinases. *Cell* 72, 427-441.
- Knogge, W. (1996) Fungal infection in plants. *Plant Cell* 8, 1711-1722.
- Kombrink, E., Hahlbrock, K. (1986) Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. *Plant Physiol.* 81, 216-221.
- Kombrink, E., Somssich, I. E. (1995) Defense responses of plants to phytopathogens. In: *Advances in botanical Research*. Vol. 21 (Andrews, J. H. and Tommerup, I. C., eds.), Academic Press, London, pp. 1-34.
- Kombrink, E., Somssich, I. E. (1997) Pathogen-related proteins and plant defense. In: *The Mycota, Part A, Plant Relationships* (Carroll, G., Tudzynski, P., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 107-128.
- Korfhage, U., Trezzini, G. F., Meier, I., Hahlbrock, K., Somssich, I. (1994) Plant homeodomain protein involved in transcriptional regulation of a pathogen-related gene. *Plant Cell* 6, 695-708.
- Kortenjann, M., Thomae, O., Shaw, P. E. (1994) Inhibition of *v-Raf* dependent *c-fos* expression and transformation by a kinase defective mutant of the mitogen-activated protein kinase ERK2. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4815-4823.
- Kramer, B., Kramer, W., Fritz, H. J. (1984) Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*. *Cell* 38, 879-887.
- Kroj, T. (1995) Untersuchungen zur Rolle der Jasmonsäure als Signalsubstanz bei der Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie. Diplomarbeit an der Universität Köln.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, C., Dixon, R. A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251-275.
- Lee, J. H., van Montagu, M., Verbruggen, N. (1999) A highly conserved kinase is an essential component for stress tolerance in yeast and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 5873-5877.
- Leeuw, T. A., Wu, C., Schrag, J. D., Whiteway, M., Thomas, D. Y., Leberer, E. (1998) Interaction of a G β -subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* 391, 191-195.

- Legendre, L., Heinstein, P. F., Low, P. S. (1992) Evidence for the participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* 267, 20140-20147.
- Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A., Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinase (p42^{mapk} and p44^{mapk}) but not of their activator MAP kinase kinase (p45^{mapkk}) in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122, 1079-88.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79, 583-593.
- Lewis, T. S., Shapiro, P. S., Ahn, N. G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.* 74, 49-139.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense in plants. *Science* 276, 2054-2057.
- Loake, G. J., Factor, O., Lamb, C. J., Dixon, R. A. (1992) Combination of H-box and G-box *cis* elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 9230-9234.
- Logemann, J., Schell, J., Willmitzer, L. (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Anal. Biochem* 163, 16-20.
- Logemann, E., Wu, S., Schröder J., Schmelzer, E., Somssich, I. E., Hahlbrock, K. (1995) Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. *Plant J.* 8, 865-876.
- Loh, Y.-T., Martin, G. B. (1995) The *Pto* bacterial resistance gene and the *Fen* insecticide sensitivity gene encode functional protein kinases with serine/threonine specificity. *Plant Physiol.* 108, 1735-39.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive *cis*-acting elements. *EMBO J.* 8, 1642-1648.
- MacKintosh, C. (1998) Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Curr. Opin. Plant Sci.* 1, 224-229.
- MacKintosh, C., Lyon, G. D., MacKintosh, R. W. (1994) Phosphatase inhibitors activate anti-fungal defence responses of soybean cotyledons and cell cultures. *Plant J.* 5 (1), 137-147.

- Madhani, H. D., Styles, C. A., Fink, G. R. (1997) MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* 91, 673-684.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, J., Elkind, Y., Dixon, C., Lamb, C. (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 7803-7806.
- Maleck, K., Dietrich, R. A. (1999) Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4 (6), 215-219.
- Manfield, J. W. (1983) Antimicrobial compounds. In: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J. A., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 237-265.
- Mansour, S. J., Matten, W. T., Hermann, A. S., Candia, J. M., Rong, S., Fukasawa, K., Woude, G. F., Ahn, N. G. (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265, 966-970.
- Marschall, C. J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 80, 179-185.
- Martin, G. B., Brommonschenkel, S., Chungwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D., Tanksley, S. D. (1993) MAP based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* 262, 1432-1436.
- Mathieu, Y., Sanchez, F. J., Droillard, M.-J., Lapous, D., Laurière, C., Guern, J. (1996) Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol. Biochem.* 34 (3), 399-408.
- Menke, K. L. H., Parchmann, S., Mueller, M. J., Kijne, J. W., Memelink, J. (1999) Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 119, 1289-1296.
- Meskiene, I., Bögre, L., Glaser, W., Balog, J., Brandstötter, M., Zwerger, K., Hirt, H. (1998) MP2C, a plant protein phosphatase 2 C, functions as a negative regulator of mitogen activated protein kinase pathways in yeast and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1938-1943.
- Millar, J. B., Buck, C., Wilkinson, M. G. (1995) Pyp 1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* 9, 2117-2130.
- Minden, A., Lin, A., Smeal, T., Dérijard, B., Cobb, M., Davis, R., Karin, M. (1994) c-Jun terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but

- not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 14, 6683-6688.
- Mithöfer, A., Lottspeich, F., Ebel, J. (1996) One-step purification of the β -glucan elicitor-binding protein from soybean roots and characterisation of an antipeptide antiserum. *FEBS Lett.* 381, 203-207.
- Mizoguchi, T., E., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Kamada, H., Shinozaki, K. (1993) *ATMPKs*: a gene family of plant MAP kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 336, 440-444.
- Mizoguchi, T., Gotho, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H., Shinozaki, K. (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5 (1), 111-122.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Shinozaki, K. (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends Biotechnol.* 15, 15-19.
- Morris, P. C., Guerrier, D., Leung, J., Giraudat, J. (1997) Cloning and characterisation of *MEK1*, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol. Biol.* 35, 1057-1064.
- Nennstiel, D., Scheel, D., Nürnberger, T. (1998) Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*petroselinum crispum*). *FEBS Let.* 431, 405-410.
- Neumann, D., zur Nieden, U., Manteuffel, R., Walter, G., Scharf, K.-D., Nover, L. (1987) Intracellular localization of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *Eur. J. Cell Biol.* 43, 71-81.
- Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N. (1996) Nitrite oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* 37, 113-116.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1995) Covalent crosslinking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2338-2342.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1994) High-affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449-460.
- Osbourn, A. E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8, 1821-1831.

- Parker J. E., Holub, E. B., Frost, L. N., Falk, A., Gunn, N. D., Daniels, M. J. (1996) Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different *RPP* genes. *Plant Cell* 8, 2033-2046.
- Parker, J. E., Schulte, W., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 19-27.
- Parker, J. M. R., Guo, D., Hodges, R. S. (1986) New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry* 25, 5425-5432.
- Payne, D. E., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J.-H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., Sturgill, T. W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 10 (4), 885-892.
- Peng, M., Kuc, J. (1992) Peroxidase generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82, 696-699.
- Phizicky, E. M., Fields, S. (1995) Protein-Protein interactions: Methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* 59, 94-123.
- Posas, F., Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276, 1702-1705.
- Prell, H. H. (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Printen, J. A., Sprague, G. F. (1994) Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5 interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* 138, 609-619.
- Pugin, A., Frachisse, J.-M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., Guern, J. (1997) Early events induced by the elicitor cryptogin in tobacco cells: involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* 9, 2077-2091.
- Raz, V., Fluhr, R. (1993) Ethylene signal is transduced via protein phosphorylation events in plants. *Plant Cell* 5, 523-530.

- Renelt, A., Colling, C., Hahlbrock, K., Nürnberger, T., Parker, J. E., Sacks, W., Scheel, D. (1993) Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *J. Ex. Bot.* 44, 257-268.
- Reymond, P., Farmer, E. E. (1999) Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 404-411.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., Pernollet, J.-C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* 183, 555-563.
- Ride, J. P. (1983) Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J. A., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 215-236.
- Robbins, D. J., Zhen, E. Z., Owaki, H., Vanderbilt, C. A., Ebert, D., Geppert, T. D., Cobb, M. H. (1993) Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 268, 5097-5106.
- Robinson, M. J., Cobb, M. H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.
- Robinson, M. J., Stippec, S. A., Goldsmith, E., White, M. A., Cobb, M. H. (1998) Constitutively active ERK2 MAP kinase is sufficient for neurite outgrowth and cell transformation when targeted to the nucleus. *Curr. Biol.* 8, 1141-1150.
- Rogers, E. E., Ausubel, F. M. (1997) Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 expression. *Plant Cell* 9, 305-316.
- Romeis T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D., Hirt, H., Jones, J. D. (1999) Rapid Avr-9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-287.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E. (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 311-315.
- Rushton, P., Torres, J. T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *EMBO J.* 15 (20), 5690-5700.
- Ryals, J. A., Neuenschwanner, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y., Hunt, M. D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schaeffer, H. J., Catling, H. D., Eblen, S. T., Collier, L. S., Krauss, A., Weber, M. J. (1998) MP1: a MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science* 281, 1668-1671.
- Schafstrom, J. P., Altschuler, M., Anderson, D. H. (1993) Molecular cloning and expression of a MAP kinase homolog from pea. *Plant. Mol. Biol.* 22, 83-90.
- Scheel, D. (1991) Plant defense genes. In: *Pesticide chemistry*. (H. Frehse, ed.), VCH, Weinheim, pp. 121-130.
- Scheel, D. (1992) Molecular aspects of host defense response after infection by pathogenic fungi: an overview. In: *Molecular biology of filamentous fungi* (Stahl, U., Tudzynski, P, eds.), VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, pp. 125-138.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1, 305-310.
- Schmelzer, E., Krüger-Lebus, S., Hahlbrock, K. (1989) Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *Plant Cell* 1, 993-1001.
- Schulze-Lefert, P., Dangl, J. L., Becker-André, M., Hahlbrock, K., Schulz, W. (1989) Inducible *in vivo* footprints define sequences necessary for UV light activation in parsley chalcone synthase gene. *EMBO J.* 8 (3), 651-656.
- Schwacke, R., Hager, A. (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity. *Planta* 187, 136-141.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., Stascawicz, B. J. (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* 274, 2063-2065.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., Ohashi, Y. (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction. *Science* 270, 1988-1992.
- Seo, S., Sano, H., Ohashi, Y. (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11, 289-298.
- Sharp, J. K., Valent, B., Albersheim, P. (1984) Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* 259, 11321-11336.

- Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J., Ito, Y. (1996) Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchito-oligosaccharide elicitor in the plasma membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as a receptor for the elicitor signal at the cell surface. *Plant Cell Physiol.* 37, 894-898.
- Smith, C. J. (1996) Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytol.* 132, 1-45.
- Somssich, I. E. (1994) Regulatory elements governing pathogenesis-related (PR) gene expression. In: *Plant promoters and transcription factors* (Nover, L., ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 163-179.
- Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E., Schulz, W. (1989) Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol. Biol.* 12, 227-234.
- Somssich, I. E., Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defense in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.
- Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W., Zhu, L., Fauquet, C., Ronald, P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene *Xa21*. *Science* 270, 1804-1806.
- Sontag, E., Federov, S., Robbins, D., Cobb, M., Mumby, M. (1993) The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the MAP kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75, 887-897.
- Stone, J. M., Walker, J. C. (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* 108, 451-457.
- Stratmann, J. W., Ryan, C. A. (1997) Myelin basic protein kinase activity is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11085-89.
- Su, Y-C., Han, J., Xu, S., Cobb, M., Skolnik, E. Y. (1997) NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J.* 16, 1279-1290.
- Subramaniam, R., Després, C., Brisson, N. (1997) A functional homolog of mammalian protein kinase C participates in the elicitor-induced defense response in potato. *Plant Cell* 9, 653-664.
- Suzuki, K., Fukuda, Y., Shinshi, H. (1995) Studies on elicitor signal transduction leading to differential expression of defense genes in cultured tobacco cells. *Plant Cell Physiol.* 36, 281-289.

- Suzuki, K., Shinshi, H. (1995) Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant Cell* 7, 639-647.
- Tan, Y., Rouse, J., Zhang, A., Cariati, S., Cohen, P., Comb, M. J. (1996) FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J.* 15, 4629-4642.
- Tang, X. Y., Frederick, R. D., Zhou, J. M., Halterman, D. A., Jia, Y. L., Martin, G. B. (1996) Initiation of plant disease resistance by physical interaction of *avrPto* and *Pto* kinase. *Science* 274, 2060-2063.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.-P., Pugin, A. (1995) Involvement of free calcium in the action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of the hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* 109, 1025-1031.
- Thomma, B. P. H., Eggermont, K., Penninck, I. A. M., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 15107-15111.
- Thornton, J. M., Edwards, M. S., Tayler, W. R., Barlow, D. J. (1986) Location of 'continuous' antigenic determinants in the protruding regions of proteins. *EMBO J.* 5, 409-413.
- Töpfer, R., Schell, J., Steinbiss, H. H. (1988) Versatile cloning vectors for transient gene expression and direct gene transfer in plant cells. *Nucl. Acids Res.* 16, 8725-8728.
- Torres, M. A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. G. (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologs of the human respiratory burst oxidase (*gp91^{phox}*). *Plant J.* 14, 365-370.
- Traverse, S., Gomez, N., Paterson H., Marshall, C. J., Cohen, P. (1992) Sustained activation of the MAP kinase cascade may be required for differentiation of P12 cells. *Biochem. J.* 288, 351-355.
- Traverse, S., Seedorf, K., Paterson H., Marshall, C. J., Cohen, P., Ullrich, A. (1994) EGF triggers neuronal differentiation of P12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Biol.* 4, 694-701.
- Treisman, R. (1996) Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.
- Trewavas, A. J., Malhó, R. (1998) Ca^{2+} signalling in plant cells: the big network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1 (5), 428-433.

- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., Ishida, I. (1997) The structure and function of a soybean β -glucan binding-protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1029-1034.
- Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishimama, R., Machida, Y. (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 8660-8664.
- van de Löcht, U., Meier, I., Hahlbrock, K., Somssich, I. E. (1990) A 125 bp promoter fragment is sufficient for strong elicitor-mediated gene activation in parsley. EMBO J. 9, 2945-2950.
- van den Ackerveken, G. F. J. M., Van Kan, J. A. L., De Wit, P. J. G. M. (1992) Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* fully supports the gene-for-gene hypothesis. Plant J. 2, 359-366.
- van der Biezen, E. A., Jones, J. D. (1998) Plant disease resistance proteins and the gene-for-gene concept. Trends Biochem. Sci. 23, 454-456.
- van Lammeren, A. A. M., Keijzer, C. J., Willemsse, M. T. M., Kieft, H. (1985) Structure and function of the microtubular cytoskeleton during pollen development in *Gasteria verrucosa* (Mill.) H. Duval. Planta 165, 1-11.
- van Loon, L. C. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. Eur. J. Plant Pathol. 103, 753-765.
- van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. Plant Mol. Biol. Rep. 12, 245-264.
- Viard, M. P., Martin, F., Pugin, A., Ricci, P., Blein, J.-P. (1994) Protein phosphorylation is induced in tobacco cells by the elicitor cryptogein. Plant Physiol. 104, 1245-1249.
- Ward, Y., Gupta, S., Wartmann, M., Davis, R. J., Kelly, K. (1994) Control of MAP kinase activation by mitogen-induced threonine/tyrosine phosphatase PAC1. Nature 367, 651-654.
- Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K. (1991) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. EMBO J. 10 (7), 1777-1786.
- Weisshaar, B., Jenkins, G. I. (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. Curr. Opin. Plant Biol. 1 (3), 251-257.
- Welling, G. W., Wiejer, W. J., van der Zee, R., Welling-Webster, S. (1985) Prediction of sequential antigenic regions in proteins. FEBS Lett. 188, 215-218.

- Wendehenne, D., Binet, M.-N., Blein, J.-N., Ricci, P., Pugin, A. (1995) Evidence for specific high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membranes. *FEBS Lett.* 374, 203-207.
- Wevelsiep, L., Kogel, K. H., Knogge, W. (1991) Purification and characterization of peptides from *Rynchosporium secalis* inducing necrosis in barley. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 471-482.
- Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J., Davis, R. J. (1998) A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* 281, 1671-1677.
- Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. (1998) Structural organization of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends Biochem. Sci.* 23, 481-485.
- Wilson, C., Anglmayer, R., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1995) Molecular cloning, functional expression in *Escherichia coli* and characterization of multiple mitogen activated protein kinases from tobacco. *Eur. J. Biochem.* 233, 249-257.
- Wilson, C., Eller, N., Gartner, A., Vicente, O., Heberle-Bors, E. (1993) Isolation and characterization of a tobacco cDNA clone encoding a putative MAP kinase. *Plant Mol. Biol.* 23, 543-551.
- Wirtz, W (1994) Diplomarbeit an der Universität Köln.
- Wong, C., Naumovski, L. (1997) Method to screen for relevant two-hybrid-derived clones by coimmunoprecipitation and colocalization of epitope-tagged fragments - application to Bcl-xL. *Anal. Biochem.* 252, 33-39.
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., Graham, M. W. (1989) Quantitative evaluation of *E. coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucl. Acids Res.* 17, 3469-3478.
- Xu, S., Cobb, M (1997) MEKK1 binds directly to the c-JUN N-terminal kinases/stress-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 272 (51), 32056-32060.
- Yang, P., Chen, C., Wang, Z., Fan, B., Chen, Z. (1999) A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant J.* 18, 141-149.
- Zanke, B. W., Rubie, E. A., Winnett, E., Chan, J., Randall, S., Parsons, M., Boudreau, K., McInnis, M., Yan, M., Templeton, D. J., Woodgett, J. R. (1996) Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. *J. Biol. Chem.* 271, 29876-29881.

- Zell, R., Fritz, H. J. (1987) DNA mismatch-repair in *E. coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* 6, 1809-1815.
- Zhang, S., Du, H., Klessig, D. F. (1998) Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10, 435-449.
- Zhang, S., Klessig, D. F. (1997) Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809-824.
- Zhang, S., Klessig, D. F. (1998a) The tobacco wounding-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7225-7230.
- Zhang, S., Klessig, D. F. (1998b) Resistance gene *N*-mediated *de novo* synthesis and activation of a tobacco mitogen activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7433-38.
- Zhou, J., Loh, Y.-T., Bressan, R. A., Martin, G. B. (1995) The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine protein kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell* 83, 925-935.
- Zhou, J., Tang, X., Martin, G. B. (1997) The Pto kinase conferring resistance to bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J.* 16, 3207-3218.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Franchisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2751-2755.

7 Anhang

Anhang 1: Sequenzen der für PCR-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Bemerkung
MKP5	TAGCGGATCCACATGCTGGGTAAAGGC	für Subklonierung von MPK1 in pGEX-5X-2
MKP6	TAGTGGATCCCCGGCGATGGTCAATACACC	für Subklonierung von MPK1 in pGEX-5X-2
2HP1	ATATGTCGACCTAACCCGGCGAT	für Subklonierung von MPK1 in pBD-HA
2HP2	ATATGTCGACTGCACATGCTGGGTAAAG	für Subklonierung von MPK1 in pBD-HA
SDP1	ATATGGATCCATGGCTAACCCGGCGATG	für Subklonierung von MPK1 in pBT4
SDP2	ATATGGTACCTGCACAGTCTGGGTAAAGGC	für Subklonierung von MPK1 in pBT4
K6fo2	GGATCCATGGCTAACCCAGGCGATGG	für Subklonierung von MPK2 in pGEX-2T-2
K6rev2	GAGCTCGAGTTATGCCATGCCTGGGTAAAGG	für Subklonierung von MPK2 in pGEX-2T-2
K6fo4	GAATTCGCCATGGCTAACCCAGGCGATGG	für Subklonierung von MPK2 in pBT4
K6rev3	GGTACCGGATCCTGCCATGCCTGGGTAAAGG	für Subklonierung von MPK2 in pBT4
K5fo2	GGATCCATGGACGGTTCAACTCAGCC	für Subklonierung von MPK3 in pGEX-2T-2
K5rev2	GAGCTCGAGTTACATCTGCTGATGCTCAGG	für Subklonierung von MPK3 in pGEX-2T-2
K5fo4	GAATTCGCCATGGACGGTTCAACTCAGCC	für Subklonierung von MPK3 in pBT4
K5rev3	GGTACCGGATCCCATCTGCTGATGCTCAGG	für Subklonierung von MPK3 in pBT4
K3fo2	GGATCCATGGAGTCAAGTTCTGCAGCTAC	für Subklonierung von MPK4 in pGEX-2T-2 und pRT100
K3rev2	GGATCCTCAGAGAATCGGGTCAGGATTG	für Subklonierung von MPK4 in pGEX-2T-2 und pRT100

Anhang 2: Sequenzen der für Punktmutagenesen verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Bemerkung
M1	GCATTAGCAATCTTCCGGACCGCAACCATCTC	für MPK1 ^{K72R}
M2	GTGCAAATTGGTTCATTAGCTATATCATGTAAT	für MPK1 ^{D337N}
SDK602	GAGTTTATGACAGAATTTGTTGTCACTAGATGG	für MPK2 ^{Y198F}
SDK604	GATTACATGATGTGTCTAATGAACCAGTTTGC	für MPK2 ^{D336N}
SDK502	GATTTTATGACAGAATTTGTTGTTACAAGATGG	für MPK3 ^{Y214F}
SDK504	CTGCACGACATCAGTAACGAGCCTGTATGTG	für MPK3 ^{D348N}
SDK302	GATTTTATGACTGAATTTGTTGTTACTCGCTGG	für MPK4 ^{Y200F}

Anhang 3: Sequenzen der für die automatische Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Bemerkung
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	-
T7	GTAATACGACTCACTATAGGGC	-
MPK1	TAGAGGGATCAAACGTAAGC	für MPK1
MPK2	GGACGATGAGTTCATGACAG	für MPK1
MPK11	GTGTCCATTAGTTCAGTAGC	für MPK1
KO6fo1	TGTATCAGCTCCTTCGAGGAC	für MPK2
KO6rev1	CACAGACCAAACATCTATAGC	für MPK2
KO5fo1	TCAGAGGAGCATTGCCAGTAC	für MPK3
KO5rev1	GAGTCACACGAGCTAATCC	für MPK3
2HSAD5	AGGGATGTTTAATACCACTAC	für pAD-GAL4
2HSAD3	GCACAGTTGAAGTGAAGTTGC	für pAD-GAL4

Anhang 4: DNA-Sequenz des längsten Petersilie-MPK1-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

3	cacgaggagaagttgagatntagagagagatagtgagaaATGGCTAACCCCGCGATGGT	62
1	M A N P G D G	7
63	CAATACACCGATTTTCCGGCGATTCAAACACACGGAGGACAGTTCATTTCAGTACAATATA	122
8	Q Y T D F P A I Q T H G G Q F I Q Y N I	27
123	TTTGAAATTTATTCCAAGTTACGAAGAAGTATCGGCCTCCGATCATGCCTATTGGCCGT	182
28	F G N L F Q V T K K Y R P P I M P I G R	47
183	GGTGTTCACGGTATCGTCTGTTCATTATGAATACGGAGACGAATGAGATGGTTGCGGTC	242
48	G A Y G I V C S I M N T E T N E M V A V	67
243	AAGAAGATTGCTAATGCTTTTGATAATTACATGGATGCCAAGCGAACTTTGAGGGAGATT	302
68	K K I A N A F D N Y M D A K R T L R E I	87
303	AAGCTTCTTCGTCATTGATCATGAGAATGTCATAGCAATTACTGATGTAATTCCTCCA	362
88	K L L R H L D H E N V I A I T D V I P P	107
363	CCTTTAAGGAGGAATCACTGATGTTTACATTGCTACTGAACTAATGGACTGATCTT	422
108	P L R R E F T D V Y I A T E L M D T D L	127
423	CACCAATCATTTCGATCTAATCAAGGTCTATCAGAGGAACACTGTCAGTATTTCTTGAT	482
128	H Q I I R S N Q G L S E E H C Q Y F L Y	147
483	CAACTGCTTCGAGGACTAAAAATATTCATTCTGCAACATCATCCATCGAGACTTAAAG	542
148	Q L L R G L K Y I H S A N I I H R D L K	167
543	CCCAGCAATTTGTTGTTGAATGCAAACTGTGATCTGAAAATTTGTGATTTGGTCTTGT	602
168	P S N L L L N A N C D L K I C D F G L A	187
603	CGTCATAATACGGACGATGAGTTCATGACAGAATATGTTGTCACTCGATGGTATAGAGCA	662
188	R H N T D D E F M T E Y V V T R W Y R A	207
663	CCTGAGCTGCTGTTGAACTCTCCGATTATACTGTTGCAATAGATGTTTGGTCACTGGGT	722
208	P E L L L N S S D Y T V A I D V W S V G	227
723	TGCATATACATGGAGCTAATGAACAGGAAACCTTTGTTGCGGGTAAAGATCATGTGCAC	782
228	C I Y M E L M N R K P L F A G K D H V H	247
783	CAGATGCGGTTGTTGACCGAGCTTCTTGCCCTACCGACCGAAGCAGATCTTGGATTTGTT	842
248	Q M R L L T E L L G S P T E A D L G F V	267
843	CGAAATGAGGATGCAAAAAGATTTATTCTGCAGCTTCTCGACACCCTCGTCAGCCTCTA	902
268	R N E D A K R F I L Q L P R H P R Q P L	287
903	AGGCAGCTGTATCCACAAGTCCATCCTTTGGCCATTGACCTTATTGATAAAATGCTTACG	962
288	R Q L Y P Q V H P L A I D L I D K M L T	307
963	TTTGATCCCTCTAAAAGAATTACAGTTGAAGAAGCATTAGCCCATCCGTACTIONGCAAGA	1022
308	F D P S K R I T V E E A L A H P Y L A R	327
1023	TTACATGATATAGCTGATGAACCAATTTGCACAAAACCGTTCTCGTTTGAATTTGAGACT	1082
328	L H D I A D E P I C T K P F S F E F E T	347
1083	GCACATCTTGGAGAAGAGCAGATAAAGGACATGATTTACCAGGAGGCATTAGCCTTTAAC	1142
348	A H L G E E Q I K D M I Y Q E A L A F N	367
1143	CCAGACTGTGCATAAAtatattcatagtatgcaccatctgcttgaccctttctgtttcac	1202
368	P D C A *	371
1203	ccctttttttgagatgtacctcaagaagttcattataaagcaattaattgggttagtgtgg	1262
1263	gtgattgaagaagctgaaggcagcagtactgcatgtgacggaaggctaataagcaagtggg	1322
1323	acgcaatacactcagtgccgggattgctttgcttagcagatccaacatattctgtgttct	1382
1383	tgtttactttgattagttttcctttgattagttttccatttttattgcatcttgact	1442
1443	tctgctgacaaatataattttattgtcacactctcattttccgctctctttgttgtaaaa	1502
1503	ctttctgttttagttttttattggaaggagttattttctttggttc	1547

Anhang 5: DNA-Sequenz des längsten Petersilie-MPK2-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

3	cacgaggagagagagaggagaATGGCTAACCCAGGCGATGGTCAGTATGATTTTCCTGCG	62
1	M A N P G D G Q Y D F P A	13
63	ATTGCAACGCATGGAGGACGCTTCATTTCAGTACAATATATTTGAAAATTTGTTTCGAGGTG	122
14	I A T H G G R F I Q Y N I F E N L F E V	33
123	ACTGCTAAGTATCGCCCTCCGATCATGCCTATAGGCCGTGGTGCTTACGGAATGTCTGT	182
34	T A K Y R P P I M P I G R G A Y G I V C	53
183	TCGATTATGAATACGGAGGCGAATGAGATGGTTGCGATTAAGAAGATTGCGAATGCTTTT	242
54	S I M N T E A N E M V A I K K I A N A F	73
243	GATAATTACATGGATGCCAAAAGAACTCTGAGGGAGATTAAGCTTCTTCGTCATTTGGAT	302
74	D N Y M D A K R T L R E I K L L R H L D	93
303	CATGAGAATATCATAGCTTTAACAGATGTAATTCCTCCACCTGTAAGGAGGAATTTTCAGT	362
94	H E N I I A L T D V I P P P V R R N F S	113
363	GATGTTTATATGCTACCGAACTTATGGACACTGATCTTCACCAGATCATTTCGATCTGCT	422
114	D V Y I A T E L M D T D L H Q I I R S A	133
423	CAGGTTTTATCAGAGGAGCATTCTCAGTATTTCTTGATCAGCTCCTTCGAGGACTAAAA	482
134	Q V L S E E H S Q Y F L Y Q L L R G L K	153
483	TATATACATTCTGCAAACATAATCCACCGAGACTTGAAGCCTAGCAACCTTCTACTGAAT	542
154	Y I H S A N I I H R D L K P S N L L L N	173
543	GCCAAATGTGATCTGAAGATTTGTGATTTTGGTCTCGTCTCGTCCAAACTGATGATGAG	602
174	A N C D L K I C D F G L A R P N T D D E	193
603	TTTATGACAGAATATGTTGTCACTAGATGGTATAGAGCGCCTGAGCTGCTATTGAACTCT	662
194	F M T E Y V V T R W Y R A P E L L L N S	213
663	TCTGATTATACTGCTGCTATAGATGTTTGGTCTGTGGTTGTATCTACATGGAGCTAATG	722
214	S D Y T A A I D V W S V G C I Y M E L M	233
723	AACAGAACGCCTTTATTTGCCGGTAGAGATCATGTGCACAAAATGCGATTGTTGACTGAG	782
234	N R T P L F A G R D H V H K M R L L T E	253
783	TTGCTTGCAGCACCAACTGAGCCCGATCTTGGATTTGTTTCAAATGAAGATTCAAGAAGA	842
254	L L A A P T E P D L G F V R N E D S R R	273
843	TATATTCTGCAGCTTCTCGACGTCCTCGTCTGTCTACTAAGAATGCTTTATCCACAAGTC	902
274	Y I L Q L P R R P R L S L R M L Y P Q V	293
903	CATCCTGTAGCCATCGACCTCATTGATAAAATGCTTACATTTGATCCCTCCAAAAGAATT	962
294	H P V A I D L I D K M L T F D P S K R I	313
963	ACAGTGAAGAAGCATTAGCTCATCCCTATCTGGAGAGATTACATGATGTGTCTGATGAA	1022
314	T V E E A L A H P Y L E R L H D V S D E	333
1023	CCAGTTTGCTCAAAACCGTTCTCGTTTGAGTTTGAGACGGCACATCTTGAGAAGAACAG	1082
334	P V C S K P F S F E F E T A H L G E E Q	353
1083	ATAAAGAGATGATTTACCAGGAGGCCTTATCCTTTAACCCAGGCATGGCATAAcatata	1142
354	I K E M I Y Q E A L S F N P G M A *	370
1143	gcctccattggaacccttccctttttcctttcgaatatttcaaagaaaaatggtatgat	1202
1203	atatgaagaaatgaatctgtagtgagtgctgaagaaagcagtttcaatctgataaaaa	1262
1263	ctcatcaaaaagcaacagcatggaaaacatttgaggtgtgttttcttagcggattctaga	1322
1323	gatccctgctctgggtcaactttatcagtttctttgttttggttttgtccttgcattcttt	1382
1383	gctgacagatgaacttccagccttaatttctgtttatccatttgcccgtttcttttt	1442
1443	tacaaatattttttgttgaaggattccattcctttgtttcattatgatgttcataccc	1502
1503	aggtatatgaaatgtagcatgtattttaaccatattatgttgagcacatcatattgta	1562
1563	cttaaaactctctgtcataacatagctctcaatttgtttgttcatcaaaaaaaaaaaaaa	1622
1623	aaaaaa	1628

Anhang 6: DNA-Sequenz des längsten Petersilie-MPK3-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

2	ggcacgagccgagatcttcaaaacacacacgcacacactttgtatctaATGGACGGTTCA	61
1		4
		M D G S
62	ACTCAGCCATCCGACACCGTGATGTCCGACGCAGCTCCGGCATCTCAAACCGCCGGGATC	121
5	T Q P S D T V M S D A A P A S Q T A G I	24
122	GAGAATATTCCGGCGAGTCTGAGCCACGGCGGGCGTTTCATTAGTACAACATCTTCGGT	181
25	E N I P A S L S H G G R F I Q Y N I F G	44
182	AACATCTTCGAAGTGACTGCTAAGTATAAGCCTCCTATCTTGCCTATCGGTAAAGGCGCT	241
45	N I F E V T A K Y K P P I L P I G K G A	64
242	TATGGCATCGTTTGTTCGGCGTTGAATTTGGAGACGAATGAACACGTGGCAATTAAGAAG	301
65	Y G I V C S A L N L E T N E H V A I K K	84
302	ATTGCTAATGCTTTCGATAATAAAGTCGATGCTAAGAGGACTTTGCGCGAGATTAAGCTT	361
85	I A N A F D N K V D A K R T L R E I K L	104
362	CTTCGCCACATGGATCAGAAAATGTTGTTGCAATTAGAGATATTATACCGCCACCTCAG	421
105	L R H M D H E N V V A I R D I I P P P Q	124
422	AGGGGGTCATTTAATGATGTGTACATTGCATATGAGCTTATGGATACAGATCTCCATCAA	481
125	R G S F N D V Y I A Y E L M D T D L H Q	144
482	ATTATTCGTTCAAACCAAGGGCTATCAGAGGAGCATTGCCAGTACTTTTGTATCAGATC	541
145	I I R S N Q G L S E E H C Q Y F L Y Q I	164
542	CTCCGGGGGTTGAAATACATACATTCTGCAAACGTTTACATAGAGACTTGAAACCCAGC	601
165	L R G L K Y I H S A N V L H R D L K P S	184
602	AATCTGCTTTTAAATGCCAATGTGATCTTAAATATGTGATTTTGGATTAGCTCGTGTG	661
185	N L L L N A N C D L K I C D F G L A R V	204
662	ACTTCCGAAACTGATTTTATGACAGAATATGTTGTTACAAGATGGTACAGAGCACCAGAG	721
205	T S E T D F M T E Y V V T R W Y R A P E	224
722	CTATTATTAATTCATCTGATTATACTGCTGCCATTGATGTATGGTCAGTGGGATGCATT	781
225	L L L N S S D Y T A A I D V W S V G C I	244
782	TTCATGGAGTTGATGGACAGGAAGCCTTTATTTCTGGCAGAGATCACGTACACCAACTC	841
245	F M E L M D R K P L F P G R D H V H Q L	264
842	CGATTGCTGATGGAGCTGATTGGCACACCTTCAGAGGCGGAACTAGAGTTTCTGAATGAA	901
265	R L L M E L I G T P S E A E L E F L N E	284
902	AATGCAAAAAGATACATTAGGCGACTTCCTCTTATCGTCGGCAGTCACTGACTGAAAAA	961
285	N A K R Y I R Q L P L Y R R Q S L T E K	304
962	TTTCCAAATGTTTCATCCTTCTGCTATAGATCTTGTGAGAAGATGTTGACATTTGATCCT	1021
305	F P N V H P S A I D L V E K M L T F D P	324
1022	AGAAGGAGACTTACAGTTGAAGATGCACTGGCACATCCCTACCTCACGTCACTGCACGAC	1081
325	R R R L T V E D A L A H P Y L T S L H D	344
1082	ATCAGTGACGAGCCTGTATGTGCTGCTCCTTTTAGCTTTGACTTTGAACAGCATGCATTG	1141
345	I S D E P V C A A P F S F D F E Q H A L	364
1142	ACTGAAGAACAGATGAGGGAGCTAATCTACAGAGAGGCTCTCGCATTCAATCCTGAGCAT	1201
365	T E E Q M R E L I Y R E A L A F N P E H	384
1202	CAGCAGATGTAAggaactaattgggtgtttgtttggtgggacttgtggttacaactggtg	1261
385	Q Q M *	387
1262	tgttctgtttttttttttttctcataattttccccatgacattctcatggatgatggc	1268
1322	actggaatttgagagatactgatgtggaatggtaattagatttttcaattattaaattt	1381
1382	tcagcttgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1389

Anhang 7: DNA-Sequenz des längsten Petersilie-MPK4-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

3	cacgagaaaaaaagttatgcattcacacgtgaaattgtcacccttcacggatgatcatgt	62
63	cttttttagttcaaaaaagagtgccctttttcacaattcacagtttctttcttactttt	122
123	cttgattttctatatttttccagtgtaaaaaatgtcacacccgtcttccattttccaccata	182
183	atccactaaagaaatgtcaacaacttgattggaaaatacccttctcttcttccctaaat	242
243	ttagtagcttcttgttcttgttttgttctaaattgtcttcttggttgagtttctgagtaa	302
303	ttttctgttttgggggttaatttttttggttaagtagaggaatctATGGAGTCAAGTTCT	362
1	M E S S S	5
363	GCAGCTACAGCTGATCATAACATATCAAAGGTGTGCCTACTCATGGTGGACGCTATGTT	422
6	A A T A D H T H I K G V P T H G G R Y V	25
423	CAGTACAATGTGTATGGTAATCTCTTTGAAGTTTCTCGAAAATATGTTCTCCAATCCGC	482
26	Q Y N V Y G N L F E V S R K Y V P P I R	45
483	CCTGTCGGCCGTGGCGCTTATGGTATAGTTTGTGCTGCTATGAACTCTGATACGCGTGAG	542
46	P V G R G A Y G I V C A A M N S D T R E	65
543	GAGTTGCCATCAAGAAAATTGGTAATGCATTGACAAATCGAATAGATGCCAAAAGGACA	602
66	E V A I K K I G N A F D N R I D A K R T	85
603	CTTCGGGAAATTAACCTCTTCGTCACATGAATCATGAAAATGTAATTGCAATTAAGAC	662
86	L R E I K L L R H M N H E N V I A I K D	105
663	ATCATAAGGCCTCCACAGATTGAAAGTTTCAATGATGTTTACATTGTTTACGAACTGATG	722
106	I I R P P Q I E S F N D V Y I V Y E L M	125
723	GACACAGATCTTCATCAAATAATTCGCTCTAACCAGCAACTCACTGATGATCATTGTCGG	782
126	D T D L H Q I I R S N Q Q L T D D H C R	145
783	TATTTTCTTTACCAACTATTGCGAGGACTGAAATATGTTTCTGCAAAATGCTCTGCAT	842
146	Y F L Y Q L L R G L K Y V H S A N V L H	165
843	CGTGATTTAAAGCCGAGCAATTTGCTCCTCAATGCAAATTTGTGACCTAAAAATGGAGAT	902
166	R D L K P S N L L L N A N C D L K I G D	185
903	FTCGGCCTTGCAAGGACAACCTCTGAAACTGATTTTATGACTGAATATGTTGTTACTCGC	962
186	F G L A R T T S E T D F M T E Y V V T R	205
963	TGGTACCGAGCACCAGAATTGCTCCTTAATTGCTCAGAGTATACTGCAGCAATGATATC	1022
206	W Y R A P E L L L N C S E Y T A A I D I	225
1023	TGGTCAAGTTGGTTGCATACTTGGTGAAGTTATGACCAGACAGCCCCTGTTCCCTGGGAAA	1082
226	W S V G C I L G E V M T R Q P L F P G K	245
1083	GATTATGTTTCATCAGCTGAGACTAATTAAGTACTGAGCTCATAGGTTACCTGATGATGCCAGT	1142
246	D Y V H Q L R L I T E L I G S P D D A S	265
1143	CTTGGATTCTCAGAAGTGATAATGCTCGAAGATACGTGAGGCAGCTTCCCCAGTATCCA	1202
266	L G F L R S D N A R R Y V R Q L P Q Y P	285
1203	AAGCAACAATCTCTGCTAGATTTCTTAACAAATCTCCTGGAGCTCTAGATTTGCTGGAA	1262
286	K Q Q F S A R F L N K S P G A L D L L E	305
1263	AAAATGCTAATCTTTGATCCCAACAGGCGCATTACAGTTGACGAGGCCTTTGCCACCCA	1322
306	K M L I F D P N R R I T V D E A L C H P	325
1323	TACTTGGCAGCTCTTCATGACATAAACGAGGAACTGTTTGTCTCGCCCTTTTAGTTTT	1382
326	Y L A A L H D I N E E P V C P R P F S F	345
1383	GACTTTGAGCAGCCAACGTGCACTGAAGAAAATATCAAGGAACTTATCTGGAAGGAATCT	1442
346	D F E Q P T C T E E N I K E L I W K E S	365
1443	GTGAAGTTCAATCCTGACCCGATTCTCTGAgatcatgttatagtgattggttatcaaatg	1502
366	V K F N P D P I L *	374
1503	aatattatagatggttgaacatgaattaatattgtatcaaaactaattaagaatgatcct	1562
1563	caagtagaattgatcaataaataagaatggatatactgagggtaaccaggttgttccca	1622
1623	ctattgaaattaagattcatttgtcattcttaacttgaaatatccaatgctgcagctct	1682
1683	gagttgcagattattttaagcttttactttggtgcaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	1736

Anhang 8: DNA-Sequenz des längsten Petersilie-MPK5-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

1	GCACGAGCAGATCTTCATCAGATAAATCGCTCTAACCAACAACCTTACAGATGATCATTGC	60
1	A R A D L H Q I I R S N Q Q L T D D H C	20
61	AGGTATTTTCTTACCAGCTTTGCGAGGACTGAAGTATGTTTATTCTGCAAATGCTCTG	120
21	R Y F L Y Q L L R G L K Y V H S A N V L	40
121	CACCGTGACTTGAAGCCTAGCAATCTGCTCCTCAATGCAAATTGTGACTTGAAAATTGGA	180
41	H R D L K P S N L L L N A N C D L K I G	60
181	GATTTCCGGTCTTGCAAGGACAACCTTCTGAAACTGATTTTATGACTGAAATATGTTGTTACT	240
61	D F G L A R T T S E T D F M T E Y V V T	80
241	CGCTGGTACCGGGCCCCTGAATTGCTCCTTAATGCTCAGAGTACACTGCAGCAATTGAT	300
81	R W Y R A P E L L L N C S E Y T A A I D	100
301	ATCTGGTCAGTTGGTTGCATACTCGGTGAGATTATGACCAGACAGCCCTTGTCCCTGGC	360
101	I W S V G C I L G E I M T R Q P L F P G	120
361	AAAGATTATGTTTATCAGCTGAGACTTATTACCGAGCTCATAGGTTACCTGACGATGCC	420
121	K D Y V H Q L R L I T E L I G S P D D A	140
421	AGTCTTGGGTTTCTCAGAAGTGATAATGCCCGAGATACGTGAGGCAGCTTCCCCAGTAT	480
141	S L G F L R S D N A R R Y V R Q L P Q Y	160
481	CCAAGGCAACTATTCTCAGCTAGATTTCTTAACAAATCTCCAGGAGCTCTAGATTTGCTG	540
161	P R Q L F S A R F L N K S P G A L D L L	180
541	GAGAAAATGCTCATCTTTGATCCCAACCGGCGTATTACAGTTGATGAGGCACTCTGCCAC	600
181	E K M L I F D P N R R I T V D E A L C H	200
601	CCATACTTGGCACCTCTTACGATATTAACGAGGAGCCTGTTTGTCTCAGCCTTTTAGT	660
201	P Y L A P L H D I N E E P V C P Q P F S	220
661	TTGACTTTGAGCAGCCATCATGCACCGAAGAGAATATCAAGGAACCTCATCTGGAGGGAA	720
221	F D F E Q P S C T E E N I K E L I W R E	240
721	TCTGTTAAATCAATCCTGACCCGATTTATTAAGGAGTTCATTTGCTAAGTGAGTGTG	780
241	S V K F N P D P I Y *	250
781	ttgaatgctgtagatatttgcagtggaacacatttaagaattatcctcaagtagatc	840
841	tgatcaaataaacagagtggataaattgcgattcatttatcatccttgtaattctgag	900
901	ctgcgtagactagtagagttcatagttggtgctctttgcagagtattctctctttttat	960
961	cttggtggtggaagatctttccgaaaatgtagtcagttttaaactggttcttttaaaa	1020
1021	aaaaaaa	1027

Anhang 9: DNA-Sequenz des Petersilie-2H1-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

1	GGCACGAGGGCTAATGTTTCATGATTCTTTGCCTCCGCGTGACGATCATTTTCATATCATA	60
1	G T R A N V H D S L P P R D D H F I S Y	20
61	TCAACTCCTCTCCAACAAGTTAACCTTAGTAAAAACCAGAAACCGAAATTATTC AAGTCT	120
21	S T P L Q Q V N L S K N Q K P K L F K S	40
121	TTTCATCTTTTACTGACGTAAACAAGAAGAATCTAGCACCAGTGCAATCTTCTAGCCAT	180
41	F H S F T D V N K K N L A P V Q S S S H	60
181	GAGGATACGGACAAGAAGAAGAAGAATTCGGGTATACGAAATATATTTGGTAAGCCG	240
61	E D T D K K K K K N S G I R N I F G K P	80
241	AGTAAAAGAAGTGATTATGAGCCGCCTTTGACAGCTCCTTCTGATAAAAAAGGCACCTAGT	300
81	S K R S D Y E P P L T A P S D K K A P S	100
301	TTAGGTCAACTGCAACGATTTTCGAGTGGTCGAAATTCGTTATCGAATTTTGATTGGACG	360
101	L G Q L Q R F S S G R N S L S N F D W T	120
361	ACTGCACAGATATCTCCGGCAGAGGAGCATGATGATGAGAGCGACGCAGAGTGGGATGAA	420
121	T A Q I S P A E E H D D E S D A E W D E	140
421	GAAGATGCCAAGATATCGTTTTTCAGCACCGATAAGTTTGAGTAGCTGCAGTGTGGCTAAT	480
141	E D A K I S F S A P I S L S S C S V A N	160
481	GTAGAGCCGAGAAAAGAGATTAATTTGTGGAAGAGAAGAACTATGCCTCAACCTAAGCCT	540
161	V E P R K E I N L W K R R T M P Q P K P	180
541	CCTCAACTTAATACTTGAcctcatgtaaggaccatcaccccnnnnnnnnnnggttga	600
181	P Q L N T *	185
601	cctcagaagatttgtttatcctttaatattgttttacagattctatttcttttgaatta	660
661	agttttgatgcttgatgaatcaggcttgacataaattgcttacttaaacagattattat	720
721	ttgccccaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	726

Anhang 10: DNA-Sequenz des Petersilie-2H4-cDNA-Klons und abgeleitete Aminosäuresequenz des längsten offenen Leserahmens.

1	AAGCTGGGTCCGTCTACTAACAGTGCTCCCATCTTGAAGATTCAAAGGGGTGACATCACC	60
1	K L G R S T N S A P I L K I Q R G D I T	20
61	CGATGGTTTGTGATGCCTCTTCCGATGCTATTGTTAATCCGGCCAATGAGCGAATGCTT	120
21	R W F V D A S S D A I V N P A N E R M L	40
121	GGTGGTGGTGGTGCTGATGGTCTATTTCATAGAGCTGCTGGTCCGGAACCTCAGAGAATCA	180
41	G G G G A D G A I H R A A G P E L R E S	60
181	TGCTATAGTGTGCCTGAAGTTCGACCTGGAGTCCGCTGCCAACTGGAGAAGCAAGGATC	240
61	C Y S V P E V R P G V R C P T G E A R I	80
241	ACCCAGGATTTCCGTTGCCAGCCTCTCATGTTATTACACTGTTGGGCCAATATATGAT	300
81	T P G F R L P A S H V I H T V G P I Y D	100
301	GTTGATAGCAACCCTGCAGCCTCTTTAAGAGGCTCATAAGAAACAGTTTGCATGTTGCT	360
101	V D S N P A A S L R G S Y R N S L H V A	120
361	AAAGACAACAACATTAAGTTTATCGCGTTTCTGCCATATCTTGGGTTTATGGATAT	420
121	K D N N I K F I A F P A I S C G V Y G Y	140
421	CCTTATGGCGAAGCTGCAACTCTGGCTATATCAACAGTTAAAGAGTACGCAAATGGCCTC	480
141	P Y G E A A T L A I S T V K E Y A N G L	160
481	AATGAGGTGCATTTCTGCTTTGTTGAGGAATCTGTTTACAATGTTTGGTTAAGCAAGGCA	540
161	N E V H F V L F E E S V Y N V W L S K A	180
541	AATGAATTGCTCCAACTTAGtgctcacgttttgcattcaaaatggcattaatctgctta	600
181	N E L L Q T *	186
601	gatgttttttgggatcaagaatgcagaaaatggagtttaggtttgaggttaaatatgtcaa	660
661	cttgattgcattcaagctactggacctctggtattatgaatgaatatgtgtaacaccac	720
721	gctctgatttaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa	731

Lebenslauf

Name: Thomas Kroj

Geburtsdatum: 27. Oktober 1968

Geburtsort: Köln

Nationalität: deutsch

Anschrift Gustav Hertzberg Str. 2
06110 Halle

1974-78 Besuch der Grundschule Sinthern/Geyen (Nordrhein-Westfalen)

1978-87 Besuch des Gymnasiums Brauweiler (Nordrhein-Westfalen)

1987-89 Zivildienst

1989-95 Studium der Chemie und Biologie an der Universität Köln

Abschlüsse: Vordiplom Chemie 1991

Vordiplom Biologie 1992

Diplom Chemie 1995

1994-95 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln

Titel der Arbeit: "Untersuchungen zur Rolle der Jasmonsäure als Signalsubstanz bei der Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie"

Betreuer: Dr. Dierk Scheel

1995-1999 Promotion am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, Saale

Betreuer: Prof. Dr. Dierk Scheel

während dieser Zeit wissenschaftlicher Angestellter

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich mich mit der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken inhaltlich oder wörtlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, im Juli 1999

Thomas Kroj

Teile der vorgelegten Arbeit wurden aus Prioritätsgründen bereits in der unten angegebenen Veröffentlichung publiziert:

Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense in plants. *Science* 276, 2054-2057.