

„Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-
Mutanten *pen2erp2* und *pen2erp6*“

D i s s e r t a t i o n

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

vorgelegt der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg



von

Frau Dipl.-Ing. (FH) Katrin Geißler
geboren am 08.05.1984 in Halle (Saale)

Gutachter

1. Prof. Dr. Dierk Scheel, Martin-Luther-Universität Halle
2. Prof. Dr. Holger Deising, Martin-Luther-Universität Halle
3. Prof. Dr. Volker Lipka, Georg-August-Universität Göttingen

Datum der Verteidigung: 01.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Pflanzliche Pathogenabwehr.....	1
1.1.1 Pflanzliche Pathogenperzeption	3
1.1.2 Rolle der MAPK-Kaskaden in der Pathogenabwehr	5
1.1.3 Nichtwirtsresistenz	7
1.1.4 Wirtsresistenz.....	12
1.1.5 Bedeutung der putativen Kinase EDR1 für die pflanzliche Abwehrreaktion	16
1.2 Nichtwirtsresistenz von <i>A. thaliana</i> gegen <i>P. infestans</i>.....	22
1.2.1 <i>Phytophthora infestans</i> (Mont.) de Bary	22
1.2.2 Interaktion von <i>A. thaliana</i> mit <i>P. infestans</i>	23
1.3 Ziele der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Isotope, Oligonukleotide.....	25
2.1.2 Pflanzen	25
2.1.3 <i>Phytophthora infestans</i>	25
2.1.4 Bakterienstämme	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Pflanzenanzucht.....	26
2.2.2 Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.2.3 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
2.2.4 Oberflächensterilisierung.....	27
2.2.5 Erhaltung von <i>Phytophthora infestans</i>	27
2.2.6 Herstellung einer Zoosporensuspension	27
2.2.7 Inokulationsexperimente mit <i>Phytophthora infestans</i>	28
2.2.8 Trypanblau- und Anilinblaufärbung von Arabidopsisblättern	28
2.2.9 Sequenzierung des Gesamtgenoms der <i>erp</i> -Mutanten	29
2.2.10 Isolierung von genomischer DNA	29
2.2.11 PCR und Kolonie-PCR	29
2.2.12 Restriktionsverdau.....	30
2.2.13 Elution von DNA-Fragmenten.....	30

2.2.14	Klonierung	31
2.2.15	Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen.....	31
2.2.16	Sequenzspezifische Mutagenese	31
2.2.17	Isolierung von Plasmid-DNA und Herstellung von Glycerolstocks	32
2.2.18	Isolierung von RNA aus Pflanzen	32
2.2.19	Microarray-Analysen	32
2.2.20	Northern Blot	33
2.2.21	cDNA-Synthese.....	34
2.2.22	Rekombinante Proteinexpression in <i>Escherichia coli</i>	34
2.2.23	Proteinaufreinigung	34
2.2.24	SDS-PAGE	36
2.2.25	Western Blot.....	37
2.2.26	Pro-Q Diamond-Färbung von Proteingelen	37
2.2.27	Radioaktiver <i>in vitro</i> Phosphorylierungsassay	38
2.2.28	Identifizierung von Phosphorylierungsstellen.....	38
2.2.29	Wachstumsassays nach PAMP-Behandlung.....	39
2.2.30	Wachstumsassay mit Bakterien.....	40
2.2.31	Mikroskopische Auswertungen	41
2.2.32	Quantifizierung der Zelltodreaktion und Transkriptmenge.....	41
2.2.33	Statistische Auswertungen	41
3.	Ergebnisse	42
3.1	Charakterisierung von <i>pen2-1erp2</i>	42
3.1.1	Morphologie	42
3.1.2	Phänotyp nach <i>P. infestans</i> – Inokulation.....	42
3.1.3	Ansätze zur Identifizierung von <i>ERP2</i>	44
3.1.4	Interaktion von <i>pen2-1erp2</i> mit verschiedenen <i>P. syringae</i> -Stämmen	45
3.1.5	Computer-gestützte Auswertung der Microarray-Experimente	47
3.1.5.1	Konstitutiv veränderte Gene.....	48
3.1.5.2	Nach <i>P. infestans</i> -Behandlung differentiell exprimierte Gene.....	49
3.1.5.3	Überprüfung von Microarray-Ergebnissen durch Northern Hybridisierung.....	51
3.1.5.4	Untersuchung von Kandidatengenem	53
3.2	Charakterisierung von <i>pen2-1erp6</i> und Identifizierung der Mutation in <i>ERP6</i> ...	54
3.2.1	Morphologie der <i>pen2-1erp6</i> -Mutante	54
3.2.2	Phänotyp von <i>pen2-1erp6</i> nach <i>P. infestans</i> – Inokulation	54
3.2.3	<i>pen2-1erp6</i> trägt eine Mutation in <i>EDR1</i>	55
3.2.3.1	Kartierung der <i>erp6</i> -Mutation	55
3.2.3.2	HR-Phänotyp und Morphologie verschiedener <i>edr1</i> -Mutanten.....	56
3.2.3.3	Zellulärer Phänotyp der <i>edr1</i> -Mutanten nach <i>P. infestans</i> – Inokulation.....	59
3.2.3.4	Kreuzung von <i>pen2-1edr1-1</i> mit <i>pen2-1erp6</i>	60

3.2.3.5	Erzeugung einer <i>pen2-1edr1-2</i> -Mutante	62
3.2.3.6	Komplementationsanalysen	62
3.2.4	Detailliertere Charakterisierung der <i>erp6</i> -Mutante	63
3.2.4.1	Auswirkung der <i>erp6</i> -Mutation auf die <i>EDR1</i> -Transkriptakkumulation.....	63
3.2.4.2	Einfluss der <i>erp6</i> -Mutation auf die Kinaseaktivität von <i>EDR1</i>	63
3.2.4.3	Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der <i>EDR1</i> -Kinasedomäne	66
3.2.4.4	Untersuchung der <i>PR1</i> - und <i>PDF1.2</i> -Expression.....	66
3.2.4.5	Salizylsäure-Abhängigkeit des HR-Phänotyps nach <i>P. infestans</i> -Behandlung	68
3.2.5	Untersuchungen zur Funktion von <i>EDR1</i>	70
3.2.5.1	Analyse potentieller <i>EDR1</i> -Substrate.....	70
3.2.5.2	Bedeutung von <i>EDR1</i> für die Immunantwort auf PAMPs	72
3.2.5.3	Bakterien-Wachstumsassay mit <i>Pto</i> DC3000.....	74
3.2.5.4	Rolle von <i>EDR1</i> in der prä-invasiven Resistenz gegen <i>P. infestans</i>	75
4.	Diskussion.....	76
4.1	Bedeutung von <i>EDR1</i> in der Interaktion von <i>A. thaliana</i> mit dem nicht-adaptierten Pathogen <i>P. infestans</i>.....	76
4.2	Beteiligung verschiedener Komponenten an der Ausprägung des Phänotyps der <i>edr1</i>-Mutanten.....	82
4.3	Einfluss der Aminosäuresubstitution in <i>erp6</i> auf die Funktion von <i>EDR1</i>	85
4.4	Untersuchung putativer Substrate für <i>EDR1</i>	88
5.	Zusammenfassung	93
6.	Anhang	95
7.	Literaturverzeichnis.....	104
	Danksagung	115
	Eidesstattliche Erklärung.....	116
	Lebenslauf.....	117

Abkürzungsverzeichnis

ABA	engl. <i>abscisic acid</i> ; Abscisinsäure
ABC-Transporter	engl. <i>ATP binding cassette</i> -Transporter
<i>Avr</i> -Gen	Avirulenz-Gen
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> ; Echter Mehltau
CAPS	engl. <i>cleaved amplified polymorphic sequences</i>
CC-NB-LRR	engl. <i>coiled coiled-nucleotide binding-leucine rich repeat</i>
cfu	engl. <i>colony forming units</i> ; koloniebildende Einheiten
CRN-Proteine	engl. <i>crinkling and necrosis inducing</i> -Proteine
D/M/PAMP	engl. <i>damage/microbe/pathogen-associated molecular pattern</i>
dpi	engl. <i>days post inoculation</i> , Tage nach (Pathogen)Inokulation
EFR	EF-Tu-Rezeptor, Rezeptor für elf18
ETI	engl. <i>effector-triggered immunity</i> ; Effektor-induzierte Immunität
ETS	engl. <i>effector-triggered susceptibility</i> ; Effektor-induzierte Suszeptibilität
erp	engl. <i>enhanced response to Phytophthora infestans</i>
FLS2	engl. <i>Flagellin-sensing2</i> ; Rezeptor für flg22
f. sp.	latein. <i>forma specialis</i>
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i>
HR	engl. <i>hypersensitive response</i> , Hypersensitive Reaktion
JA	engl. <i>jamsonic acid</i> , Jasmonsäure
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MBP	Maltose-Bindeprotein
MKK/MPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kinase
MKKK/MEKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kinase-Kinase
MPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MyBP	<i>Myelin Basic Protein</i>
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
PR-Gene	engl. <i>pathogenesis related</i> -Gene
PRR	engl. <i>pattern recognition receptor</i> , Mustererkennungsrezeptor
PTI	engl. <i>PAMP triggered immunity</i> , PAMP-induzierte Immunität
<i>R</i> -Gen/ <i>R</i> -Protein	Resistenz-Gen/Protein
ROS	engl. <i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RXLR-Proteine	Effektorproteine mit einem konservierten RXLR-dEER Aminosäure-Motiv
SA	engl. <i>salicylic acid</i> ; Salizylsäure
TIR-NB-LRR	engl. <i>Toll/Interleukin1 like-nucleotide binding-leucine rich repeat</i>
Y2H	engl. <i>yeast two hybrid</i> ; Hefe-2-Hybrid-System

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Zick-Zack-Modell nach Jones und Dangl.....	2
Abbildung 1.2: Rezeptorkomplexbildung nach flg22-Perzeption.....	6
Abbildung 1.3: Aktivierte MAPK-Kaskaden nach flg22-Applikation in <i>A. thaliana</i>	7
Abbildung 1.4: PEN1, PEN2 und PEN3 in der Abwehrreaktion von Arabidopsis gegen <i>Bgh</i>	9
Abbildung 1.5: Interaktion der Komponenten EDS1, PAD4 und SAG101	11
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Struktur diverser <i>P. infestans</i> -Effektoren	15
Abbildung 1.7: Beteiligung von EDR1 an der Reaktion auf (a)biotische Faktoren	22
Abbildung 2.1: Ermittlung konstitutiv differentiell exprimierter <i>erp2</i> -spezifischer Gene	33
Abbildung 2.2: Ermittlung differentiell exprimierter <i>erp2</i> -spezifischer Gene nach <i>P. infestans</i> -Inokulation	33
Abbildung 3.1: Morphologie der <i>pen2-1erp2</i> -Mutante	42
Abbildung 3.2: Phänotyp der <i>pen2-1erp2</i> -Mutante nach <i>P. infestans</i> -Inokulation.....	43
Abbildung 3.3: Quantifizierung der Reaktion von <i>pen2-1erp2</i> nach <i>P. infestans</i> -Inokulation.	43
Abbildung 3.4: Lichtmikroskopische Analysen von <i>pen2-1erp2</i> nach Trypanblau- und Anilinblaufärbung.....	44
Abbildung 3.5: Wachstum verschiedener Pseudomonas-Stämme auf <i>pen2-1erp2</i>	47
Abbildung 3.6: Nach Wasserbehandlung differentiell exprimierte Gene in <i>pen2-1</i> und <i>pen2-1erp2</i>	48
Abbildung 3.7: Differentiell exprimierte Gene in <i>pen2-1</i> und <i>pen2-1erp2</i> nach <i>P. infestans</i> -Behandlung	49
Abbildung 3.8: Übersicht der <i>pen2-1erp2</i> -spezifischen, nach <i>P. infestans</i> -Inokulation veränderten Gene	50
Abbildung 3.9: Einteilung der 6h nach <i>P. infestans</i> -Behandlung in <i>pen2-1erp2</i> differentiell exprimierten Gene in Funktionsklassen.....	51
Abbildung 3.10: Überprüfung der Microarray-Ergebnisse für <i>PR1</i> und <i>PR2</i>	52
Abbildung 3.11: Morphologischer Phänotyp der <i>pen2-1erp6</i> -Mutante	54
Abbildung 3.12: Phänotyp der <i>pen-1erp6</i> -Mutante nach <i>P. infestans</i> -Inokulation	55

Abbildung 3.13: Darstellung der verstärkten Reaktion von <i>pen2-1erp6</i> nach <i>P. infestans</i> -Inokulation.....	55
Abbildung 3.14: Nachweis der <i>pen2-1erp6</i> -Mutation und Position der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten <i>EDR1</i> -Mutationen	56
Abbildung 3.15: HR-Phänotyp der verschiedenen <i>edr1</i> -Mutanten nach <i>P. infestans</i> -Behandlung	57
Abbildung 3.16: Vergleich der Reaktion von <i>pen2-1erp6</i> und <i>pen2-1edr1-1</i> auf <i>P. infestans</i>	58
Abbildung 3.17: Morphologie der verschiedenen <i>edr1</i> -Mutanten	59
Abbildung 3.18: Lichtmikroskopische Analyse verschiedener <i>edr1</i> -Mutanten	60
Abbildung 3.19: Phänotypische Analyse von Pflanzen aus der Kreuzung von <i>pen2-1erp6</i> mit <i>pen2-1edr1-1</i>	61
Abbildung 3.20: Quantifizierung der Reaktion der <i>pen2-1edr1-2</i> -Mutante nach <i>P. infestans</i> -Behandlung	62
Abbildung 3.21: Analyse der <i>EDR1</i> -Transkriptakkumulation.....	63
Abbildung 3.22: Überexpression der Kinasedomäne aus <i>EDR1</i> in <i>E. coli</i>	64
Abbildung 3.23: Aufreinigung der <i>EDR1</i> -Kinasedomäne	64
Abbildung 3.24: Untersuchung der Phosphorylierungsaktivität der <i>EDR1</i> -Kinasedomäne	65
Abbildung 3.25: Schematische Darstellung identifizierter Phosphorylierungsstellen in der Kinasedomäne von <i>EDR1</i> aus Wildtyp und <i>erp6</i> -Mutante	66
Abbildung 3.26: Relative Expression von <i>PR1</i> und <i>PDF1.2</i> nach <i>P. infestans</i> -Behandlung ..	67
Abbildung 3.27: Salizylsäure-Abhängigkeit der HR nach <i>P. infestans</i> -Inokulation	69
Abbildung 3.28: Überexpression der Arabidopsis-MKKs in <i>E. coli</i>	70
Abbildung 3.29: Aufreinigung von MKK1 bis MKK4	71
Abbildung 3.30: Analyse putativer <i>EDR1</i> -Substrate im radioaktiven Kinaseassay	71
Abbildung 3.31: Analyse putativer <i>EDR1</i> -Substrate nach Pro-Q Diamond-Färbung	72
Abbildung 3.32: Wurzellänge von Arabidopsiskeimlingen nach flg22-Applikation	73
Abbildung 3.33: Keimlingsfrischgewicht nach elf18-Applikation	74
Abbildung 3.34: Wachstum des Bakterienstammes <i>Pto</i> DC3000.....	75
Abbildung 3.35: Anzahl toter Epidermiszellen in Blättern von <i>erp6</i> und <i>edr1-1</i> nach <i>P. infestans</i> -Inokulation	75

Abbildung 4.1: Vergleich der EDR1-Kinasedomäne aus WT und <i>erp6</i> -Mutante	86
Abbildung 4.2: Vergleich der EDR1-Kinasedomäne aus verschiedenen Pflanzenspezies...	86
Abbildung 4.3: Vorhergesagte Sekundärstruktur der EDR1-Kinasedomäne aus Wildtyp und <i>erp6</i> -Mutante	87
Abbildung 4.4: Modell für die Funktion von EDR1 als Negativregulator verschiedener zellulärer Reaktionen unter (a)biotischem Stress.....	92
Abbildung 6.1: Anzahl differentiell exprimierter Gene nach <i>P. infestans</i> -Behandlung.....	97
Abbildung 6.2: Einteilung der nach <i>P. infestans</i> -Behandlung differentiell exprimierten Gene in Funktionsklassen	98
Abbildung 6.3: Überprüfung der Microarray-Auswertung mittels Northern Blot-Analyse	99
Abbildung 6.4: HR-Phänotyp der verschiedenen <i>edr1</i> -Mutanten sechs Tage nach <i>P. infestans</i> -Inokulation	99
Abbildung 6.5: Genotypisierung von F3-Linien der Kreuzung <i>pen2-1</i> mit <i>edr1-2</i>	100
Abbildung 6.6: Aufreinigung von MKK5 bis MKK10 und MEKK1	101
Abbildung 6.7: Vorhergesagte Sekundärstruktur der EDR1-Kinasedomäne verschiedener Pflanzenspezies	102
Abbildung 6.8: Anzahl toter Epidermiszellen in Blättern von <i>ataf1</i> nach <i>P. infestans</i> -Inokulation.....	103

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der Phänotypen der <i>edr1</i> -Mutante nach Pathogenbehandlung.....	18
Tabelle 2.1: Eingesetzte binäre Vektoren und deren Verwendung	31
Tabelle 2.2: Verwendete Puffer für die Proteinaufreinigung mittels His-Tag	35
Tabelle 2.3: Verwendete Puffer für die Proteinaufreinigung mittels GST-Tag	36
Tabelle 2.4: Übersicht über Bakterienstämme und benötigte Antibiotika	40
Tabelle 3.1: Beispiele für in <i>pen2-1erp2</i> konstitutiv differentiell exprimierte Gene.....	49
Tabelle 3.2: Zur Überprüfung der Microarray-Auswertung ausgewählte Gene.....	51
Tabelle 3.3: Beispiele für in <i>pen2-1erp2</i> differentiell exprimierte Kinasen und Rezeptoren ...	53
Tabelle 6.1: Übersicht der AGI-Nummern der in der Einleitung aufgeführten Gene	95
Tabelle 6.2: Verwendete Ökotypen und T-DNA-Insertionslinien von <i>A. thaliana</i>	95
Tabelle 6.3: Übersicht der verwendeten Primer zum Nachweis verschiedener Mutationen ..	96
Tabelle 6.4: Verwendete Primer zum Nachweis von T-DNA-Insertionen	96
Tabelle 6.5: Verwendete Primer für die Klonierung der MKKs und deren Mutagenese	96
Tabelle 6.6: Verwendete Primer zur Sonden-Herstellung für Northern Blot-Analysen.....	97
Tabelle 6.7: Detektierte Phosphorylierungsstellen in der Kinasedomäne von EDR1.....	100

1. Einleitung

1.1 Pflanzliche Pathogenabwehr

Die effektive Abwehr von Krankheiten bildet die Basis dafür, dass Pflanzen trotz ihrer sessilen Lebensform in der Natur überleben können. Obwohl Pflanzen dauerhaft diversen biotischen Stressoren ausgesetzt sind, kommt es nur selten zum Auftreten von Schadsymptomen und Krankheit. Die Ursache hierfür stellen verschiedene Abwehrmechanismen dar, die sich im Laufe der Evolution entwickelt und etabliert haben.

Präformierte und induzierbare Mechanismen der basalen Resistenz spielen sowohl in der Nichtwirtsresistenz als auch in kompatiblen Interaktionen eine Rolle. Zu ersteren, die auch in Abwesenheit eines Pathogens wirksam sind, gehören z. B. die Zellwand und die Cuticula, welche als physikalische Barriere dienen sowie durch ihre lipophile Beschaffenheit und die in der Zellwand lokalisierten antimikrobiellen Substanzen (z. B. Saponine, Acetophenole, Phenolderivate, cyanogene Glycoside) ein Eindringen bzw. Wachstum von Pathogenen vermindern können (Osbourn, 1996; Nürnberger *et al.*, 2004). Zu den induzierbaren Mechanismen, die erst durch Anwesenheit eines Pathogens initiiert werden, zählen die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), die Aktivierung von Mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden, die Akkumulation antimikrobieller Substanzen wie z. B. das Phytoalexin Camalexin sowie die Initiierung der Expression von „*pathogenesis related*“ (PR)-Genen. Weiterhin kann es zur Bildung von Papillen, Calloseauflagerungen und einer Verstärkung der Pflanzenzellwand sowie der Schließung von Stomata kommen (Nürnberger und Lipka, 2005; Melotto *et al.*, 2006; Glawischnig, 2007; Hou *et al.*, 2009; Millet *et al.*, 2010). Ein gutes Beispiel für eine Komponente der basalen Resistenz liefert das Phytoalexin Camalexin aus *A. thaliana*, dessen Synthese in der inkompatiblen Interaktion mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* induziert wird (Tsuji *et al.*, 1992) und ebenfalls eine Rolle in der Interaktion mit *Alternaria brassicicola* spielt (Thomma *et al.*, 1999).

Die Voraussetzung zur Aktivierung von Resistenzreaktionen besteht in der Erkennung der Pathogene durch die Pflanze und beruht auf bestimmten mikrobiellen Molekülmustern, den PAMPs (*pathogen-associated molecular pattern*). Führt die Perzeption dieser PAMPs zur Etablierung von Resistenz, handelt es sich um eine PAMP-induzierte Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI). Diese ist wirksam gegen nicht-adaptierte Pathogene und trägt zur so genannten Nichtwirtsresistenz bei (Heath, 2000; Dodds und Rathjen, 2010).

Im Laufe der Evolution kann es Pathogenen gelingen, sich zu adaptieren und die Abwehrreaktionen der Pflanze mit Hilfe von Effektoren zu überwinden bzw. zu unterdrücken. In diesem Fall liegt eine Effektor-induzierte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS) vor, bei der die Grenze für eine effektive Resistenzausprägung unterschritten wird. Aus der

resistenten Nichtwirtspflanze ist eine susceptible Wirtspflanze geworden. Als Antwort auf die Effektoren ist es einigen Pflanzen im Laufe der Evolution gelungen, neue Moleküle (R-Proteine) zu entwickeln, welche diese Effektoren erkennen. Somit kommt es erneut zu einer Resistenzausprägung, die als Effektor-induzierte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) oder auch R-Gen vermittelte Resistenz bezeichnet wird. Bei dieser auch als Wirtsresistenz bezeichneten Form der Abwehr unterscheidet man zwischen einer kompatiblen und inkompatiblen Interaktion (Hammond-Kosack und Parker, 2003). Bei der ersten Form bezeichnet man das Pathogen als virulent, da es in der Lage ist, die Wirtspflanze zu besiedeln und seinen Lebenszyklus zu vollenden, was mit einer Schädigung der Pflanze einhergeht. In einer inkompatiblen Interaktion hingegen wird das Pathogen als avirulent bezeichnet, da durch pflanzliche Abwehrmechanismen das Pathogenwachstum unterbunden wird. Die ETI geht meist mit einer Überschreitung des Schwellenwertes für die Induktion einer Zelltodreaktion (*hypersensitive reaction*, HR) einher. Im weiteren Verlauf der Evolution haben sich Pathogene entwickelt, die neue Effektoren besitzen, die erneut in der Lage sind, die ETI zu unterdrücken. Die natürliche Selektion fördert wiederum die Entstehung von R-Proteinen, welche die neuen Pathogeneffektoren wahrnehmen und erneut eine ETI ermöglichen. Die Abfolge von ETS und ETI kann sich dabei beliebig oft wiederholen. Diese Co-Evolution der Pflanze-Pathogen-Interaktion wurde von Jones und Dangl (2006) im sogenannten Zick-Zack-Modell zusammengefasst (Abbildung 1.1).

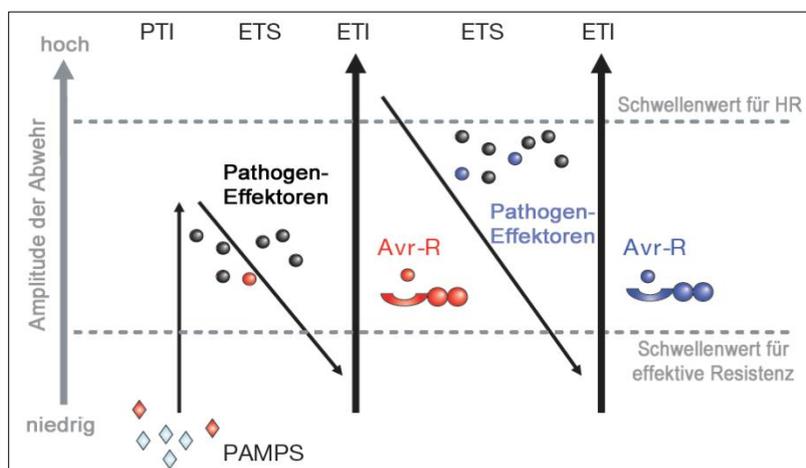


Abbildung 1.1: Zick-Zack-Modell nach Jones und Dangl, modifiziert. PAMP = pathogen-associated molecular pattern, PTI = PAMP-triggered immunity, ETS = effector-triggered susceptibility, ETI = effector-triggered immunity, Avr-R = Avirulenz-/R-Protein Interaktion, HR = hypersensitive Reaktion; detaillierte Beschreibung siehe Text

Im Folgenden werden die Erkennung von Pathogenen und die MAPK-Kaskaden als wichtige Komponenten der Resistenzausprägung detaillierter dargestellt, sowie die Wirts- und Nichtwirtsresistenz und die Überschneidung beider Resistenzformen dargelegt. Anschließend wird die Relevanz der putativen Kinase EDR1 für beide Formen der Resistenz ausführlicher erläutert.

1.1.1 Pflanzliche Pathogenperzeption

Die Fähigkeit der Pflanzen zur Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Nicht Selbst“ ist die Grundvoraussetzung zur Aktivierung von Abwehrmechanismen und damit zur Etablierung einer Resistenz (Sanabria *et al.*, 2010). Die direkte Perzeption von Mikroorganismen erfolgt durch so genannte Muster-Erkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR), die spezifische molekulare Eigenschaften (*microbe-/pathogen-associated molecular pattern*, M/PAMP) umgebender Mikroorganismen wahrnehmen. Diese MAMPs werden auch als exogene Elizitoren bezeichnet (Nürnberg und Lipka, 2005). Die Gruppe der PAMPs beinhaltet speziell Peptide von Pathogenen, wohingegen MAMPs auch Peptidstrukturen bezeichnen, die in nicht pathogenen Mikroorganismen zu finden sind. Bei den PAMPs handelt es sich in der Regel um Peptidstrukturen, die sich auf der Pathogenoberfläche befinden oder vom Pathogen sekretiert werden. Diese Epitope sind meist charakteristisch für ganze Gruppen von Organismen und stellen hochkonservierte essentielle Moleküle dar, die von einer großen Zahl verschiedener Pflanzenarten erkannt werden, in der Pflanze selbst aber nicht vorkommen (Segonzac und Zipfel, 2011). In den vergangenen Jahren konnten zahlreiche Vertreter der PAMPs und deren Rezeptoren identifiziert und charakterisiert werden (für einen ausführlichen Überblick siehe Postel und Kemmerling (2009) sowie Sanabria *et al.* (2010)). Die bisher am besten untersuchten bakteriellen PAMPs sind flg22 (N-terminales Peptid aus Flagellin, Felix *et al.* (1999)), elf18 (Peptid des Elongationsfaktors EF-Tu, Kunze *et al.* (2004)) und Ax21 (N-terminales Peptid des schwefelhaltigen Proteins Ax21, Lee *et al.* (2009)) sowie deren Rezeptoren FLS2 (Flagellin-sensing2, Zipfel *et al.* (2004)) EFR (EF-Tu receptor, Zipfel *et al.* (2006)) und Xa21 (Lee *et al.*, 2009).

Ein bereits gut analysiertes PAMP aus Oomyceten ist das Peptid Pep-13 aus der Transglutaminase GP42, welches erstmals in *Phytophthora sojae* identifiziert wurde (Nürnberg *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002). Die Autoren zeigten, dass dieses 13 Aminosäuren lange Peptid notwendig und zugleich ausreichend ist, um Abwehrreaktionen in Petersilien-Zellen auszulösen. Pep-13 ist ein hoch konserviertes, in diversen *Phytophthora*-Spezies vorhandenes Motiv (Brunner *et al.* 2002), für das jedoch noch kein Rezeptor bekannt ist. Weitere PAMPs aus Oomyceten sind unter anderem die Elicitine wie z. B. INF1, die von den meisten Vertretern der *Phytophthora*- und *Pythium*-Spezies sekretiert werden (Kamoun, 2006). Bestimmte Elicitine wie z. B. Cryptogein sind in der Lage, Sterole zu binden und transportieren (Vauthrin *et al.*, 1999). Dies ist für alle Vertreter der Oomyceten von besonderer Bedeutung, da diese zwar Sterolvorläuferverbindungen synthetisieren, diese jedoch aufgrund fehlender Enzyme nicht in Sterole umwandeln können. Somit müssen die für die Funktionsfähigkeit von Membranen und Hormon-Signalwegen essentiellen Sterole aus externen Quellen bezogen werden (Tyler *et al.*, 2006; Gaulin *et al.*, 2010).

Wird eine Pflanzenzellsuspension oder ein Pflanzengewebe mit einem reinen PAMP behandelt, können innerhalb kürzester Zeit bestimmte physiologische Reaktionen verzeichnet werden. Eine der frühesten Antworten etwa 30 - 120 Sekunden nach PAMP-Applikation ist eine Alkalisierung des Mediums von Arabidopsis-Suspensionskulturen, die durch Ionenflüsse hervorgerufen wird (Boller, 1995; Nürnberger *et al.*, 2004). Diese beinhalten ein erhöhtes Einströmen von Protonen (H^+) und Calciumionen (Ca^{2+}) in das Cytoplasma sowie ein damit einhergehendes Ausströmen von Kaliumionen (K^+) in den apoplastischen Raum mit Hilfe von noch unbekanntem Transportern bzw. Kanälen. Das im Cytoplasma angereicherte Ca^{2+} übernimmt dann die Funktion eines sogenannten *second messenger* und initiiert innerhalb der nächsten 10 Minuten Abwehrmechanismen, wie z. B. die Produktion von ROS durch die NADPH-Oxidase RbohD, die Aktivierung von MAPK-Kaskaden oder auch Calcium-abhängigen Proteinkinasen (Torres *et al.*, 2002; Boudsocq *et al.*, 2010; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010; Ranf *et al.*, 2011), die zur Aktivierung von Abwehrgenen führen (Zipfel *et al.*, 2006; Zipfel, 2008).

Weitere frühe Antworten 5 - 30 Minuten nach PAMP-Zugabe sind die Akkumulation des Stresshormons Ethylen (Boller und Felix, 2009) und im Fall von flg22 eine Liganden-induzierte Endocytose des flg22-Rezeptors FLS2. Robatzek *et al.* (2006) beobachteten, dass ein stabil in Arabidopsis exprimiertes und biologisch funktionelles FLS2-GFP (*green fluorescent protein*)-Konstrukt etwa 10 - 20 Minuten nach Stimulierung mit flg22 in Vesikeln lokalisiert war, nachdem es zuvor Plasmamembranständig vorlag.

Zu den späten Zellantworten (wenige Stunden bis Tage nach PAMP-Applikation), zählen die Ablagerung von Callose, die z. B. nach Stimulierung mit flg22 nach 16 Stunden sichtbar wird (Gómez-Gómez *et al.*, 1999) sowie eine Wachstumsinhibierung von Arabidopsis-Keimlingen nach Behandlung mit flg22 bzw. elf18 (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2006). Navarro *et al.* (2006) diskutieren, dass dieser Wachstumsphänotyp womöglich durch die Induktion einer microRNA initiiert wird, die diverse Auxinrezeptorkomplexproteine negativ reguliert. Dies würde in einer Reprimierung Auxin-responsiver Gene und damit einhergehend einer Wachstumsinhibierung resultieren.

Im Gegensatz zu den PAMPs existieren auch endogene Elizitoren, wie z. B. Abbauprodukte der Pflanzenzellwand, die durch hydrolytische Aktivität eindringender pathogener Mikroorganismen freigesetzt werden und zur indirekten Erkennung von „verändertem Selbst“ führen (Vorwerk *et al.*, 2004; Krol *et al.*, 2010). Diese Peptide bezeichnet man als DAMPs (*damage-associated molecular pattern*). Ein Vertreter der DAMPs ist das Arabidopsis-Peptid AtPep1, welches durch den Rezeptor AtPEPR1/AtPEPR2 (AtPEP receptor 1 und 2) perzipiert wird (Krol *et al.*, 2010). In Folge von Verwundung, Zellwandabbau oder der Applikation von Jasmonat und Ethylen kommt es zur Akkumulation des Vorläuferproteins PROPEP1, aus dessen C-Terminus das Peptid AtPEP1 freigesetzt wird (Huffaker *et al.*, 2006). Die

Applikation von AtPEP1 auf Arabidopsis-Blätter bewirkt eine Freisetzung der ROS-Spezies H_2O_2 sowie eine Transkriptakkumulation des Abwehrgens *PDF1.2* (*Plant Defensin 1.2*)¹ (Huffaker *et al.*, 2006). Weiterhin kann ähnlich wie bei PAMP-Behandlung auch nach Zugabe von AtPep1 eine Induktion von MAPK-Kaskaden beobachtet werden (Ranf *et al.*, 2011).

1.1.2 Rolle der MAPK-Kaskaden in der Pathogenabwehr

Die Erkennung eines Pathogens geht unter anderem mit der Aktivierung von MAPK-Kaskaden einher. Durch diese in eukaryotischen Lebewesen hoch konservierten Kaskaden können externe Stimuli in zelluläre Antworten konvertiert werden. MAPK-Kaskaden regulieren eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. die Reaktion auf Hormone, biotische und abiotische Stressoren sowie Entwicklungsprozesse. In der Regel bestehen diese Kaskaden aus mindestens drei konsekutiv angeordneten Kinasetypen, die durch sequentielle Phosphorylierungsschritte aktiviert werden. Die typischen drei Komponenten einer solchen Kaskade sind eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAP3K, MEKK oder MKKK), eine MAP-Kinase-Kinase (MAP2K oder MKK) und eine MAP-Kinase (MAPK oder MPK). Dabei wird die MAP3K durch einen Plasmamembran-lokalisierten Rezeptor stimuliert, woraufhin sie die untergeordnete MAP2K an dem konservierten Serin/Threonin - X_{3-5} - Serin/Threonin-Motiv phosphoryliert. Die MAP2K ist nun ihrerseits in der Lage, die untergeordnete MAPK durch duale Phosphorylierung des Threonin-X-Tyrosin-Motives zu aktivieren, die dann diverse Zielproteine im Cytoplasma oder Nukleus regulieren, wie z. B. Kinasen, Enzyme oder Transkriptionsfaktoren (Nishida und Gotoh, 1993; Ichimura *et al.*, 2002; Andreasson und Ellis, 2010). Durch *in silico*-Studien mit der Genomsequenz von Arabidopsis konnten 20 MPK-, 10 MPKK-, und ~80 MPKKK-Kandidaten identifiziert werden (Colcombet und Hirt, 2008), von denen teilweise auch Homologe in anderen Pflanzenspezies existieren (Frye *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002).

Am Beispiel von flg22 sollen nachfolgend zwei MAPK-Kaskaden dargestellt werden, die in *A. thaliana* an der Signaltransduktion nach Pathogen-Perzeption eine Rolle spielen. Innerhalb weniger Sekunden nach der direkten Bindung von flg22 an den Rezeptor FLS2 bindet dieser an die Transmembrankinase BAK1 (BRI1 [BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1]-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1), nachdem FLS2 ebenso wie BAK1 zuvor bereits mit BIK1 (BOTRYTIS-INDUCED KINASE1) assoziiert vorlag. Die wahrscheinlich direkt durch flg22 aktivierte Kinase BAK1 phosphoryliert BIK1, die wiederum den FLS2-BAK1-Komplex transphosphoryliert (Abbildung 1.2). Der nun vollständig aktivierte Komplex phosphoryliert womöglich erneut BIK1 und weitere Substrate, wodurch BIK1 aus dem Komplex austritt und FLS2 eine Liganden-induzierte Endocytose durchläuft.

¹: AGI-Nummern der in der Einleitung genannten Gene sind im Anhang in Tabelle 6.1 aufgelistet

Das Peptid flg22 bleibt während dieses Prozesses in dem FLS2-BAK1-Komplex gebunden (Robatzek *et al.*, 2006; Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Roux *et al.*, 2011).

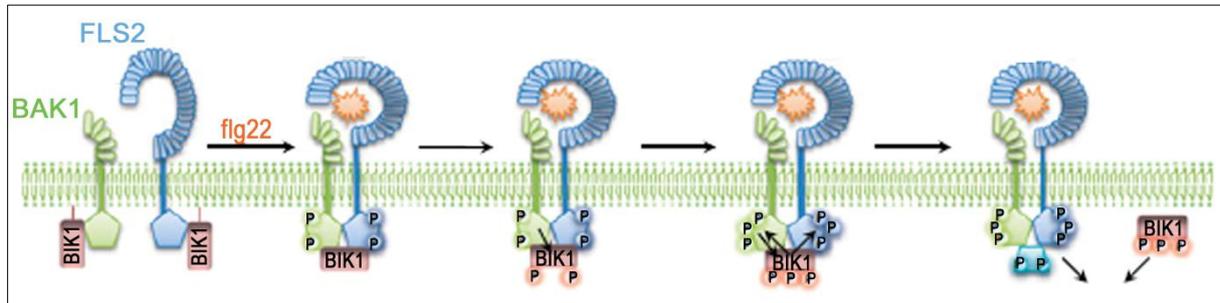


Abbildung 1.2: Rezeptorkomplexbildung nach flg22-Perzeption, modifiziert nach Lu *et al.* 2009; FLS2 = Flagellin-Sensing2; BAK1 = BRI1-Associated Receptor Kinase1; BIK1 = Botrytis-Induced Kinase1; P = Phosphorylierung; detaillierte Erklärung siehe Text

Zu den zellulären Antworten, die nach der Erkennung von flg22 durch FLS2 initiiert werden, gehören u. a. das Einströmen von Ca^{2+} -Ionen in das Cytoplasma, eine damit verbundene Produktion von ROS, sowie die Aktivierung verschiedener MAPK-Kaskaden (Boller und Felix, 2009), die schematisch in Abbildung 1.3 dargestellt sind.

Eine der Kaskaden beinhaltet MEKK1 (MAP3K), welche MKK1 und MKK2 aktiviert, was wiederum in der Phosphorylierung von MPK4 resultiert. Bereits vor der Elizitierung liegt MPK4 in einem Komplex mit seinem Substrat MKS1 (MAP KINASE SUBSTRATE1) und dem Transkriptionsfaktor WRKY33 vor. Nach Perzeption von flg22 kommt es zur Phosphorylierung von MKS1 durch MPK4, was zur Auflösung des Komplexes führt, wobei MKS1 mit WRKY33 verbunden bleibt. Der Transkriptionsfaktor, noch immer als Komplex mit MKS1, wandert in den Zellkern und bindet dort an den Promotor von *PAD3* (*PHYTOALEXIN-DECIENT3*) und initiiert damit die Synthese des antibiotisch wirkenden Camalexin (Andreasson *et al.*, 2005; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2008a; Qiu *et al.*, 2008b).

Die zweite, durch flg22 aktivierte MAPK-Kaskade, enthält eine bisher unbekannte MAP3K, und sowohl MKK4 und MKK5 als auch MPK3 und MPK6. Nach Phosphorylierung von MPK6 kann diese Kinase das Substrat ACS6 (ACC [1-AMINOCYCLOPROPAN-1-CARBOXYLIC ACID]-SYNTHASE6) aktivieren, was letztendlich zur Produktion des Phytohormons Ethylen führt. Dies wiederum initiiert die Expression diverser Abwehrgene, wie z. B. *PDF1.2*. MPK3 hingegen phosphoryliert VIP1 (VirE2-INTERACTING PROTEIN), welches im Nukleus die Expression von *PR*-Genen auslöst (Asai *et al.*, 2002; Liu und Zhang, 2004; Djamei *et al.*, 2007; Bethke *et al.*, 2009).

Neuere Studien von Bethke *et al.* (2012) belegen, dass auch MPK11 durch flg22 aktiviert wird, jedoch sind weitere Komponenten dieser Kaskade bisher unbekannt.

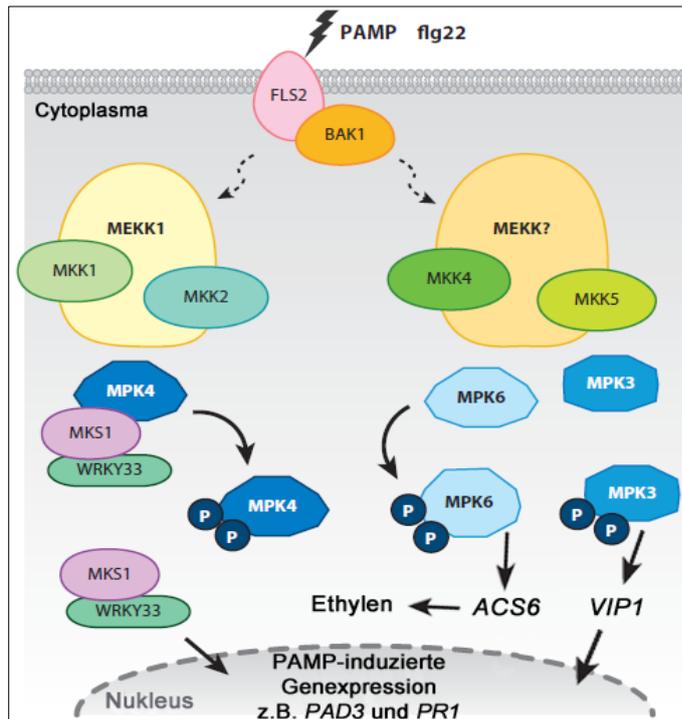


Abbildung 1.3: Aktivierte MAPK-Kaskaden nach flg22-Applikation in *A. thaliana*, modifiziert nach Suarez-Rodriguez 2010; PAMP = Pathogen-Associated Molecular Pattern; FLS2 = Flagellin-Sensing2, BAK1 = BRI1-Associated Receptor Kinase1; MEKK = Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase; MKK = Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase; MPK = Mitogen-aktivierte Protein-Kinase; P = Phosphorylierung; VIP1 = VirE2-Interacting Protein; ACS6 = ACC-Synthase; PR1 = Pathogenesis-Related1; PAD3=Phytoalexin Deficient3; detaillierte Beschreibung siehe Text.

1.1.3 Nichtwirtsresistenz

Die häufigste in der Natur auftretende Form der Resistenz ist die Nichtwirtsresistenz, bei der eine Pflanzenart von keinem Isolat einer bestimmten Pathogenspezies befallen werden kann. Die Besonderheit der Nichtwirtsresistenz liegt in ihrer Stabilität und Wirksamkeit gegen ein breites Pathogenspektrum (Fan und Doerner, 2012). Dies beruht darauf, dass sich die Nichtwirtsresistenz aus diversen Ebenen zusammensetzt und somit nicht nur aus der Wirkung eines Gens sondern vieler verschiedener Gene resultiert (Heath, 1996, 2000). Basierend auf der Ausprägung einer HR nach Pathogenbefall unterteilen Mysore und Ryu (2004) die Nichtwirtsresistenz in zwei Kategorien. Bei dem am häufigsten vorkommenden Typ I ist keine HR zu beobachten, da das Pathogen nicht in der Lage ist, die präformierten Abwehrmechanismen der Pflanze zu überwinden. Dahingegen korreliert die Typ II-Nichtwirtsresistenz immer mit einer schnellen, lokalen Ausprägung einer hypersensitiven Reaktion. In diesem Fall hat das Pathogen zwar die präformierte Abwehr erfolgreich überwunden, es wird jedoch erkannt und effektive Abwehrmechanismen werden aktiviert. Dieselbe Pflanzenspezies kann beide Formen der Nichtwirtsresistenz gegen verschiedene Pathogene aufweisen (Peart *et al.*, 2002) und umgekehrt kann dasselbe Pathogen Typ I und Typ II bei unterschiedlichen Pflanzenspezies auslösen (Lu *et al.*, 2001).

Wie bereits im Kapitel 1.1 erläutert, spielt die Etablierung der PTI nach Erkennung eines nicht-adaptierten Pathogens anhand von PAMPs eine bedeutende Rolle in der Nichtwirtsresistenz (Schwessinger und Zipfel, 2008). Schulze-Lefert und Panstruga (2011) stellen die Hypothese auf, dass zusätzlich zur PTI auch Komponenten der ETI an der Nichtwirtsresistenz beteiligt sind. Demnach soll sich die relative Bedeutung der ETI und PTI für die

Nichtwirtsresistenz in Abhängigkeit der phylogenetischen Divergenz zwischen Wirt und Nichtwirt verändern. PTI und ETI hätten eine zunehmend größere bzw. kleinere Bedeutung für die Vermittlung der Nichtwirtsresistenz, je weiter der Nichtwirt und das Pathogen evolutionär voneinander entfernt sind. Umgekehrt würde die ETI im Verhältnis zur PTI eine zunehmend größere Rolle für die Nichtwirtsresistenz spielen, je kleiner die evolutionäre Entfernung zwischen Pflanze und Pathogen ist. Nach Meinung der Autoren sind aufgrund dieser evolutionären Vorgänge pflanzliche PRRs auch bei nicht direkt verwandten Pflanzenspezies verhältnismäßig konserviert, während R-Proteine und Effektoren innerhalb einer Pflanzen- bzw. Pathogenspezies eine hohe Diversität aufweisen (Schulze-Lefert und Panstruga, 2011). Dieses Modell erklärt auch die Beobachtung von Gilbert und Webb (2007), dass mit abnehmender phylogenetischer Verwandtschaft von Pflanzenarten auch die Wahrscheinlichkeit einer Anfälligkeit für das gleiche Pathogen geringer wird.

An der Etablierung der Nichtwirtsresistenz sind diverse Komponenten beteiligt, die man generell in prä- und postinvasive Abwehrmechanismen unterteilen kann. Besonders gut lässt sich dies am Beispiel der Interaktion zwischen *A. thaliana* und dem nicht-adaptierten obligat biotrophen Mehltaupilz *Blumeria gaminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) belegen. Für die prä-invasive Resistenz gegen *Bgh* sind die Gene *PEN1* (*PENETRATION1*), *PEN2* und *PEN3* von essentieller Bedeutung, was sich in der höheren Penetrationsfrequenz von *Bgh* auf den Einzelmutanten *pen1*, *pen2* und *pen3* widerspiegelt (Collins *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). Während die Doppelmutante *pen1pen2* eine Zunahme der Penetrationshäufigkeit im Vergleich zu den Einzelmutanten aufweist, reagiert die *pen2pen3*-Doppelmutante wie die Einzelmutanten (Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass *PEN2* und *PEN3* im gleichen Reaktionsweg agieren, *PEN1* hingegen an einem distinkten Abwehrmechanismus beteiligt ist (Lipka *et al.*, 2008). Ein Modell, das den Ablauf einer Interaktion von *Arabidopsis* mit *Bgh* sowie die Rolle der einzelnen *PEN*-Genprodukte darstellt, ist schematisch in Abbildung 1.4 gezeigt.

Nach dem Auskeimen der *Bgh*-Spore kommt es zur Ausbildung eines Appressoriums und mit Hilfe einer Penetrationshyphse versucht das Pathogen die Pflanzenzellwand zu penetrieren. Während dieses Vorganges nimmt die Pflanze das Pathogen anhand von PAMPs mittels Plasmamembran-ständiger Rezeptoren wahr und diverse Abwehrmechanismen werden initiiert. Diese umfassen unter anderem die Aktivierung von *PEN1*, *PEN2* und *PEN3*. Das Plasmamembran (PM)-lokalisierte Syntaxin *PEN1* bildet dabei einen sogenannten SNARE-Komplex (SOLUBLE N-ETHYLMALIMIDE-SENSITIVE-FACTOR ATTACHMENT RECEPTOR), bestehend aus *PEN1*, dem ebenfalls PM-assoziierten Adaptorprotein SNAP33 (SNARE SYNAPTOSOMAL-ASSOCIATED PROTEIN 33) und den zwei Endomembran-kompartiment-assoziierten SNARE-Proteinen VAMP721 (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN 721) und VAMP722. Dieser Komplexformation folgt möglicherweise die Sekretion

von putativ antimikrobiellen Molekülen, die am Ort der versuchten Penetration wirksam werden können. Weiterhin kann die Ausprägung von Callose-haltigen Papillen beobachtet werden, die möglicherweise ein weiteres Eindringen des Pathogens verhindern (Collins *et al.*, 2003; Zimmerli *et al.*, 2004). Parallel dazu spielt die Peroxisom-assoziierte Myrosinase PEN2 eine Rolle bei der Freisetzung potentiell toxischer Abbauprodukte aus Indolglucosinolatderivaten, die mit Hilfe des Plasmamembran-lokalisiereten ABC (ATP binding cassette)-Transporters PEN3 in den apoplastischen Raum transportiert werden. Aufgrund der Lokalisierung von PEN2 nahe der Peroxisomen wird angenommen, dass PEN2 wie auch die Peroxisomen selbst entlang des fokal angeordneten Cytoskeletts transportiert wird (Lipka *et al.*, 2008). Nicht vollständig aufgeklärt sind die toxischen Produkte, die durch den Einsatz von PEN2 freigesetzt werden. Bekannt ist jedoch, dass die Verbindung 4-Methoxy-indol-3-ylmethylglucosinolat, welche von dem Enzym CYP81F2 gebildet wird, als Substrat für PEN2 fungiert (Sanchez-Vallet *et al.*, 2010).

Unterstützt wird dieses Modell durch die Akkumulation von PEN1, PEN2 und PEN3 nach Infektion mit *Bgh* nahe der Penetrationsstelle (Assaad *et al.*, 2004; Bhat *et al.*, 2005; Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006).

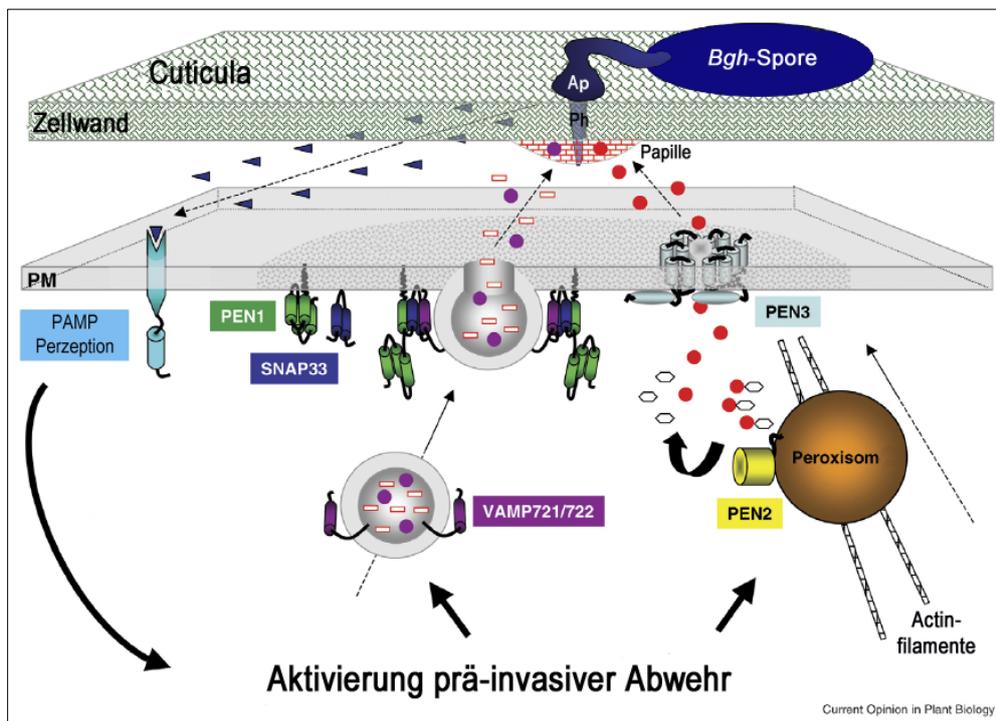


Abbildung 1.4: PEN1, PEN2 und PEN3 in der Abwehrreaktion von Arabidopsis gegen *Bgh*, modifiziert nach Lipka *et al.* (2008). Ap = Appressorium; Ph = Penetrationshyphe; PM = Plasmamembran; PAMP = pathogen-associated molecular patterns (blaue Dreiecke); PEN1/2/3 = PENETRATION1/2/3; SNAP33 = SNARE synaptosomal-associated protein 33; VAMP721/722 = vesicle-associated membrane protein 721/722; rot umrahmte Rechtecke = Zellwand-Vorläuferverbindungen; lila Kreise = antimikrobielle Verbindungen; rote Kreise = putativ toxische Indolderivat-Verbindungen; Hexagon = Glukose; detaillierte Beschreibung siehe Text

Interessanterweise sind die PEN-Produkte auf unterschiedliche Art und Weise in der Nichtwirtsresistenz von Bedeutung. Alle drei Komponenten sind an der Resistenz gegen *Bgh* und dem Ascomyceten *E. pisi* beteiligt, andererseits ist in der Abwehr gegen den Ascomyceten *Plectosphaerella cucumerina* sowie den Oomyceten *Phytophthora infestans* nur der PEN2/PEN3-Mechanismus und nicht PEN1 relevant (Lipka *et al.*, 2008). PEN1 scheint zusätzlich an der Penetrationsresistenz gegen den Oomyceten *Phytophthora sojae* beteiligt zu sein (Sumit *et al.*, 2012), während PEN2 weiterhin für die prä-invasive Abwehr des Pilzes *Magnaporthe oryzae* relevant ist (Maeda *et al.*, 2009). Für die Penetrationsresistenz gegen den Basidiomyceten *Phakopsora pachyrhizi* wiederum spielt PEN3 im Vergleich mit PEN1 und PEN2 eine übergeordnete Rolle (Löhner *et al.*, 2008).

Obgleich in den Einzelmutanten *pen1*, *pen2* und *pen3* ein größerer Penetrationserfolg von *Bgh* festgestellt werden kann, verhindern post-invasive Abwehrmechanismen das weitere Wachstum und die Vermehrung des Pathogens, so dass die Nichtwirtsresistenz aufrechterhalten bleibt.

In der Wirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen den adaptierten Oomycet *Hyaloperonospora arabidopsidis* nehmen die Lipase-ähnlichen Proteine EDS1 (ENHANCED SUSCEPTIBILITY1), PAD4 (PHYTOALEXIN-DEFICIENT4) und SAG101 (SENESCENCE ASSOCIATED GENE101) eine Schlüsselstellung ein (Wiermer *et al.*, 2005). Pflanzen, in denen EDS1 nicht funktionsfähig ist, zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber virulenten Isolaten von *H. arabidopsidis*, *Erysiphe* sp. und *Pseudomonas syringae*. Das Modell von Rietz *et al.* (2011) fasst die Funktionsweise und das Zusammenspiel dieser einzelnen Komponenten zusammen (Abbildung 1.5). Danach kann im Anschluss an die Erkennung des Pathogens mit Hilfe von TIR-NB-LRR (DROSOPHILA TOLL AND HUMAN INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-NUCLEOTIDE BINDING-LEUCINE RICH REPEAT)-Rezeptoren zwischen zwei Immunantworten unterschieden werden: einer „lokalen“ Reaktion, die zum Zelltod der penetrierten Zelle führt sowie einer Phase der „Verstärkung“, in der in den benachbarten Zellen eine systemische Resistenz ausgeprägt wird. Die Autoren postulieren für die Phase der Verstärkung den Ablauf von Prozessen, die auch in der basalen Resistenz gegen virulente Pathogene zum Tragen kommen. Liegt EDS1 ungebunden vor, kann es eine hypersensitive Zelltodreaktion (HR) vermitteln, die durch PAD4 ausgelöst wird. Dahingegen ist der Komplex aus EDS1 und PAD4 erforderlich, um Prozesse zu initiieren, die mit Salizylsäure (SA)-abhängiger Abwehr einhergehen. Die Funktion von SAG101 ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch scheint dieses Protein ebenfalls an der Ausprägung der lokalen Zelltodreaktion beteiligt zu sein und es scheint eine Verbindung zu den Prozessen der „Verstärkungsphase“ darzustellen, indem es die Bildung von SA beeinflusst (Rietz *et al.*, 2011).

Durch Kombination der verschiedenen Mutanten konnte nachgewiesen werden, dass *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* zusätzlich zur basalen Abwehr gegen das adaptierte Pathogen

H. arabidopsidis auch in der post-invasiven Resistenz von *A. thaliana* gegen das nicht-adaptierte Pathogen *Bgh* involviert sind. Während Mutationen in jeweils einem der Gene *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* keinen bzw. nur einen minimalen Effekt auf die prä-invasive Resistenz gegen *Bgh* haben, kann in Blattbereichen mit einer erfolgreichen Penetration ein verstärktes Hyphenwachstum beobachtet werden (Lipka *et al.*, 2005). In der *pen2pad4sag101*-Dreifachmutante ist *Bgh* in der Lage, Konidiophoren auszubilden und damit seinen Lebenszyklus zu vollenden, womit die Nichtwirtsresistenz gebrochen ist.

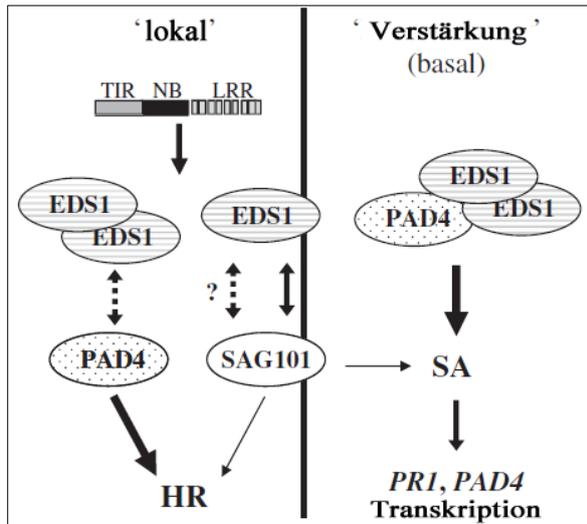


Abbildung 1.5: Interaktion der Komponenten EDS1, PAD4 und SAG101 in der Wirtsinteraktion von *A. thaliana* mit *H. arabidopsidis*, modifiziert nach Rietz *et al.* (2011). TIR-NB-LRR = Toll/Interleukin1 receptor-nucleotide binding-leucine-rich repeat-Rezeptoren; EDS = Enhanced Disease Susceptibility1; PAD4 = Phytoalexin Deficient4; SAG101 = Senescence Associated Gene101; HR = Hypersensitive Reaktion; PR1 = Pathogenesis Related1; SA = Salizylsäure; detaillierte Beschreibung siehe Text

Das ebenfalls nicht-adaptierte Pathogen *E. pisi* bildet bereits auf *pen2pad4*- und *pen3eds1*-Doppelmutanten Konidiophoren aus (Stein *et al.*, 2006). Die Ursache für diesen Unterschied zwischen *Bgh* und *E. pisi* liegt vermutlich daran, dass es sich bei *Bgh* um ein Monokotyledonen-Pathogen handelt, welches Gerste (*Hordeum vulgare*) befällt, während *E. pisi* Erbsen (*Pisum sativum*) infiziert, die zu den Dikotyledonen gehören. Arabidopsis als Vertreter der Dikotyledonen ist somit dem natürlichen Wirt von *E. pisi* näher verwandt als dem von *Bgh* (Lipka *et al.*, 2010).

Neben den Mechanismen der prä-invasiven Resistenz, an denen die PEN-Proteine maßgeblich beteiligt sind, ist der Transkriptionsfaktor *ATAF1* ebenfalls für die Penetrationsresistenz von Arabidopsis gegen *Bgh* von Bedeutung. Die Mutante *ataf1* weist, ähnlich wie *pen1/2/3* eine erhöhte Penetration von *Bgh* auf, Komponenten der post-invasiven Abwehr gewährleisten jedoch die Aufrechterhaltung der Resistenz (Jensen *et al.*, 2007). *ATAF1* kodiert für einen NAC (NAM, *ATAF1,2* und *CUC2*)-Transkriptionsfaktor, der sich durch eine konservierte N-terminale NAC-Domäne auszeichnet, die zuerst in dem *NAM (NO APICAL MERISTEM)*-Gen aus der Petunie identifiziert wurde und ebenfalls in den Arabidopsis-Genen *ATAF1*, *ATAF2* und *CUC2 (CUP-SHAPED COTYLEDON)* vorkommt (Ernst *et al.*, 2004). Diese Domäne vermittelt die Bindung von DNA und/oder Proteinen und fungiert somit als transkriptionaler Regulator. Die Familie der NAC-Transkriptionsfaktoren umfasst allein in

Arabidopsis 106 Mitglieder (Gong *et al.*, 2004), von denen besonders Vertreter der ATAF-Untergruppe eine wichtige Rolle als Regulatoren in der Pathogenabwehr einnehmen (Delessert *et al.*, 2005; Selth *et al.*, 2005). Weiterhin kann in Reis, Kartoffel und *Brassica* sp. nach Pathogenbefall oder Verwundung eine Induzierung der ATAF-Gene beobachtet werden (Collinge und Boller, 2001; Hegedus *et al.*, 2003; Ohnishi *et al.*, 2005). In der Gerste ist ein zu *ATAF1* orthologes Gen, *HvNAC6*, an der basalen Abwehr gegen *Bgh* beteiligt, also in der Interaktion zwischen einem Wirt mit einem adaptierten Pathogen. Gerstenpflanzen, bei denen mit Hilfe eines RNAi-Konstruktes das Transkript von *HvNAC6* verringert wurde, zeigen eine Reduktion der Penetrationshäufigkeit von *Bgh*. Demnach scheinen ATAF1 bzw. *HvNAC6* eine konservierte Funktion in der positiven Regulierung der Penetrationsresistenz sowohl in Monokotyledonen (Gerste) als auch in Dikotyledonen (Arabidopsis) einzunehmen (Jensen *et al.*, 2007).

Untersuchungen zur Interaktion von Arabidopsis mit den adaptierten Pathogenen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000) sowie den nekrotrophen Pilzen *Botrytis cinerea* und *Alternaria brassicicola* zeigen eine zusätzliche Mitwirkung von ATAF1 in der Wirts-Resistenz von Arabidopsis (Wang *et al.*, 2009). Transgene Pflanzen, in denen *ATAF1* reprimiert war, wiesen eine erhöhte Resistenz gegen *Pto* DC3000, *B. cinerea* und *A. brassicicola* auf. Demnach fungiert ATAF1 in diesen Pathosystemen als ein negativer Regulator diverser Abwehrmechanismen, wie z. B. der Expression der Abwehrgene *PR1*, *PR5* und *PDF1.2* (Wang *et al.*, 2009).

1.1.4 Wirtsresistenz

In einigen Pflanze-Pathogen-Interaktionen hat die Unterdrückung von PTI durch Pathogen-Effektoren zur Suszeptibilität der Pflanze geführt. Die Entwicklung effektiver Erkennungsmechanismen für die Pathogeneffektoren oder deren Aktivität resultierte wiederum in der Etablierung einer ETI. Diese Form der Resistenz wird auch als *R*-Gen-vermittelte oder rassenspezifische Resistenz bezeichnet. Ihr liegt die Gen-für-Gen-Hypothese von Flor (1947) zugrunde, die auf der Erkennung spezifischer Avirulenz (*Avr*)-Genprodukte des Pathogens durch korrespondierende Resistenz (*R*)-Genprodukte der Wirtspflanze beruht. Charakteristisch für die rassenspezifische Resistenz ist die Hypersensitive Reaktion (HR), bei der es zum Absterben der befallenen Zelle kommt, wodurch in der Regel eine Ausbreitung des Pathogens verhindert wird (Eulgem, 2005).

Die häufigsten Produkte der *R*-Gene stellen Rezeptoren dar, mit deren Hilfe Pathogeneffektoren direkt oder deren Aktivität innerhalb der Pflanzenzelle perzipiert werden (Jones und Dangl, 2006; Boller und Felix, 2009). Diese auch als R-Proteine bezeichneten Rezeptoren zeichnen sich durch bestimmte molekulare Merkmale aus. In der Regel besitzen sie eine C-terminale Leucin-reiche Region (*leucine rich repeat*, LRR), gefolgt von einer

zentral angeordneten Nukleotidbindestelle (*nucleotide binding*, NB). Bei Arabidopsis können je nach N-Terminus zwei Gruppen von R-Proteinen unterschieden werden: CC-NB-LRR (COILED COILED-NB-LRR) und TIR-NB-LRR (DROSOPHILA TOLL AND HUMAN INTERLEUKIN-1 RECEPTOR-NB-LRR) (Nürnberger und Lipka, 2005).

Für eine direkte Interaktion von Effektor und R-Protein gibt es bis heute nur wenige Beispiele, wie den *Ralstonia solanacearum*-Effektor PopP2, der vom Arabidopsis R-Protein RRS1-R erkannt werden kann (Deslandes *et al.*, 2003) sowie die Perzeption von AvrL567 aus *Melampsora lini* durch L5/L6 des Flachs (*Linum usitatissimum*) (Dodds *et al.*, 2006).

Da eine direkte Erkennung der Avirulenzfaktoren eine sehr große Anzahl pflanzlicher Rezeptoren erfordern würde, wird davon ausgegangen, dass der überwiegende Teil der Pathogenerkennung auf indirektem Weg erfolgt (Dangl und Jones, 2001). Während die direkte Interaktion als Liganden-Rezeptor-Modell bezeichnet werden kann (van der Hoorn und Kamoun, 2008), wurde für die indirekte Erkennung der Effektoren zunächst der Begriff des *guard*-Modells geprägt. Laut diesem Modell „überwachen“ die R-Proteine die Ziele der Effektoren. Modifikationen dieser Zielproteine durch die Wirkung der Effektoren werden perzipiert und führen zur Aktivierung der R-Proteine (van der Biezen und Jones, 1998; Jones und Dangl, 2006). Ein gut untersuchtes Beispiel für die indirekte Effektor-Erkennung ist das R-Protein RIN4 aus Arabidopsis, das mit den *P. syringae*-Effektoren AvrRpt2, AvrRpm1 und AvrB als Zielmoleküle interagiert (Mackey *et al.*, 2002; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003). Die Cysteinprotease AvrRpt2 ist in der Lage RIN4 zu spalten und somit zu eliminieren, während AvrRpm1 und AvrB eine Phosphorylierung von RIN4 bewirken. Diese Vorgänge setzen die pflanzlichen R-Proteine RPM1 und RPS2 frei, mit denen RIN4 im Normalzustand direkt bzw. indirekt interagiert, was in einer Abwehrreaktion gegen *P. syringae* resultiert (Hou *et al.*, 2011).

Wichtiger Bestandteil des *guard*-Modells ist die Annahme, dass in Abwesenheit eines entsprechenden R-Proteins das Zielprotein für die Virulenzfunktion des Effektors essentiell ist. Es existieren jedoch Interaktionen zwischen R-Protein und Effektor, die sich nicht durch das *guard*-Modell erklären lassen, da durch die Aktivierung der pflanzlichen Zielproteine kein erkennbarer Nutzen für das Pathogen entsteht. Ein Beispiel hierfür ist die Erkennung des Effektors AvrBs3 aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* durch den *Bs3*-Promotor (*pBs3*) aus Paprika (Römer *et al.*, 2007). Das eigentliche Ziel von AvrBs3 scheint der Promotor des Transkriptionsfaktors *Upa20* zu sein, der an der Induktion von Hypertrophie in der Wirtszelle beteiligt ist (Kay *et al.*, 2007). Da in Abwesenheit von AvrBs3 keine Expression von *Bs3* detektiert wird, scheint dieses Gen keine offensichtliche Funktion zu besitzen (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Vielmehr wird vermutet, dass *pBs3* als eine Art Köder fungiert und somit *Upa20* als eigentliches Ziel von AvrBs3 schützt (Zhou und Chai, 2008).

Aufgrund dieser Erkenntnisse postulierten van der Hoorn und Kamoun (2008) das *decoy*-Modell als eine Modifizierung des *guard*-Modells. Demnach sind Pflanzen in der Lage, das eigentliche Zielprotein eines Effektors durch einen sogenannten Köder (*decoy*) zu imitieren und damit vor Modifikationen zu schützen. Evolutionär betrachtet stehen die Komponenten dieser Interaktion unter unterschiedlichen Formen der Selektion um eine Anpassung zu erreichen. So muss das pflanzliche Zielprotein der Manipulation durch den Effektor entgehen, während der Effektor sich anpassen muss, um das veränderte Zielprotein zu erkennen und gleichzeitig eine Interaktion mit dem Köder verhindern muss. Die als Köder fungierenden Proteine müssen sich an neue Effektoren anpassen und dabei mögliche Autoimmunantworten unterbinden (van der Hoorn und Kamoun, 2008). Diese Co-Evolution von R-Proteinen und Effektoren spiegeln erneut das Modell von Jones und Dangl (2006) wider (siehe auch Kapitel 1.1).

Die Voraussetzung zur Erkennung von Effektoren und damit verbunden die Initiierung von Abwehrreaktionen und Ausprägung einer ETI ist der Transport der Effektoren in das Cytoplasma der Wirtszelle. Je nach Pathogengruppe können verschiedene Transportmechanismen klassifiziert werden. Bakterielle Pathogene nutzen Sekretionssysteme, wie z. B. das Typ III-Sekretionssystem, bei dem die Effektoren mit Hilfe des sogenannten Injektisoms in die Wirtszelle sekretiert werden (Büttner und He, 2009). Bei Pilzen und Oomyceten erfolgt der Transport der Effektoren über eine extrahaustorielle Matrix (Kale, 2012), die sich als Grenzfläche zwischen Pathogen und Wirt ausbildet. Diese Matrix ist Teil des Haustoriums, das als hyphenförmiges Organ vom Pathogen ausgebildet wird, um der Wirtszelle Wasser und Nährstoffe zu entziehen (Eichmann und Hückelhoven, 2008).

Die Verfügbarkeit der Genomsequenzen einiger der bedeutendsten pathogenen Oomyceten, einschließlich *Pythium*-, *Phytophthora*-, *Albugo*- und *Hyaloperonospora*-Spezies, haben maßgeblich zur Identifizierung und Klassifizierung putativer Effektorproteine beigetragen. Dabei konnte eine unerwartet hohe Anzahl diverser Effektor Klassen ermittelt werden, was nahelegt, dass Oomyceten komplexe, hochentwickelte Pathogenitätsmechanismen entwickelt haben (Bozkurt *et al.*, 2012).

Generell können die Effektorproteine der Oomyceten in apoplastische und cytoplasmatische Effektoren eingeteilt werden. Zu ersteren zählen z. B. EPI1 und EPI10 aus *P. infestans*, bei denen es sich um sekretierte Multidomänen-Serinproteaseinhibitoren handelt (siehe Abbildung 1.6). Beide Proteine inhibieren die Tomaten-Protease P69B bzw. interagieren mit ihr, wodurch Abwehrmechanismen unterdrückt werden (Tian *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2005). Die zwei größten Klassen cytoplasmatischer Effektoren bilden die RXLR-dEER (kurz RXLR)- bzw. *Crinkler* (*crinkling- and necrosis inducing*, CRN)-Proteine, die sich durch ein N-terminales Signalpeptid gefolgt von hoch konservierten Motiven auszeichnen. Vertreter der RXLR-Proteine sind u. a. ATR1, ATR13, AVR3a und AVR1b-1 aus *Phytophthora* spp.

(siehe Abbildung 1.6). In den vergangenen Jahren wurden Effektoren identifiziert, wie z. B. ATR5 aus *H. arabidopsidis*, die eine leichte Abweichung zu den typischen RXLR-Proteinen aufzeigen. So weist ATR5 anstelle des kanonischen RXLR-Motives ein GRVR-Motiv auf, besitzt jedoch Ähnlichkeit zu typischen RXLR-Domänen und trägt zusätzlich das ebenfalls hoch konservierte EER-Motiv (Bailey *et al.*, 2011). Insgesamt gibt es allein im Genom von *P. infestans* 563 vorhergesagte Gene, die RXLR-Proteine kodieren. Zudem wurde gezeigt, dass die Effektorproteine in *P. infestans* Anzeichen positiver Selektion aufweisen, die dazu führt, dass eine große Anzahl an Aminosäure-Polymorphismen auftreten (Raffaele *et al.*, 2010). Somit ist es nicht überraschend, dass wiederholt über die Identifizierung neuer Effektoren mit leicht abgewandelten RXLR-Motiven berichtet wird.

Das RXLR-Motiv scheint für die Translokation von Effektorproteinen in die Pflanzenzelle erforderlich zu sein. Bhattacharjee *et al.* (2006) berichten über die Ähnlichkeit des RXLR-Motives mit dem Pexel-Motiv, das beim Malariaerreger *Plasmodium falciparum* für die Translokation parasitärer Proteine in die Erythrozyten des Wirts verantwortlich ist. Weiterhin wurde innerhalb dieser Studie gezeigt, dass die RXLR-Domänen der *P. infestans*-Proteine AVR3a und PH001D5 den Transport von GFP aus *P. falciparum* in Erythrozyten vermitteln können. Dies legt nahe, dass eukaryotische Pflanzen- und Tierpathogene ähnliche Mechanismen bzw. Sekretionssignale für den Transport von Effektorproteinen besitzen (Haldar *et al.*, 2006).

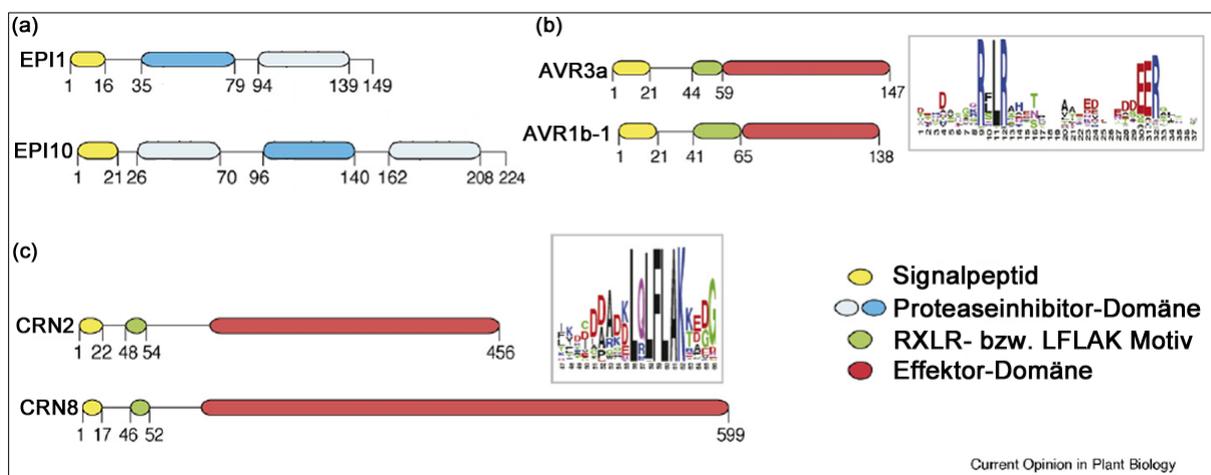


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Struktur diverser *P. infestans*-Effektoren, modifiziert nach Kamoun (2007). In (a) sind EPI1 und EPI10 als Vertreter apoplastischer Effektoren aus *P. infestans* schematisch dargestellt. Neben einem Signalpeptid (gelb) zeichnen sich diese Proteine durch mehrere Proteaseinhibitor-Domänen (blau) aus. (b) AVR3a und AVR1b-1 gehören als cytoplasmatische Effektoren zur Gruppe der RXLR-Proteine. Dem Signalpeptid folgt hier ebenfalls N-terminal eine Domäne mit einem hoch konservierten RXLR-Motiv (grün), an welches sich eine Effektor-Domäne anschließt. Ebenfalls zu den cytoplasmatischen Effektoren zählen die Crinkler-Proteine CRN2 und CRN8 (c), die anstatt des RXLR-Motives ein N-terminales LFLAK-Motiv aufweisen.

Zahlreiche Studien bestätigen zwar die Hypothese, dass die RXLR-Domäne für die Translokation von Effektorproteinen essentiell ist (Kale, 2012), jedoch ist der Transport-

mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt. Aus Untersuchungen mit den Effektorproteinen AVR1b aus *P. infestans* und AVR3a aus *P. sojae* konnten neue, wenn auch widersprüchliche Erkenntnisse über mögliche Transportmechanismen gewonnen werden. Kale *et al.* (2010) fanden heraus, dass die RXLR-Domäne von AVR1b eine Bindung des Proteins an Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) vermittelt. Für das aufgereinigte AVR1b-Protein konnten eine Bindung an die PIPs Phosphatidylinositol-3-phosphat (PI3P) und Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) sowie die Fähigkeit der Penetration der Wirtszelle nachgewiesen werden. Wurde die RXLR-Domäne mutiert, gingen diese Eigenschaften verloren (Kale *et al.*, 2010). Die N-terminale Region einschließlich des RXLR-Motives von AVR1b ermöglicht ebenfalls die Bindung an PI4P, aber nicht an PI3P, wobei die Anwesenheit des RXLR-Motives notwendig war. Aufgrund dieser Ergebnisse stellen die Autoren folgende Hypothese auf: das RXLR-Motiv vermittelt den Effektortransport in die Wirtszelle durch die Bindung an PIPs, die auf der Oberfläche der pflanzlichen Plasmamembran lokalisiert sind, was die Endocytose des Effektors in die Pflanzenzelle initiiert (Kale *et al.*, 2010).

Im Widerspruch zu dieser Hypothese stehen die Erkenntnisse von Yaeno *et al.* (2011). Für die Effektoren AVR3a (aus *P. infestans*) und AVR1b (aus *P. sojae*) konnte eine Interaktion mit PIPs zwar bestätigt werden, jedoch bewirkten Mutationen in den RXLR-Motiven beider Proteine keine Störung der PIP-Bindung. Zusätzlich zeigten Deletionsanalysen, dass die PIP-Bindung von AVR3a durch eine C-terminale Region vermittelt wird, die nicht das RXLR-Motiv enthält. Darüber hinaus konnte ein N-terminales Fragment, welches die RXLR-Domäne enthielt, nicht mit den PIPs interagieren (Yaeno *et al.*, 2011). NMR (*nuclear magnetic resonance*, Kernspinresonanz)- und Modelling-Studien mit dem *P. capsici*-Effektor AVR3a4 zeigten, dass AVR3a und AVR1b wie auch das Effektorprotein AVR3a4 bestimmte Oberflächenbereiche positiv geladener Aminosäuren aufweisen, die möglicherweise die negativ geladenen PIPs binden könnten. Bestätigt wurde diese Vermutung durch die Erkenntnis, dass Mutationen innerhalb dieser positiv geladenen Bereiche in AVR1b und AVR3a zu einer Verringerung bzw. vollständigem Verlust der PIP-Bindung führten (Yaeno *et al.*, 2011).

Aufgrund der unterschiedlichen Erkenntnisse der beiden Arbeitsgruppen ist weiterhin nicht vollständig geklärt, wie der Transport oomycetischer Effektorproteine in die Pflanzenzelle stattfindet. Zusätzliche Experimente müssen klären, ob z. B. die Bindung der PIPs an die positiv geladenen Bereiche der Effektoren für die Aufnahme der Proteine in die Zelle notwendig ist (Ellis und Dodds, 2011).

1.1.5 Bedeutung der putativen Kinase EDR1 für die pflanzliche Abwehrreaktion

Für Arabidopsis konnten mit Hilfe von Mutanten-Analysen pflanzliche Komponenten identifiziert werden, die zur erfolgreichen Abwehr phytopathogener Mikroorganismen beitragen. Unter Verwendung des adaptierten Mehлтаupilzes *Golovinomyces cichoracearum* isolierten

Frye und Innes (1998) sechs Arabidopsis-Mutanten, die *edr* (*enhanced disease resistance*)-Mutanten, die eine erhöhte Resistenz gegen das getestete Pathogen sowie gegen das adaptierte hemibiotrophe Bakterium *Pto* DC3000 besitzen. Diese *edr*-Mutanten zeigen keine konstitutive Expression des Abwehrgens *PR1*, jedoch wurde für *edr1* und *edr2* gezeigt, dass sie im Vergleich zum Wildtyp einen konstitutiv höheren Gehalt und nach Pathogenbefall eine höhere Akkumulation an freier SA aufweisen (Yao *et al.* 2012). Damit grenzen sich die *edr*-Mutanten von den bisher beschriebenen *cpr* (*constitutive PR expression*)-Mutanten, wie z. B. *cpr1* und *cpr5* ab, bei denen die konstitutive *PR*-Genexpression eine Resistenz gegen den Falschen Mehltau *H. arabidopsidis* sowie das bakterielle Pathogen *P. syringae* pv. *maculicola* bewirkt (Frye und Innes, 1998). Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass besonders EDR1 für die Wirts- und Nichtwirtsresistenz von Bedeutung ist. Im Folgenden sollen die Erkenntnisse, welche durch die Untersuchung der *edr1*-Mutante mit diversen Pathogenen erlangt wurden (als Übersicht in Tabelle 1.1 zusammengefasst), ausführlicher beschrieben werden.

Für *edr1* wurde durch genetische Kartierung und die anschließende Analyse von Kandidatengen eine Punktmutation in dem Gen *At1g08720* identifiziert, durch das die putative MAPKKK *EDR1* kodiert wird (Frye *et al.*, 2001). Die Nukleotidsubstitution in der *edr1*-Mutante resultiert in der Einführung eines vorzeitigen Stop-Codons innerhalb der Nicht-Kinasedomäne des EDR1-Proteins (Frye *et al.*, 2001) und dadurch zu einem Verlust der *in vitro*-Kinaseaktivität von EDR1 (Tang und Innes, 2002). Ein Abgleich der Sequenz von *EDR1* mit der GenBank-Datenbank ergab, dass es in Arabidopsis fünf homologe Gene zu *EDR1* gibt, bei denen die C-terminalen Kinasedomänen eine Identität von über 65 % aufweisen, wohingegen der Nicht-Kinasebereich am N-Terminus nur zu 25 % identisch ist (Frye *et al.*, 2001). *EDR1* wird von den Autoren in eine Untergruppe der MAP3Ks eingeordnet, zu der auch die bereits in der Literatur beschriebene MAPKKK *CTR1* (*CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1*) zählt. Die *ctr1*-Mutante weist in Abwesenheit von Ethylen einen Phänotyp auf, der sonst nur nach Applikation des Phytohormons zu beobachten ist und als „Dreifachantwort“ bezeichnet wird. Er beinhaltet das Auftreten einer verkürzten Wurzel, eines kurzen und verdickten Hypokotyls sowie die Krümmung des Hypokotylhakens bei Anzucht im Dunkeln (Kieber *et al.*, 1993). Zusätzlich wird in *ctr1* eine konstitutive Expression Ethylen-induzierbarer Gene verzeichnet. *CTR1* fungiert demnach als Negativ-Regulator Ethylen-induzierter Signaltransduktionswege. Aufgrund der hohen Identität von *CTR1* und *EDR1* wurde für die *edr1*-Mutante ein ähnlicher Effekt auf die Ethylen-Antworten vermutet. Da jedoch keine der für *ctr1* beschriebenen Phänotypen vorliegt, wurde zunächst angenommen, dass *EDR1* nicht im Ethylen-Signalweg agiert (Frye *et al.*, 2001).

Tabelle 1.1: Übersicht der Phänotypen der *edr1*-Mutante nach Pathogenbehandlung

↑ = erhöhte Resistenz / verringerte Suszeptibilität; ↓ = verringerte Resistenz (bei Nichtwirts-Interaktion mit *C. gloeosporioides*) / erhöhte Suszeptibilität (bei Wirts-Interaktion mit *C. higginsianum* und *A. brassicicola*); ↑? = erhöhte Resistenz, aber variabel; n.b. = nicht bestimmt, - = nicht vorhanden; + = vorhanden

	Pathogen	Lebensweise	Pathogenart	Phänotypen von <i>edr1</i> nach Inokulation				Referenz
				Resistenz ↑ / ↓	Callose- ablagerung	erhöhte <i>PR1</i> - Akkumulation	erhöhte Penetration	
Wirt	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	biotroph	Pilz	↑	+	+	n.b.	Frye und Innes (1998) Frye <i>et al.</i> (2001) Tang <i>et al.</i> (2005) Xiao <i>et al.</i> (2005) Pan <i>et al.</i> (2012)
	<i>Erysiphe orontii</i>	biotroph	Pilz	↑	n.b.	n.b.	n.b.	Xiao <i>et al.</i> (2005)
	<i>Erysiphe cruciferarum</i>	biotroph	Pilz	↑	n.b.	n.b.	n.b.	Xiao <i>et al.</i> (2005)
	<i>Oidium lycopersici</i>	biotroph	Pilz	↑	n.b.	n.b.	n.b.	Xiao <i>et al.</i> (2005)
	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>	biotroph	Oomycet	↑	+	+	n.b.	van Hulst <i>et al.</i> (2006) Pan <i>et al.</i> (2012)
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>	hemibiotroph	Bakterium	↑?	n.b.	n.b.		Frye und Innes (1998)
	<i>Pto</i> DC3000	hemibiotroph	Bakterium	↑?	n.b.	+		Frye und Innes (1998) van Hulst <i>et al.</i> (2006)
	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRpt2</i>	hemibiotroph	Bakterium	↑?	n.b.	n.b.		Pan <i>et al.</i> (2012)
	<i>Colletotrichum higginsianum</i>	hemibiotroph	Pilz	↓	n.b.	n.b.	+	Hiruma <i>et al.</i> (2011)
	<i>Alternaria brassicicola</i>	nekrotroph	Pilz	↓	n.b.	n.b.		Hiruma <i>et al.</i> (2011)
Nichtwirt	<i>Erysiphe pisi</i>	biotroph	Pilz	-	n.b.	n.b.	-	Hiruma <i>et al.</i> (2011)
	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	hemibiotroph	Pilz	↓	n.b.	n.b.	+	Hiruma <i>et al.</i> (2011)
	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	hemibiotroph	Pilz	-	n.b.	n.b.	-	Hiruma <i>et al.</i> (2011)

Im Gegensatz zum Wildtyp ist die Infektion von *edr1* mit dem Wirtspathogen *G. cichoracearum* durch eine hypersensitive Reaktion des Mesophylls charakterisiert, die mit einer *GSL5* (*GLUCAN SYNTHASE-LIKE5*)-abhängigen Calloseablagerung einhergeht (Frye und Innes, 1998; Wawrzynska *et al.*, 2010). Weiterhin können eine schnellere und stärkere Akkumulation der reaktiven Sauerstoffspezies H_2O_2 sowie des Transkriptes des Abwehrgens *PR1* beobachtet werden (Frye und Innes, 1998; Pan *et al.*, 2012). Aufgrund dieser verstärkten Transkriptakkumulation von *PR1*, die ebenfalls bei Behandlung mit den biotrophen Wirtspathogenen *Pto* DC3000 sowie *H. arabidopsidis* auftritt (Frye und Innes, 1998; van Hulsten *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2012), wird *edr1* als Priming-Mutante bezeichnet und in Untersuchungen des Priming-Effektes eingesetzt (Conrath *et al.*, 2006; van Hulsten *et al.*, 2006; Beckers *et al.*, 2009). Priming bezeichnet dabei den physiologischen Zustand von Pflanzen, der es ihnen im Vergleich zu Pflanzen ohne Priming ermöglicht, eine schnellere Abwehrreaktion auf biotische und abiotische Stressoren zu aktivieren (Conrath *et al.*, 2002). Neben der schnelleren *PR1*-Akkumulation kann in der Interaktion von *edr1* mit *H. arabidopsidis* zusätzlich eine verstärkte Calloseablagerung und ein geringeres Pathogenwachstum beobachtet werden, was die Annahme eines Priming-Effektes bestätigt (van Hulsten *et al.*, 2006). Beckers *et al.* (2009) stellen die Hypothese auf, dass der in *edr1* beobachtete Priming-Effekt teilweise auf eine erhöhte Aktivierung der Stress-responsiven Kinasen MPK3 und MPK6 zurückzuführen ist.

Eine weitere Komponente der Resistenz von *edr1* gegen *G. cichoracearum* wurde kürzlich von Yao *et al.* (2012) identifiziert. Die *rpn1a*-Mutante wurde im Rahmen der Suche nach Suppressormutanten für die *edr2*-vermittelte Mehltau-Resistenz isoliert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass auch die *edr1*-vermittelte Resistenz durch eine Mutation in *RPN1a* unterdrückt werden kann. *RPN1a* kodiert für eine Untereinheit des 26S-Proteasoms, das für die Proteindegradation von großer Bedeutung ist (Voges *et al.*, 1999). Proteinabbau spielt sowohl in pflanzlichen Abwehrreaktionen als auch in der Ausprägung von Zelltod eine wichtige Rolle (Yao *et al.* 2012). Die genaue Funktion von *RPN1a* in der Resistenz gegen *G. cichoracearum* ist jedoch noch ungeklärt.

Zusätzlich zur veränderten Pathogenresistenz weist die *edr1*-Mutante eine verstärkte Ethylen-induzierte Seneszenz auf und unter Trockenstress kommt es zur Wachstumsinhibierung und der Ausprägung HR-ähnlicher Nekrosen (Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). Während der Seneszenz-Phänotyp vom Ethylen-Signalweg abhängig ist (Tang *et al.*, 2005), besteht für die Ausbildung der Pathogenresistenz und Trockenstress-Nekrosen eine SA-Abhängigkeit (Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). Die Trockenstress-induzierte Wachstumsinhibierung scheint sowohl Ethylen- als auch SA-abhängig zu sein, da Mutationen beider Signalwege diesen Phänotyp unterdrücken können (Tang *et al.*, 2005).

Außer Ethylen und SA ist Abscisinsäure (*abscisic acid*, ABA) als weiteres Phytohormon an den *edr1*-vermittelten Phänotypen beteiligt. Durch Remutagenese von *edr1* wurde die Mutante *keg-4* (*keep on going-4*) als ein Suppressor aller *edr1*-Phänotypen identifiziert (Wawrzynska *et al.*, 2008). *KEG* kodiert für eine Ubiquitin-Ligase, welche die Proteinmenge des Transkriptionsfaktors *ABI5* (*ABCISIC ACID-INSENSITIVE 5*) negativ reguliert und dadurch vermutlich eine zentrale Rolle im ABA-Signalweg einnimmt (Stone *et al.*, 2006). *ABI5* ist für die Aktivierung zahlreicher ABA-responsiver Gene, wie z. B. *RD29A* (*RESPONSIVE TO DESSICATION29A*), verantwortlich und kann auch selbst durch ABA induziert werden (Lopez-Molina *et al.*, 2001; Brocard *et al.*, 2002). Zusätzlich zur Identifizierung von *keg-4* als Suppressor von *edr1* wird die putative Rolle von ABA für die Etablierung der *edr1*-Phänotypen dadurch bestätigt, dass *edr1* eine Hypersensitivität gegen ABA sowie ein erhöhtes *RD29A*-Transkriptlevel nach exogener ABA-Applikation aufweist (Wawrzynska *et al.*, 2008). *KEG* und *EDR1* interagieren direkt miteinander und als Folge davon kann eine Lokalisation des Komplexes am trans-Golgi-Netzwerk/frühen Endosomen beobachtet werden. Diese Lokalisation lässt eine Beteiligung beider Proteine an der Endocytose und/oder der Formation von Vesikeln vermuten (Gu und Innes, 2011).

Pan *et al.* (2012) berichten von einer weiteren Mutante, die analog zu *keg-4* aus der Remutagenese von *edr1* hervorging und eine Deletion in *HPR1* (*HYPER RECOMBINATION1*) aufweist. Das *HPR1*-Protein ist Teil des putativen THO/TREX (SUPPRESSOR OF THE TRANSCRIPTIONAL DEFECT OF HPR1 BY OVEREXPRESSION/TRANSCRIPTION-EXPORT)-Komplexes in Arabidopsis (Furumizu *et al.*, 2010; Jauvion *et al.*, 2010; Yelina *et al.*, 2010). Dieser konservierte Komplex spielt in Menschen und Hefen eine bedeutende Rolle in der Verarbeitung und dem Export von mRNA (Reed und Cheng, 2005). Im Gegensatz zu einer vergleichsweise niedrigen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von *AtHPR1* mit seinem Homologen *HsHPR1* weisen die *HPR1*-Proteine innerhalb der Pflanzen eine hohe Ähnlichkeit auf (Pan *et al.*, 2012).

Ähnlich wie *keg-4* unterdrückt die *hpr1-4*-Mutation die *edr1*-vermittelte Resistenz gegen *G. cichoracearum*, die Pathogen-induzierte Calloseablagerung und die Akkumulation des *PR1*-Transkriptes (Pan *et al.*, 2012). Dahingegen wird die Ethylen-induzierte Seneszenz durch *hpr1-4* noch verstärkt. Da die *hpr1-4*-Mutante eine induzierbare „Dreifachantwort“ zeigt, die abhängig von EIN2 und EIN3 und unabhängig von *EDR1* ist, vermuten die Autoren eine Mitwirkung von *HPR1* im Ethylen-Signalweg. Inwiefern der THO/TREX-Komplex mit *EDR1* in Verbindung steht und in der Immunantwort von Pflanzen involviert ist, bleibt unklar. Pan *et al.* (2012) spekulieren, dass der Komplex an der Regulierung des Transportes der mRNA von Abwehrgenen beteiligt sein könnte und der in *hpr1-4* beobachtete Ethylen-Phänotyp vermutlich auf eine Deregulierung des mRNA-Transportes wichtiger Negativregulatoren des Ethylen-Signalweges zurückzuführen ist.

Während in den bisher beschriebenen Pathogenexperimenten mit der *edr1*-Mutante die Interaktion mit adaptierten Pathogenen analysiert wurde, berichten Hiruma *et al.* (2011) über eine Mitwirkung von EDR1 an der Nichtwirtsresistenz. Die Autoren ermittelten für den nicht-adaptierten hemibiotrophen Mehltaupilz *Colletotrichum gloeosporioides* auf *edr1* eine höhere Penetrationshäufigkeit als auf Wildtyppflanzen. Die Penetrationsrate war mit den für *C. gloeosporioides* auf *pen2* beobachteten Werten vergleichbar, während die *edr1pen2*-Doppelmutante eine deutlich höhere Penetrationshäufigkeit als die Einzelmutante aufwies. Zusätzlich zeigten die Einzel- und Doppelmutanten nekrotische Läsionen, die in der Doppelmutante jedoch stärker ausgeprägt waren. Aufgrund der additiven Effekte bei der Penetrationshäufigkeit und Stärke der Läsionen vermuten die Autoren, dass EDR1 und PEN2 in unterschiedliche Abwehrmechanismen integriert sind. Anhand von Microarray-Analysen stellten sie fest, dass in *edr1* nach Inokulation mit *C. gloeosporioides* vier Gene reprimiert waren, die die Pflanzendefensine PDF1.2a, PDF1.2b, PDF1.2c und PDF1.3 kodieren. EDR1 scheint demnach für die Aktivierung dieser Gene während der Interaktion mit dem Pathogen notwendig zu sein. Ein gegenteiliger Effekt bezüglich der *PDF1.2*-Expression kann in Pflanzen mit einer Mutation im Transkriptionsfaktor *MYC2* beobachtet werden. Dieser ist vermutlich an der Repression von *PDF1.2a* beteiligt, da *myc2*-Mutanten eine erhöhte Expression von *PDF1.2a* aufweisen (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). Hiruma *et al.* (2011) beobachteten, dass die in *myc2* vorliegende Erhöhung des *PDF1.2*-Transkriptlevels nach *C. gloeosporioides*-Inokulation durch die Mutation in *EDR1* aufgehoben wird. Daher vermuten die Autoren eine Funktion von EDR1 als Negativregulator von *MYC2*, der wiederum die Expression des Abwehrgens *PDF1.2* reprimiert.

Obgleich EDR1 bereits ausführlich charakterisiert ist, bleibt die exakte Funktion ungeklärt. EDR1 ist eine putative MAPKKK, deren Phosphorylierungsaktivität für das artifizielle Substrat MyBP (Myelin Basic Protein) *in vitro* bestätigt wurde (Tang und Innes, 2002). Es ist jedoch von besonderem Interesse auch physiologische Substrate von EDR1 zu identifizieren. Als putative Interaktionspartner wurden dabei bisher in einem Hefe-2-Hybrid-System (*yeast two hybrid assay*, kurz Y2H) Ethylenrezeptoren getestet, die aufgrund der Homologie von EDR1 zu dem im Ethylensignalweg involvierten CTR1 als mögliche Substrate in Frage kamen (Tang *et al.*, 2000). Jedoch konnte keine Interaktion von EDR1 mit den getesteten Proteinen nachgewiesen werden. In einem weiteren Y2H-Ansatz wurden die Arabidopsis-Proteine *MYC2* sowie *KCA1* (KINESIN CDKA;1 [CYCLIN-DEPENDENT KINASE ACTIVITY 1] ASSOCIATED1) als Interaktionspartner von EDR1 identifiziert (Christiansen, 2008). Weiterführende Untersuchungen mit dem ABA-induzierbaren Transkriptionsfaktor *MYC2* konnten die *in vitro*-Versuche jedoch nicht bestätigen, da keine Interaktion von EDR1 und *MYC2* *in planta* nachgewiesen werden konnte. Demnach gibt es bis zum heutigen Tag kein validiertes Substrat der putativen MAPKKK EDR1.

Angesichts der Anzahl und Art der hier nur teilweise dargestellten Pflanze-Pathogen-Interaktionen, in denen EDR1 involviert ist, wird die Schlüsselstellung dieser Komponente sowohl für die Wirts- als auch die Nichtwirtsresistenz deutlich. Zusammenfassend betrachtet kann man formulieren, dass EDR1 als Negativregulator von Zelltod, Seneszenz sowie Trockenstress-induzierter Wachstumsinhibierung und Läsionsformation fungiert, dabei aber gleichermaßen eine positive Regulierung der Abwehrreaktion gegen Vertreter der *Colletotrichum*-Spezies vermittelt. In Abbildung 1.7 ist zusammenfassend die Beteiligung von EDR1 an der Reaktion auf verschiedene Stimuli schematisch dargestellt.

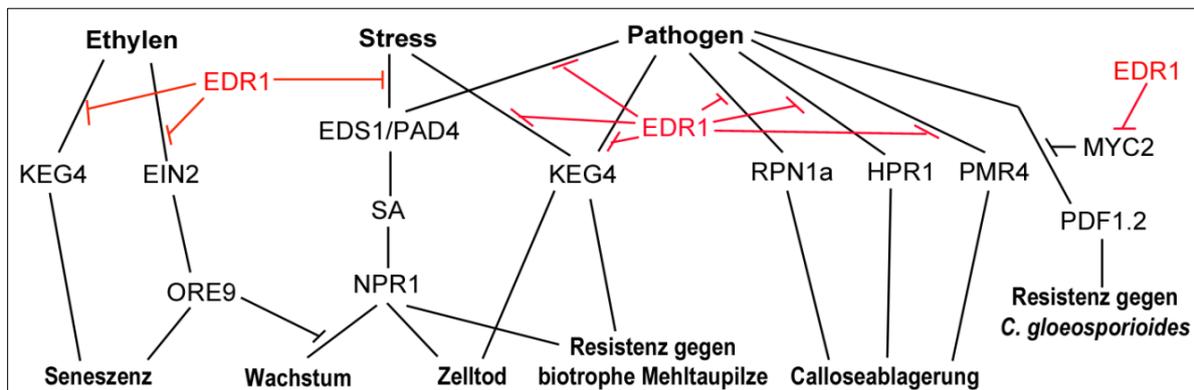


Abbildung 1.7: Beteiligung von EDR1 an der Reaktion auf (a)biotische Faktoren

Als Grundlage diente ein Modell von Tang *et al.* (2005), in dem die Rolle von EDR1 bei der Entstehung von Zelltod, Trockenstresstoleranz und Seneszenz schematisch zusammengefasst wurde. Weitere im Kapitel 1.1.5 dargelegte Erkenntnisse wurden in dieses Modell eingearbeitet.

1.2 Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans*

1.2.1 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary

P. infestans ist ein hemibiotropher Vertreter der Oomyceten, deren Zellwand aus Cellulose und β -1,3-Glucanen aufgebaut ist und kein Chitin enthält. Oomyceten werden der Gruppe der Stramenopilen zugeordnet, deren nächste Verwandte heterokonte Algen sind (Erwin und Ribeiro, 1996; Sogin und Silberman, 1998; Baldauf *et al.*, 2000). Die Haupt-Wirtspflanzen von *P. infestans* stellen Vertreter der *Solanaceae* dar, wie z. B. Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Petunie (*Petunia* spp.) (Erwin und Ribeiro, 1996). *Phytophthora* bedeutet „Pflanzenzerstörer“, was auf den immensen Schaden hindeutet, der durch Vertreter der *Phytophthora*-Spezies verursacht wird. Als Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel verursachte *P. infestans* die große Hungersnot in Irland in den 1840er Jahren. Heutzutage entstehen weltweit hohe Ernteaufälle durch *P. infestans*, die im Jahre 2009 einem wirtschaftlichen Verlust von etwa 5,2 Milliarden US-\$ (ca. 4,1 Mrd. €) entsprachen (Haverkort *et al.*, 2009). Die Bekämpfung dieses Pathogens z. B. durch genetisch resistente Kartoffelsorten gestaltet sich durch die schnelle Adaptierung von *P. infestans* schwierig (McDonald und Linde, 2002; Fry, 2008). Die Applikation von

Pflanzenschutzmitteln ist eine weitere Möglichkeit zur Eindämmung der Kraut- und Knollenfäule und häufig werden vielversprechende anti-oomycetisch wirkende Substanzen publiziert (Uchida *et al.*, 2005; Cohen und Gisi, 2007; Cohen *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Son *et al.*, 2008; Eschen-Lippold *et al.*, 2009), jedoch kommt es innerhalb kurzer Zeit immer wieder zur Ausprägung und Ausbreitung resistenter Stämme (Shattock, 2002).

Die in Folge der Sequenzierung des Genoms von *P. infestans* (Haas *et al.*, 2009) gewonnenen Daten können zum Verständnis der schnellen Anpassungsfähigkeit von *Phytophthora* und somit zur Entwicklung neuer Strategien zur Krankheitsbekämpfung beitragen. Das *P. infestans*-Genom ist ~240 Mbp groß und besteht zu etwa 74 % aus repetitiven DNA-Sequenzen. Die Genome der nahe verwandten Spezies *P. sojae* und *P. ramorum* weisen eine deutlich geringe Größe von 95 Mbp bzw. 65 Mbp auf (Haas *et al.*, 2009). Die Autoren berichten weiterhin, dass alle drei Spezies sich durch eine Region im Genom auszeichnen, die Gene der DNA-Replikation, Transkription und Translation umfassen. Im Gegensatz dazu befinden sich die Avirulenz-Gene, welche u. a. die RXLR- und CRN-Effektoren kodieren, in der Regel in Regionen mit hochrepetitiver DNA bzw. geringer Gendichte. Die RXLR-Effektoren kommen im *P. infestans*-Genom im Vergleich zu anderen *Phytophthora*-Spezies in einer stark erhöhten Anzahl vor. Weiterhin scheinen die RXLR-Gene, die extensive Sequenzunterschiede innerhalb von *P. infestans* aufweisen, einer dynamischen Veränderung ausgesetzt zu sein. Haas *et al.* (2009) vermuten als Ursache dafür die Co-Evolution der Effektoren und der entsprechenden Rezeptoren der Wirtspflanzen und sehen darin die Grundlage für die Adaptionfähigkeit des Pathogens.

1.2.2 Interaktion von *A. thaliana* mit *P. infestans*

Die ersten Beschreibungen der Interaktion zwischen *P. infestans* und dessen Nichtwirt *A. thaliana* stammen von Kamoun (2001) und Huitema *et al.* (2003). In der Regel ist nach Applikation hoher Sporenkonzentrationen auf Arabidopsis-Blättern keine makroskopisch sichtbare Reaktion zu beobachten, jedoch tritt gelegentlich eine HR auf. Mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass die Keimung einer *P. infestans*-Zyste mit anschließender Penetration einer pflanzlichen Epidermiszelle frühestens 46 h nach Zoosporenapplikation festgestellt werden kann und auch die Ausbildung kurzer sekundärer Hyphen zu beobachten ist. Typische Merkmale einer erfolgreich penetrierten Epidermiszelle von Arabidopsis sind eine Körnung des Cytoplasma, Verdickung der Zellwand, das Auftreten kondensierter Nuklei am Ort der Penetration sowie eine Autofluoreszenz von toten Epidermiszellen unter UV-Licht (Huitema *et al.*, 2003). Weitere Experimente innerhalb dieser Studie demonstrierten, dass die SA-abhängigen Abwehrgene *PR1* und *PR2* sowie das Jasmonsäure (*jasmonic acid*, JA)-abhängig exprimierte Gen *PDF1.2* nach *P. infestans*-Applikation induziert werden. Um detailliertere Einblicke in die Reaktion von *Arabidopsis* nach *Phytophthora*-Infektion zu erhalten,

wurden Microarray-Analysen durchgeführt (Huitema *et al.*, 2003). Dabei konnten sowohl Gene identifiziert werden, die bereits für Wirts-Interaktionen beschrieben sind, als auch Gene, die scheinbar spezifisch für eine Nichtwirts-Interaktion sein könnten. Unter den nach *P. infestans*-Applikation signifikant hochregulierten Genen waren u. a. Glykosylhydrolasen, die möglicherweise an der Modifikation der Zellwand beteiligt sind sowie eine Katalase, eine Peroxidase und zwei Glutathiontransferasen, die eine Rolle in der Etablierung der HR spielen.

Mit Hilfe von Mutanten wurden in den vergangenen Jahren weitere wichtige Komponenten der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* identifiziert. So spielt der in Kapitel 1.1.3 vorgestellte Mechanismus, an dem die Myrosinase PEN2 und der ABC-Transporter PEN3 beteiligt sind, eine essentielle Rolle für die prä-invasive Pathogenabwehr, da *pen2*- und *pen3*-Einzelmutanten eine erhöhte Penetration sowie eine verstärkte Formation invasiver Hyphen von *P. infestans* aufweisen (Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). Das an der Interaktion mit *Bgh* beteiligte Syntaxin PEN1 scheint hier unwichtig zu sein, da die *pen1*-Einzelmutante nach Inokulation mit *P. infestans* keine Unterschiede zum Wildtyp zeigt (Lipka *et al.*, 2005). Darüber hinaus gibt es keine weiteren Informationen, z. B. über pflanzliche Rezeptoren für die Erkennung von *P. infestans* oder über Komponenten, die an der post-invasiven Resistenz in dieser Interaktion beteiligt sind.

1.3 Ziele der Arbeit

Wichtige Faktoren der Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegen den hemibiotrophen Oomyceten *P. infestans* sind die Myrosinase PEN2 und der ABC-Transporter PEN3. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung weiterer Komponenten, die in prä- oder postinvasiven Abwehrmechanismen von Arabidopsis gegen *P. infestans* involviert sind.

Dazu wurde im Vorfeld der vorliegenden Arbeit die Arabidopsis-Mutante *pen2-1*, die in ihrer Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* beeinträchtigt ist, einer Mutagenese mit Ethylmethansulfonat unterzogen. Aus der Analyse der resultierenden M2-Generation gingen 14 unabhängige Mutanten hervor, die eine verstärkte HR nach *P. infestans*-Inokulation aufwiesen und als *enhanced response to Phytophthora infestans (erp)*-Mutanten bezeichnet wurden. Zwei dieser Mutanten, *pen2-1erp2* und *pen2-1erp6*, sollten in der vorliegenden Arbeit detaillierter untersucht werden. Dazu waren zunächst die für den Phänotyp verantwortlichen mutierten Gene zu identifizieren und charakterisieren. Je nach Gen-Annotation sollte eine Analyse der Funktion der kodierten Proteine in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* folgen. Zusätzlich sollte ihre Bedeutung für die Resistenz gegen Wirts- und andere Nichtwirtspathogene evaluiert werden. Eine Microarray-Analyse wurde durchgeführt, um Aufschluss über Änderungen in der Genexpression der Mutante *pen2-1erp2* nach Inokulation mit *P. infestans* zu erhalten.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Isotope, Oligonukleotide

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien und Lösungsmittel in Analysequalität verwendet und von den Firmen Bio-Rad, Carl Roth, Fluka, GE Healthcare oder Sigma-Aldrich erworben. Die genutzten (Restriktions-)Enzyme stammten von NEB, Roche oder Fermentas. Die verwendeten Isotope (α -[32P]-dATP, α -[32P]-dCTP, γ -[32P]-ATP) wurden von der Hartmann Analytik GmbH bezogen. Inhaltsstoffe für die Herstellung von Nährmedien und darin eingesetzte Antibiotika wurden bei Biozym, Difco sowie Duchefa erworben. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

2.1.2 Pflanzen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Ökotyp Col-0 als Kontrolle genutzt. Verwendete Mutanten und T-DNA-Insertionslinien von *Arabidopsis thaliana* (L.) sind im Anhang (Tabelle 6.2) zusammengefasst. Alle verwendeten T-DNA-Insertionslinien stammen vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC).

2.1.3 *Phytophthora infestans*

Für alle Inokulationsexperimente wurde das *P. infestans*-Isolat 208m2 verwendet (von F. Mauch, Université de Fribourg, Schweiz zur Verfügung gestellt), welches stabil mit dem green fluorescent protein (GFP) transformiert wurde (Si-Ammour *et al.*, 2003).

2.1.4 Bakterienstämme

Alle aufgeführten Klonierungen wurden mit dem *Escherichia coli*-Stamm DH5 α bzw. One Shot[®] TOP10-Zellen (Invitrogen) durchgeführt. Für Proteinexpressionen wurde der veränderte *E. coli* BL21- Stamm Rosetta-gami[™]B verwendet.

Für die Pathogeninfektionen wurde *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Whalen *et al.*, 1991; Buell *et al.*, 2003), *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 avrRpm1 (Debener *et al.*, 1991) bzw. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* Race6 1448A (Joardar *et al.*, 2005) genutzt.

2.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, diente bei allen nachfolgend beschriebenen Methoden, die die Zugabe von Wasser erforderten, deionisiertes Wasser, welches an einer Anionenaustauschersäule (Milli-Q; Millipore) aufbereitet wurde.

Aufgeführte Medien und hitzestabile Lösungen wurden bei 121 °C und einem Druck von 1 bar 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Zentrifugations- und Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Es wurden die Geräte 5804R sowie 5810R der Firma Eppendorf verwendet. Standardmäßige molekularbiologische Arbeitsmethoden wurden nach Sambrook *et al.* (1989) ausgeführt.

2.2.1 Pflanzenanzucht

Für Experimente mit *P. infestans* oder *Pseudomonas* wurden Arabidopsis-Pflanzen unter Kurztagbedingungen (8 h Licht-, 16 h Dunkelphase) bei 60 % Luftfeuchtigkeit und einer Lichteinstrahlung von 200 µE bei 22 °C in einer Phytokammer kultiviert. Die Aussaat der Samen erfolgte in einem Gemisch von gedämpfter GS 90-Einheitserde und Vermiculit (3:1), wobei die Anzuchtdauer der Pflanzen je nach durchgeführtem Experiment 4 - 6 Wochen betrug. Pflanzen, die auf eine Wachstumsinhibierung nach PAMP-Zugabe untersucht wurden, mussten steril angezogen werden (s. 2.2.4). Dazu erfolgte zunächst eine Oberflächensterilisation der Samen, anschließend wurden diese entsprechend der Experimente auf ATS-Platten oder in Murashige & Skoog (MS)-Medium transferiert und für mindestens 2 d bei 4 °C stratifiziert. Nach dieser Zeit wurden die Pflanzen im klimatisierten Lichtraum unter Langtagbedingungen (16 h Licht-, 8 h Dunkelphase) bei 20-22 °C für maximal 14 d kultiviert.

2.2.2 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Die Kreuzung von Arabidopsis-Pflanzen wurde analog der Beschreibung von Landtag (2006) durchgeführt.

2.2.3 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana*

Um stabile Arabidopsis-Transformanten zu erhalten, wurde die *Floral Dip*-Methode von Harrison *et al.* (2006) angewendet. Die Samen wurden dabei analog 2.2.4 oberflächensterilisiert.

2.2.4 Oberflächensterilisierung

Die Oberflächensterilisierung von Samen erfolgte mittels Chlorgas. Zur Selektion positiver Transformanten nach stabiler Transformation wurden trockene Samen in ein 2 mL-Eppendorfggefäß überführt, so dass der Boden bedeckt war. Mit geöffnetem Deckel wurden die Gefäße dann in einem Plastikständer angeordnet. Für die Wachstumsinhibitionsversuche nach PAMP-Zugabe wurden etwa 15 Samen in je eine Kavität einer 24-Well-Platte gebracht und diese anschließend mit BREATHseal™ (Greiner, BioOne) abgedeckt. Die so vorbereiteten Samen wurden dann in einem Exsikkator für bis zu vier Stunden inkubiert. Am Boden des Exsikkators befand sich in einem Becherglas ein Gemisch aus Natriumhypochlorid (12 % Cl) und Salzsäure im Verhältnis 3:1 (v/v). Das entstandene Chlorgas wurde dann für mehrere Stunden abgepumpt und anschließend wurde der Exsikkator mit geöffnetem Deckel über Nacht in einem Abzug aufbewahrt um eine vollständige Verdampfung des Gases zu gewährleisten. Am folgenden Tag wurden die sterilen Samen dann entweder auf Selektionsmedium oder in Flüssigmedium transferiert.

2.2.5 Erhaltung von *Phytophthora infestans*

Zum Animpfen von Kulturen für Infektionsexperimente und zur Herstellung von Dauerkulturen wurde *P. infestans* auf Hafer-Bohne-Medium (3,4 % [w/v] Bohnenmehl; 1,7 % [w/v] Hafermehl; 8,5 % [w/v] Saccharose; 1,5 % [w/v] Agarose) in Petrischalen bei 18 °C im Dunkeln angezogen. Die Erstellung von Dauerkulturen erfolgte dabei analog der Beschreibung von Eschen-Lippold (2008) und wurde freundlicherweise von Marina Häußler (IPB, Halle) durchgeführt.

2.2.6 Herstellung einer Zoosporensuspension

Die Anzucht von *P. infestans* erfolgte auf Schrägagar in 50 ml-Erlenmeyerkolben unter Verwendung von Hafer-Bohne-Medium in einer Dunkelkammer bei 18 °C über 10-14 d. Anschließend wurden die Kolben mit 4 ml sterilem Wasser überschichtet und für 4 h bei 4 °C stehend gelagert. Zur Gewinnung der Zoosporen erfolgte das Abschwemmen über Gaze (Polyestergewebe 20 µm Porengröße, Durocas [Übach-Palenberg]). Die Sporenanzahl wurde anhand einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und anschließend die gewünschte Sporendichte von 2×10^4 Sporen/ml, 5×10^4 Sporen/ml oder 5×10^5 Sporen/ml eingestellt.

2.2.7 Inokulationsexperimente mit *Phytophthora infestans*

Für die Inokulation von *A. thaliana* mit *P. infestans* wurden 4-5 Wochen alte Pflanzen verwendet und mit Hilfe einer Dispenserpipette wurde die analog 2.2.6 hergestellte Zoosporensuspension als 10 µl-Tropfen auf die Oberseite voll entwickelter Rosettenblätter aufgetragen. Für normale Inokulationsexperimente wurden jeweils 1-2 Tropfen pro Blatt aufgebracht. Anschließend wurden die Pflanzen bei möglichst hoher Luftfeuchtigkeit für 3-4 d unter Langtagbedingungen bei 18 °C inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Auswertung des Experimentes, je nach Fragestellung wurden die Pflanzen fotografiert sowie Blätter für Färbungen oder DNA/RNA-Isolierung geerntet.

In Vorbereitung für die Microarray-Analysen wurden die Pflanzen im Alter von fünf Wochen mit *P. infestans* inokuliert. Dies wurde freundlicherweise von Dr. Lore Westphal (IPB, Halle) übernommen. Dabei waren behandelte und Kontrollpflanzen in einer Kiste randomisiert angeordnet. Für die Inokulation wurde eine Zoosporensuspension mit einer Dichte von 5×10^5 Sporen/ml verwendet. Dabei wurde jeweils das gesamte Blatt mit Tropfen der Suspension benetzt und die Kontrollpflanzen mit sterilem Wasser bis zur Tropfenbildung besprüht. Die Pflanzen wurden mit einem Plastikdeckel abgedeckt und anschließend nach 6 bzw. 12 h geerntet. Dazu wurden die Blätter von sechs Pflanzen pro Genotyp in Aluminiumfolie geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Das Experiment wurde in zwei unabhängigen Versuchen wiederholt, so dass insgesamt pro Genotyp drei biologische Replikate vorlagen.

In ähnlicher Weise erfolgte eine Zeitkinetik mit *pen2-1erp2* um die Ergebnisse der Microarray-Analyse zu bestätigen. Hier wurden jedoch nur drei Pflanzen pro Genotyp (*gl1-1*, *pen2-1*, *pen2-1erp2*) pro Zeitpunkt bzw. Behandlung inokuliert. Bei der Ernte wurden dann je drei Blätter der drei inokulierten Pflanzen vereint.

Analog dazu erfolgte eine Zeitkinetik mit den Mutanten *edr1-1*, *erp6*, *pen2-1edr1-1* und *pen2-1erp6* sowie den Kontrollpflanzen *gl1-1* und *pen2-1*. Hier erfolgte zusätzlich die Ernte unbehandelter Blätter sowie 24 h nach Inokulation.

2.2.8 Trypanblau- und Anilinblaufärbung von Arabidopsisblättern

Für den Nachweis von Zelltod bzw. von Pathogenstrukturen in infiziertem Blattgewebe erfolgte eine nach Keogh *et al.* (1980) modifizierte Färbung mit Trypanblau. Dazu wurden inokulierte Arabidopsis-Blätter für ca. 3 min in siedender Trypanblau-Lösung (1 Vol. Lactophenol-Trypanblau (25 % DL-Milchsäure, 25 % Phenol, 25 % Glycerin, 25 % H₂O, 0,1 % [w/v] Trypan-Blau, 2 Vol. 96 % [v/v] Ethanol) inkubiert, anschließend über 2 - 5 d mittels Chloralhydrat (2,5 g/ml) entfärbt und in 50 % (v/v) Glycerin überführt.

Zum Nachweis von Callose in infizierten Blättern kam eine nach Adam und Somerville (1996) modifizierte Anilinblaufärbung zur Anwendung. Zunächst wurden die infizierten Blätter in reinem Ethanol im siedenden Wasserbad vollständig entfärbt und anschließend für ca. 1 h in frischer Anilinblaulösung (0,01 % [w/v] in 150 mM KH_2PO_4 , pH 9,5) im Dunkeln inkubiert. Zur Lagerung der Blätter oder Aufziehen auf Objektträger wurde die Anilinblaulösung durch 50 % (v/v) Glycerin ersetzt.

Für eine gleichzeitige Färbung von toten Zellen und Calloseablagerungen wurde eine kombinierte Trypanblau- und Anilinblaufärbung nach Ham *et al.* (2007) verwendet.

2.2.9 Sequenzierung des Gesamtgenoms der *erp*-Mutanten

Die eingesetzte genomische DNA wurde mit dem DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN, Hilden) aus Blütenmaterial von *pen2-1erp2* und *pen2-1erp6* isoliert (durchgeführt von Dr. L. Westphal und M. Häußler, beide IPB, Halle). Das Genom von *pen2-1erp6* wurde in Kooperation mit D. Weigel (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) mit Hilfe der Illumina (Solexa)-Technologie sequenziert, wobei die Sequenz-Daten durch K. Schneeberger (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) prozessiert und analysiert wurden. Für die Genom-Sequenzierung von *pen2-1erp2* wurde die isolierte DNA an die Firma GATC Biotech AG (Konstanz) übergeben.

2.2.10 Isolierung von genomischer DNA

Zur Isolierung von genomischer Pflanzen-DNA wurden ca. 100-200 mg gefrorenes Blattmaterial in einem Schraubdeckelgefäß mit Keramikkügelchen (ERMIL, Ø 1,6 mm) im Precellys®24 (peqlab) gemörsert und anschließend entsprechend den Angaben von Weigel und Glazebrook (2002) die „Quickprep“-Methode durchgeführt.

Da für Klonierungszwecke saubere DNA benötigt wird, wurde zusätzlich bei Bedarf DNA mit Hilfe des GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit von Sigma isoliert.

2.2.11 PCR und Kolonie-PCR

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde rekombinante DreamTaq™ DNA-Polymerase von Fermentas entsprechend den Herstellerprotokollen verwendet. Es wurden 20 µl- bzw. 50 µl-Ansätze in einem Standard PCR-Programm (1 min Inkubation bei 94 °C; 35-40 Zyklen mit je 30 s Denaturierung bei 94 °C, 30 s Primeranlagerung bei 55 - 60 °C und 30 s Extension bei 72 °C; 2 min Endamplifikation bei 72 °C) genutzt.

Bei der Kolonie-PCR wurden Einzelkolonien mit sterilen gelben Spitzen gepickt, auf Luria Bertani (LB)-Platten (1 % [w/v] Trypton; 0,5 % [w/v] Hefeextrakt; 1 % [w/v] NaCl; 1,5 % [w/v]

BactoAgar) mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und dann in das PCR-Reaktionsgefäß überführt. Die Kolonie-PCR mit Agrobakterien erfolgte analog, jedoch wurde zunächst ein Zellaufschluss durchgeführt. Dazu wurden die Einzelkolonien in 10 µl 20 mM NaOH überführt, für 8 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurden 2 µl dieses Ansatzes zu einem Standard 20 µl-Ansatz dazu pipettiert. Die Analyse der PCR erfolgte jeweils mit Hilfe eines Agarosegels (Altmann, 2009).

Für den Nachweis einiger Mutationen kamen CAPS-Marker (*cleaved amplified polymorphic sequence*; Konieczny und Ausubel, 1993) zum Einsatz. Die hierfür verwendeten Primer sind im Anhang in Tabelle 6.3 aufgelistet. Für die Analyse der CAPS-Marker wurde zunächst das zu verdauende Fragment in einem 20 µl-PCR Ansatz amplifiziert, anschließend 5 µl zur Kontrolle auf einem Agarosegel aufgetragen und der verbliebene Ansatz mit dem entsprechenden Restriktionsenzym den Herstellerprotokollen folgend verdaut. Für den Nachweis der *edr1-1*-Mutation kam eine besondere Form der PCR, die Tetra-Primer-Arms-PCR (TPAP), zum Einsatz (Ye *et al.*, 2001).

Der Nachweis von T-DNA-Insertionen in KO-Linien von NASC erfolgte entsprechend den Beschreibungen des SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>). Dabei wurden jeweils zwei PCR-Ansätze vorbereitet. Im ersten Ansatz wurden zwei genspezifische Primer verwendet, die nur in Abwesenheit der T-DNA-Insertion ein PCR-Fragment liefern. Der zweite PCR-Ansatz beinhaltete einen genspezifischen Primer (RP-Primer) und einen T-DNA-spezifischen *Border-Primer* (LBb1.3_SALK). In diesem Ansatz kann nur bei Anwesenheit der T-DNA-Insertion ein Fragment in der anschließenden Analyse auf einem Agarosegel detektiert werden. Primer, die für die Selektion von *Knock Out* (KO)-Linien zum Einsatz kamen sowie der *Border-Primer* sind im Anhang in Tabelle 6.4 aufgeführt.

2.2.12 Restriktionsverdau

Jegliche Restriktionen von DNA-Fragmenten oder Plasmid-DNA wurden entsprechend den Herstellerangaben ausgeführt.

2.2.13 Elution von DNA-Fragmenten

Zur Herstellung von Sonden für die Northern Blot-Analyse oder im Falle einer folgenden Klonierung wurden die in der PCR amplifizierten DNA-Fragmente zunächst mittels Agarosegel aufgetrennt, auf einem UV-Tisch aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend anhand des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben isoliert bzw. aufgereinigt.

2.2.14 Klonierung

Alle hier aufgeführten Klonierungen wurden mit Kits von Invitrogen entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurde das gewünschte Genfragment zunächst in die Vektoren pCR2.1 oder pCR8 kloniert und anschließend mit Hilfe des Gateway® LR Clonase® II Enzym-Mixes in einen binären Vektor subkloniert. In Tabelle 2.1 sind diese Vektoren und deren Verwendungszweck aufgelistet. Für die Klonierung der EDR1-Kinasedomäne aus Col-0 und *erp6* wurden die Primer KD_EDR1-1 (gatgttggtgaatgaaattcctt) und KD_EDR1-2 (ctattgttggttaggaagtagacaagccgg) verwendet.

Tabelle 2.1: Eingesetzte binäre Vektoren und deren Verwendung

binärer Vektor	Besonderheit	Verwendung	Referenz
pGWB13	kein Promotor, 3xHA-Tag	stabile Expression in Arabidopsis	Nakagawa <i>et al.</i> (2007)
pDEST15	35S-Promotor, GST-Tag	} Proteineexpression in <i>E. coli</i>	Dyson <i>et al.</i> (2004)
pDEST-N112	35S-Promotor, MBP-His-Tag		

2.2.15 Herstellung und Transformation kompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* DH5 α - sowie BL21-Zellen erfolgte entsprechend der Beschreibung von Eschen-Lippold (2008). Für die Transformation wurden 4 μ l des Ligationsansatzes zu 100 μ l kompetenten Zellen zugegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein 30 s-Hitzeschock bei 42 °C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden den Zellen unter sterilen Bedingungen 600 μ l LB-Medium (1 % [w/v] Trypton; 0,5 % [w/v] Hefeextrakt; 1 % [w/v] NaCl) zugegeben und anschließend bei 37 °C für ca. 1 h bei 150 rpm inkubiert. Um zu gewährleisten, dass auf einer der Platten Einzelkolonien vorliegen, wurden 50 μ l und 500 μ l des Transformationsansatzes auf LB-Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.2.16 Sequenzspezifische Mutagenese

Für die *in vitro* Kinaseassays wurden Kinase-inaktive Varianten (KR) von AtMKK6, AtMKK7 und AtMKK8 durch sequenzspezifische Mutagenese mit Hilfe des QuikChange®Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene hergestellt. Dazu wurde das Lysin (K) der ATP-Bindestelle der MKKs zu einem Arginin (R) mutiert. Die hierfür verwendeten Primer finden sich im Anhang (Tabelle 6.5).

2.2.17 Isolierung von Plasmid-DNA und Herstellung von Glycerolstocks

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde zunächst über Nacht eine Bakterienkultur bei 37 °C mit entsprechendem Selektionsantibiotikum angezogen. Für kleinvolumige Kulturen (2 ml) wurde dann der NucleoSpin® Plasmid Kit von Macherey-Nagel und für große Volumen (50 ml) der Plasmid Midi Kit von QIAGEN verwendet. Von den 50 ml-Kulturen wurde jedoch zunächst ein Glycerolstock zur Dauerlagerung des klonierten Konstruktes angelegt. Dazu wurden 800 µl der Kultur mit 200 µl sterilem 80 %-igem Glycerin (v/v) versetzt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.18 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Die Isolierung von Total-RNA aus Arabidopsis-Pflanzen erfolgte mittels der TRIZOL®-Methode analog den Ausführungen von Landtag (2006).

2.2.19 Microarray-Analysen

Für die Microarray-Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten *gl1-1*-, *pen2-1*- und *pen2-1erp2*-Pflanzen verwendet, die im Alter von fünf Wochen mit $5 \cdot 10^5$ Sporen/ml inokuliert wurden (Dr. Lore Westphal, IPB Halle; s.a. 2.2.7). Drei Tage nach der Inokulation erfolgte die Ernte der infizierten Blätter und anschließend wurde die RNA mit der TRIZOL®-Methode isoliert (2.2.18) sowie mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen) aufgereinigt. Diese Probenaufarbeitung wurde freundlicherweise von Dr. Lore Westphal und Marina Häußler (beide IPB, Halle) vorgenommen. Alle weiteren Vorbereitungen und Hybridisierungsschritte erfolgten in der Firma AROS Applied Biotechnology (Aarhus, Dänemark), wobei der Affymetrix Gene Chip® Arabidopsis ATH1 für die Hybridisierung verwendet wurde. Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Open-Source Software Robin (Lohse *et al.*, 2010). Im Vorfeld der statistischen Auswertung erfolgte eine RMA (*robust multi-array average*)-Normalisierung. Für die Auswahl der differentiell exprimierten Gene wurden ein p-Wert von mindestens 0,05 und eine x-fache Veränderung (*fold change*) von mindestens 2 angesetzt. Zudem erfolgte eine Korrektur des p-Wertes mittels der FDR (*false discovery rate*) nach Benjamini-Hochberg. Um eine Liste von Genen zu erhalten, die spezifisch aufgrund der *erp2*-Mutation konstitutiv bzw. nach Inokulation mit *P. infestans* differentiell exprimiert sind, wurden im Programm Robin die in Abbildung 2.1 und 2.2 gezeigten Vergleiche angestellt.

Um konstitutiv veränderte Gene zu ermitteln, wurden zunächst *pen2-1*-spezifische Gene selektiert, indem die Chips für *gl1-1* von denen von *pen2-1* jeweils für den 6 h- und den 12 h-Wert abgezogen wurden. Die *gl1-1*-Chips wurden gleichermaßen von den *pen2-1erp2*-Chips subtrahiert, wodurch konstitutiv veränderte *pen2-1erp2*-spezifische Gene erhalten wurden.

Um den Effekt der *pen2-1*-Mutation zu eliminieren, wurden dann die Listen der *pen2-1*- sowie der *pen2-1erp2*-spezifischen Gene abgeglichen und doppelte Gene entfernt. Damit verblieben die Gene, die spezifisch durch die Mutation in *ERP2* konstitutiv differentiell exprimiert wurden (Abbildung 2.1).

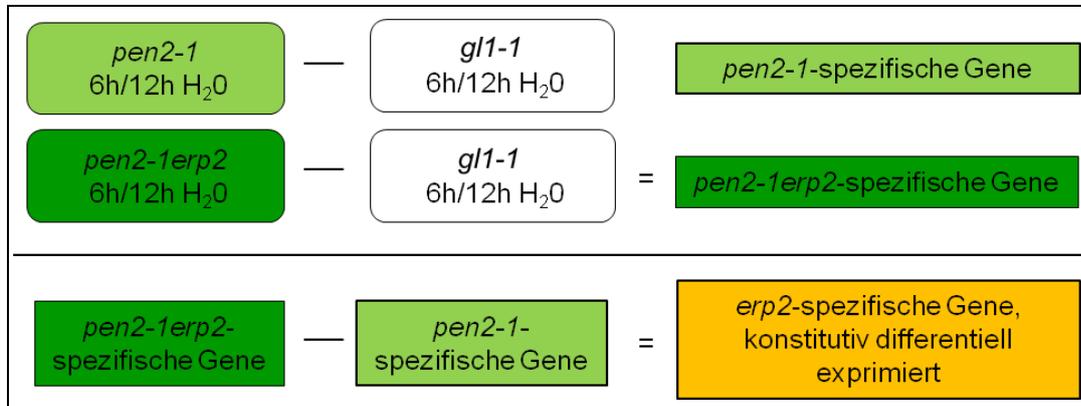


Abbildung 2.1: Ermittlung konstitutiv differentiell exprimierter *erp2*-spezifischer Gene, detaillierte Beschreibung siehe Text

Für die Selektion von Genen, die durch die Behandlung mit *P. infestans* differentiell exprimiert werden, wurden sowohl für *pen2-1* als auch *pen2-1erp2* die Wasserbehandlungen von den entsprechenden Pathogenbehandlungen jeweils für die 6 h- und 12 h-Werte subtrahiert. Anschließend erfolgte erneut ein Abgleich der erhaltenen Genlisten, von denen doppelte Gene eliminiert wurden. Dadurch ergaben sich die Gene, die nach *P. infestans*-Applikation aufgrund der *erp2*-Mutation differentiell exprimiert wurden (Abbildung 2.2).

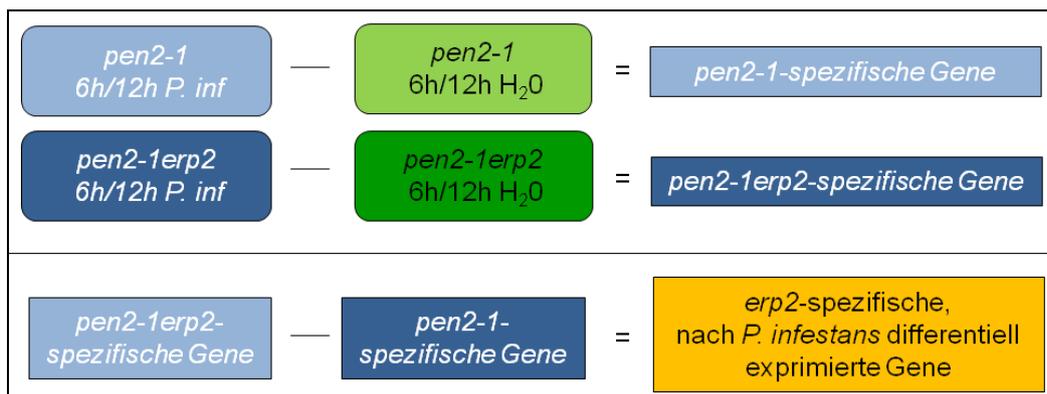


Abbildung 2.2: Ermittlung differentiell exprimierter *erp2*-spezifischer Gene nach *P. infestans*-Inokulation, detaillierte Erläuterung siehe Text

2.2.20 Northern Blot

Die Northern Blot-Analyse wurde analog der Ausführungen von Altmann (2009) durchgeführt. Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Primer sind im Anhang aufgelistet (Tabelle 6.6). Für *PR-1*, *PR-2* und *PDF1.2* waren bereits Plasmide vorhanden (Altmann,

2009) und konnten für die Erstellung der Sonden genutzt werden. Dazu wurden die Klone mit *EcoRI* verdaut und bei der anschließenden Auftrennung mittels Agarosegel wurde jeweils das ca. 500 bp große DNA-Fragment aus dem Gel eluiert (s. 2.2.13) und entsprechend Altmann (2009) vorbereitet.

Für die Quantifizierung der Transkriptmenge wurden die zuvor mit der Sonde des zu untersuchenden Gens hybridisierten Membranen erneut hybridisiert, diesmal mit einer Sonde für eine Untereinheit der pflanzlichen ribosomalen RNA (rRNA). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der Signale mit Hilfe des Programmes ImageJ (s.2.2.32). Das verwendete Fragment der rRNA-Sonde wurde durch Verdau des bereits vorhandenen Plasmids c903-2 (Petters, 2001) mit *BamHI* und anschließender Elution des ca. 1 kb-großen DNA-Fragments aus dem Agarosegel erhalten.

2.2.21 cDNA-Synthese

Für die Herstellung von cDNA für Klonierungszwecke wurde der RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit von Fermentas verwendet und entsprechend den Herstellerangaben ausgeführt.

2.2.22 Rekombinante Proteinexpression in *Escherichia coli*

In Vorbereitung der rekombinanten Proteinexpression in *E. coli* wurde zunächst eine Vorkultur des gewünschten Klons angefertigt. Dazu wurden aus einem Glycerinstock 5 ml LB mit entsprechenden Selektionsantibiotika angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden dann 200 ml frisches LB-Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 - 0,8 bei 37 °C angezogen. Nachdem zunächst 1 ml der Suspension als uninduzierte Kontrolle entnommen wurde, erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 1 mM). Anschließend wurde die Bakteriensuspension für mindestens 16 h bei 18 °C unter Schütteln inkubiert. Nach Entnahme von 1 ml als Induktionskontrolle wurde das Bakterienpellet dann durch Ultrazentrifugation bei ~4000 x g (Sorvall RC-5B, Thermo Scientific) der Suspension gewonnen und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

2.2.23 Proteinaufreinigung

Im Anschluss an die Expression wurden die Proteine aufgereinigt. Die hierfür verwendeten Pufferzusammensetzungen für die Aufreinigung über den His-Tag sowie den GST-Tag sind in Tabelle 2.2 bzw. 2.3 dargestellt. Um einen Zellaufschluss zu gewährleisten wurde zunächst das Bakterienpellet im Zentrifugengefäß mit etwa 12 ml Lysispuffer A (+1 mM

Phenylmethylsulfonylfluorid [PMSF] und 1x Proteaseinhibitormix von Serva) resuspendiert und in ein 15 ml Falcongefäß überführt. Nach Zugabe von 50 mg/ml frischem Lysozym erfolgte die Inkubation auf Eis für 30 min. Anschließend wurde der Zellaufschluss durch Ultraschallzufuhr (10 x 1 s bei 60 % Amplitude; SONOPULS, Bandelin) und Zugabe von 5 µg/ml DNaseI sowie 1 % Triton X 100 unterstützt. Nach weiteren 30 min auf Eis wurde die Suspension für 40 min bei 4 °C und ~21800 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues 15 ml Falcongefäß transferiert. Für die Aufreinigung der EDR1-Kinasedomäne konnte nun der N-terminale Hexa-Histidin-Tag des Vektors pDEST-N112 genutzt werden, wodurch die Proteinaufreinigung mittels Metallionen-Affinitätschromatografie ermöglicht wird. So wurde das im letzten Schritt erhaltene Lysat über eine 1 ml HisTrap™ HP-Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Dazu wurden diese zunächst mittels einer Peristaltik-Pumpe (Pump P-1, GE Healthcare) und dem Lysispuffer A bei einer Flussrate von 1 ml/min equilibriert. Nachfolgend wurde die Säule mit dem im Proteinlysate bei einer Flussrate von 0,3 ml/min beladen. Anschließend wurde die Säule mit 10 ml Waschpuffer A (Tabelle 2.2) gewaschen. Danach erfolgte die fraktionierte Elution (je 1 ml) des Proteins mittels des Elutionspuffers A (Tabelle 2.2) in 1,5 ml Eppendorfgefäße. Nach einem letzten Waschschrift mit 5 ml H₂O wurde die Säule auf 20 % (v/v) EtOH gelagert. Die Säule und Elutionsfraktionen wurden anschließend bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer für die Proteinaufreinigung mittels His-Tag

Lysispuffer A	0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 8 300 mM NaCl 10 mM Imidazol
Waschpuffer A	0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 8 300 mM NaCl 40 mM Imidazol
Elutionspuffer A	0,1 M NaH ₂ PO ₄ pH 8 300 mM NaCl 250 mM Imidazol 1 x Proteaseinhibitormix

Die für die Kinasassays benötigten MKKs sowie MEKK1 aus Arabidopsis wurden in den Vektor pDEST15 kloniert, welcher einen N-terminalen GST-Tag aufweist, der die Aufreinigung der Proteine über Glutathion ermöglicht. Der Zellaufschluss der Bakterienpellets erfolgte dabei analog der EDR1-Kinasedomäne (s. o.) jedoch mit dem Lysispuffer B (Tabelle 2.3). Das erhaltene Lysat wurde dann in einem Batch-Verfahren aufgereinigt, wobei die Bindung des Proteins über den GST-Tag an die Glutathion (GSH)-Sephrose TM4B (GE Healthcare) erfolgte. Dazu wurden 300 µl der nach Herstellerangaben vorbereiteten Sepharose zu dem gesamten Lysat gegeben und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Anschließend wurde die

Suspension für 1 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Das Pellet wurde dreimal mit je 8 ml Waschpuffer B (Tabelle 2.3) gewaschen, wobei im zweiten Waschschrift ein Puffer mit höherer Salzkonzentration verwendet wurde. Nach jedem Waschschrift wurde das Lysat-Sepharose-Gemisch für 5 min bei 500 x g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig verworfen. Die Elution erfolgte dann sequentiell mit den Elutionspuffern E1 bis E4 (Tabelle 2.3), die eine steigende Glutathionkonzentration aufwiesen, um eine vollständige Elution des Proteins von der Sepharose zu gewährleisten. Dabei wurde die Sepharose mit jeweils 300 µl Puffer versetzt, für 15 min bei 4 °C geschwenkt und anschließend für 5 min bei 500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dabei nach jedem Zentrifugationsschritt vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und in ein Eppendorfgefäß transferiert und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 2.3: Verwendete Puffer für die Proteinaufreinigung mittels GST-Tag

Lysispuffer B	1xPBS (Phosphate Buffered Saline): 140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.3
Waschpuffer B	1xPBS + 0,1 % Tween20
Waschpuffer B mit hoher Salzkonzentration	500 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7.3
Elutionspuffer E1	20 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Elutionspuffer E2	50 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Elutionspuffer E3	100 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0
Elutionspuffer E4	200 mM reduziertes Glutathion in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

2.2.24 SDS-PAGE

Zur Analyse des Molekulargewichts sowie zur Bestimmung der Reinheit der exprimierten Proteine wurden während der Aufreinigung Proben entnommen und mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert. Dazu wurden diese Proben 1:1 mit 2 x SDS-Probenpuffer (0,125 M Tris pH 6,8; 4 % (v/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerin, 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen (10-20 µl). Die elektrophoretische Trennung erfolgte je nach Proteingröße mit einem Polyacrylamidgel (Sambrook *et al.*, 1989) in einer SE 250 *mighty small*-Gelkammer (GE Healthcare). Als Größenstandard diente der Precision Plus Protein™ Standards All Blue Marker von Biorad. Zur Visualisierung der Proteine wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt. Dazu wurde das Gel zunächst für 1 h in Coomassie-

Lösung (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,5 % Coomassie Brilliant Blue R250) geschwenkt, anschließend wieder entfärbt (30 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure) und entweder fotografiert oder mit Hilfe einer Trocknerlösung (30 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Glycerin) in einem Geltrocknungsrahmen zwischen zwei Cellophan-Papieren (Carl Roth GmbH) fixiert.

2.2.25 Western Blot

Western Blot-Analysen wurden mit einer semi-dry-Variante analog dem Standard-Protokoll aus Sambrook *et al.* (1989) mit kommerziell erhältlichen Antikörpern den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt.

2.2.26 Pro-Q Diamond-Färbung von Proteingelen

Zur Visualisierung phosphorylierter Proteine kam die Pro-Q® Diamond-Färbelösung (Invitrogen) zum Einsatz. Zunächst erfolgte die Inkubation der putativen Kinase und des zu untersuchenden Substrates mit Adenosintriphosphat (ATP) für mindestens 30 min bei 37 °C. Da für die Kinase bzw. die putativen Substrate im Bradford-Assay keine messbare Proteinkonzentration vorlag, wurde nach Kontrolle über SDS-PAGE jeweils ein festgelegtes Volumen eingesetzt. So wurden für die Experimente, die mit dem artifiziellen Substrat Myelin Basic Protein (MyBP) durchgeführt wurden, 10 µl Kinase (Wildtyp oder mutierte EDR1-Kinasedomäne) in einem Gesamtreaktionsansatz (1 µg/ml Substrat [MyBP], 20 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 µM ATP, 1 x Proteaseinhibitormix von Serva) von 20 µl eingesetzt. Für die Untersuchungen der Arabidopsis MKKs als putative Substrate setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen: 10 µl Substrat (MKK1 bis MKK10) und 5 µl Kinase (Wildtyp EDR1-Kinasedomäne) in einem Gesamtreaktionsansatz (20 mM HEPES, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 20 µM ATP, 1 x Proteaseinhibitormix von Serva) von 20 µl.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 µl 2xSDS-Probenpuffer für 5 min bei 95 °C gestoppt. Nachfolgend wurden die Proben mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend das Gel den Herstellerangaben mit Pro-Q Diamond-Färbelösung entsprechend gefärbt. Mit Hilfe des Typhoon™ 9400 PhosphorImagers (Amersham) wurde das Gel bei 580 nm gescannt und anschließend im Programm ImageJ ausgewertet. Abschließend wurde das SDS-Gel für eine Ladungskontrolle mittels Coomassiefärbung gefärbt (s. 2.2.24).

2.2.27 Radioaktiver *in vitro* Phosphorylierungsassay

Die Reaktionsansätze für den *in vitro* Phosphorylierungsassay wurden analog 2.2.26 durchgeführt, allerdings wurde anstelle von normalem ATP radioaktiv markiertes γ -[^{32}P]-ATP (0,33 pmol) eingesetzt. Im Anschluss an die Probentrennung mittels SDS-PAGE wurde das SDS-Gel zwischen ein Filterpapier (80 g/m², Sartorius) und eine Zellophanfolie gelegt, über Nacht durch Anlegen an Vakuum getrocknet und dann auf einen *Storage Phosphor Screen* (Molecular Dynamics) gelegt. Nach 1 - 2 d erfolgte das Auslesen der Signale durch Scannen am Typhoon™ 9400 PhosphorImager.

2.2.28 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen

Die nachfolgend beschriebenen Arbeiten zur Vorbereitung und Durchführung der Massenspektrometrie-Analysen wurden freundlicherweise von Petra Majovsky und Dr. Kai Naumann (IPB Halle) durchgeführt.

In Vorbereitung der massenspektrometrischen Analyse zur Detektierung von Phosphorylierungsstellen der EDR1-Kinasedomäne erfolgte ein tryptischer in-Gel-Verdau des Proteins. Dazu wurde zunächst die entsprechende Bande aus dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel ausgeschnitten, zweimal mit Wasser gewaschen und für 15 min in 30 % Acetonitril (ACN) in 100 mM Ammoniumbicarbonat (NH₄HCO₃) entfärbt. Dieser Schritt wurde bis zur vollständigen Entfärbung wiederholt und abschließend wurden die Gelstücke zweimal in destilliertem Wasser gewaschen. Die Proteine wurden durch Inkubation in 10 mM Dithiothreitol (DTT) in 100 mM NH₄HCO₃ für 5 min bei Raumtemperatur (RT) und dann für 30 min bei 50 °C reduziert und anschließend für 15 min in ACN inkubiert. Daraufhin erfolgte die Alkylierung der Proteine durch Inkubation in frisch hergestelltem 54 mM Iodacetamid (IAA) in 100 mM NH₄HCO₃ bei RT für 15 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Gelbanden zweimal mit 100 mM (NH₄HCO₃)/30 % (ACN) gewaschen.

Nach Trocknung der Gelbanden mit Hilfe einer Vakuumzentrifuge folgte der Verdau des Proteins über Nacht in ausreichend Trypsin-Lösung (3 ng/μl in 10 mM NH₄HCO₃/5 % ACN; modifiziertes Trypsin von Promega), so dass die Gelstücke komplett mit Lösung bedeckt waren. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und mit einer Extraktionslösung (35 % ACN und 0,4 % Trifluoressigsäure [TFA] in Wasser) wenige Minuten inkubiert. Die Überstände wurden dann vereint und mittels einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die erhaltenen Peptide wurden nachfolgend in 20 μl einer 0,1 %-igen TFA-Lösung aufgenommen, für 5 min im Ultraschallbad behandelt und bis zur Massenanalyse bei -20 °C gelagert.

Zur Bestimmung von Phosphorylierungsstellen in der EDR1-Kinasedomäne wurde der zuvor angefertigte Verdau in einer Kombination aus Flüssigkeitschromatografie (Liquid

Chromatography, LC) und Massenspektrometrie (MS) analysiert. Das hierfür verwendete Gerät bestand aus einer splitfreien Nano-LC (Easy-nLC II, Proxeon, Thermo Scientific, Deutschland), die an ein Hybrid-FT (Fourier Transformation)-Massenspektrometer (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific) gekoppelt war. Die Trennung der Peptide erfolgte über eine C18-Säule (Easy column, 10 cm, ID 75 μ m, 3 μ m C18, Thermo Scientific) bei einer Flussrate von 300 nl/min mit einem linearem Gradienten von 2 - 40 % B (A: 0,1 % Ameisensäure in H₂O, B: 0,1 % Ameisensäure in ACN) über 30 min. Bei einer Spannung von +1,9 kV (Nanospray Flex Ion Source mit Emitter ES542; Thermo Scientific, Deutschland) und einer Kapillartemperatur von 275 °C erfolgte die Ionisierung der Peptide. Für die Daten-abhängige Erfassung (*Data Dependent Acquisition*, DDA) wurden zunächst einfach geladene Ionen ausgeschlossen und die Vorläufermassen im Bereich von 400 - 1850 m/z im Orbitrap-Analysegerät bei einer Auflösung von 30.000 ausgelesen. Bis zu 20 Vorläuferionen pro MS-Scan wurden dann für eine CID (*Collision Induced Dissociation*)-Fragmentierung in der linearen Ionenfalle (Massenbereich: 50-200 m/z , Scangeschwindigkeit: normal) selektiert.

Zusätzliche LC-MS-Messungen wurden durchgeführt, um die detektierten Phosphopeptide zu verifizieren. Basierend auf den zuvor durchgeführten DDA-Experimenten wurde eine Einschlussliste erstellt, die nun Grundlage für eine gezielte Massenanalyse darstellte. Hierbei wurde die Peptidfragmentierungen entweder mittels MS/MS oder „multi-stage“-Aktivierung (multi-stage activation, MSA) erreicht. Die Rohdaten wurden dann mit der Proteome Discoverer-Software (V1.3, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) prozessiert und mittels eines Mascot Servers (V2.3.02, Matrix Science, UK) unter Verwendung einer *Arabidopsis thaliana*-Proteindatenbank basierend auf TAIR 10 identifiziert. Die hier angesetzten Parameter waren 10 ppm für die MS- sowie 0,8 Da für die MS/MS-Toleranz. Als dynamische Modifizierungen wurden oxidiertes Methionin sowie die Phosphorylierung von Serin/Threonin gewählt, wohingegen die Carbamidomethylierung des Cysteins als statische Modifizierung gesetzt wurde. Für eine weiterführende Datenauswertung wurden die Programme Scaffold Q+ und Scaffold PTM (V35.1 bzw. V2.0, Proteome Software Inc., USA) genutzt.

2.2.29 Wachstumsassays nach PAMP-Behandlung

Die Peptide flg22 und elf18 wurden in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie des IPB mittels Festphasensynthese mit einem Economy Peptide Synthesizer EPS221 der Firma Abimed synthetisiert (Sylvia Krüger, IPB Halle).

Für die Wachstumsinhibitionsassays wurden oberflächensterilisierte Samen zunächst auf ATS-Platten (ATS-Medium (Estelle und Somerville, 1987) mit 1 % (w/v) Saccharose und 0,5 % (w/v) Plant Agar) ausgelegt, für 2 d bei 4 °C stratifiziert und anschließend für 5 d vertikal angezogen. Für den Wurzelinhibitionsassay mit flg22 wurden die Keimlinge auf ATS-

Platten ohne oder mit 1 μM bzw. 10 μM flg22 überführt und nach weiteren 9 d der Inkubation im Lichtraum unter Langtagbedingungen die Wurzellänge bestimmt. Dabei beinhaltete ein Experiment je 3 Platten pro Behandlung (0 μM /1 μM /10 μM flg22) mit je zwei Genotypen (Wildtyp und Mutante) und 12 Keimlingen pro Genotyp, so dass sich pro Experiment ein Stichprobenumfang von 36 ergab.

Die Behandlung mit dem PAMP elf18 erfolgte in 48-Well-Platten, wobei pro Kavität ein 5 d alter Keimling in 1 ml mit oder ohne 100 nmol elf18 in $\frac{1}{2}$ MS-Medium (0,245 % (w/v) MS-Salze (Murashige und Skoog, 1962) einschließlich MES, 0,25 % (w/v) Saccharose) überführt wurde. Um Randeefekte zu vermeiden, blieb die gesamte äußere Reihe der Well-Platte frei. Pro Behandlung wurden je drei Platten bestückt und für weitere 13 d im Lichtraum unter Langtagbedingungen inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Bestimmung des Frischgewichtes der Einzelkeimlinge mit Hilfe einer Analysenwaage (LE225D-0CE, Sartorius).

2.2.30 Wachstumsassay mit Bakterien

Wachstumsassays, die mit der *pen2-1erp2*-Mutante durchgeführt wurden, erfolgten mittels Infiltration der Bakterien. Dazu wurden die entsprechenden Stämme zunächst aus dem Glycerol-Stock auf LB-Medium ausgestrichen und für 2 d bei 28 °C inkubiert. Einzelkolonien wurden dann in 50 ml LB + Selektionsantibiotikum (Tabelle 2.4) und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cycloheximid bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 1,0 angezogen. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 2500 x g für 10 min in einem Swing-Out-Rotor. Das Bakterienpellet wurde zweimal in 10 mM MgCl_2 gewaschen und dann wurde die optische Dichte entsprechend der Bakterienstämme in 10 mM MgCl_2 eingestellt (Tabelle 2.4). Mit dieser Suspension wurden 3 - 4 Blätter von 5 - 6 Wochen alten Arabidopsis-Pflanzen mit Hilfe einer 1 ml-Spritze (ohne Nadel) auf der Blattunterseite infiltriert. Die Ernte erfolgte 0, 2, 4 und 6 d nach Infiltration, wobei der 0 dpi (*days post inoculation*)-Wert direkt im Anschluss an die Infiltration geerntet wurde. Dazu wurde je eine Blattscheibe (\varnothing 9 mm) von drei Pflanzen ausgestanzt und in einem 2 ml Schraub-deckelgefäß (Eppendorf) mit 200 μl 10 mM MgCl_2 und Keramikkügelchen mit Hilfe eines Precellys[®]24 (peqlab) gemörsert. Das Volumen wurde auf 1 ml aufgefüllt und anschließend eine Verdünnungsreihe erstellt und jeweils 5 μl auf LB-Medium mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Nach 2 d bei 28 °C erfolgte die Auszählung der gewachsenen Kolonien.

Tabelle 2.4: Übersicht über Bakterienstämme und benötigte Antibiotika

Bakterienstamm	Antibiotikum	OD_{600}
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin	0,002 ($\sim 1 \cdot 10^6$ cfu/ml)
<i>P. syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 avrRpm1	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin, 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tetrazyklin	0,002 ($\sim 1 \cdot 10^6$ cfu/ml)
<i>P. syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin	0,25 ($\sim 1 \cdot 10^8$ cfu/ml)

Für die Bakterienexperimente mit der *erp6*-Mutante (und deren Allele) erfolgte eine Sprüh-Inokulation von Arabidopsis-Pflanzen mit einer *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-Suspension ($5 \cdot 10^8$ cfu/ml) entsprechend Zipfel *et al.* (2004), jedoch wurden für die vorliegende Arbeit drei Replikate geerntet. Von den 0 dpi-Proben wurden 100 μ l auf LB-Platten (+75 μ g/ml Rifampicin und 50 μ g/ml Cycloheximid) ausplattiert und nach 2 d der Inkubation bei 28 °C ausgezählt. Für die 4 dpi-Proben wurde wie bei Zipfel *et al.* beschrieben eine Verdünnungsreihe in einer 96-Well-Platte erstellt und anschließend 5 μ l-Tropfen mit Hilfe einer Mehrkanalpipette auf LB-Platten (+75 μ g/ml Rifampicin und 50 μ g/ml Cycloheximid) überführt. Die Auswertung erfolgte erneut nach 2 d bei 28 °C.

2.2.31 Mikroskopische Auswertungen

Für alle mikroskopischen Untersuchungen wurde das Stereomikroskop Multizoom AZ 100 von Nikon verwendet. Die Analyse der Anilinblau-gefärbten Blätter erfolgte unter UV-Licht, welches mit einem DAPI-Breitbandfilter eingestellt wurde.

2.2.32 Quantifizierung der Zelltodreaktion und Transkriptmenge

Für die quantitative Auswertung der Zelltodreaktion von Arabidopsis-Pflanzen nach *P. infestans*-Inokulation wurden Trypanblau-gefärbte Blätter in quadratischen Petrischalen (12 cm x 12 cm) ausgelegt, fotografiert und anschließend mit Hilfe dem *Open Source* Programm ImageJ (Abramoff *et al.*, 2004) ausgewertet. Dazu wurde ein Bild zunächst invertiert und anschließend die Intensität der Inokulationsstellen mittels einer stets gleichgroßen Fläche bestimmt. Dabei wurden jeweils der Hintergrund und der Bereich des aufgesetzten Tropfens gemessen, die Differenz aus beiden gebildet und dann statistisch ausgewertet.

Für die Auswertung der Signalintensitäten nach der Northern Blot-Hybridisierung wurden zunächst die Werte für die einzelnen Sonden (zu untersuchendes Gen; rRNA) bestimmt und dabei wieder der Hintergrund vom eigentlichen Signal subtrahiert. Anschließend wurde der Quotient der Signale gebildet (Signal [zu untersuchendes Gen]/Signal [rRNA]) und mit Hilfe von GraphPad Prism grafisch dargestellt bzw. statistisch ausgewertet.

2.2.33 Statistische Auswertungen

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism Version 5.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) vorgenommen.

3. Ergebnisse

Basierend auf der Arabidopsis-Mutante *pen2-1* wurden 14 Mutanten selektiert, die eine verstärkte HR nach *P. infestans*-Inokulation aufwiesen und als *enhanced response to Phytophthora infestans (erp)*-Mutanten bezeichnet wurden (Landtag 2006). Im Fokus dieser Arbeit stand die Charakterisierung der beiden *erp*-Mutanten *pen2-1erp2* und *pen2-1erp6*.

3.1 Charakterisierung von *pen2-1erp2*

3.1.1 Morphologie

Die *pen2-1erp2*-Mutante weist im Vergleich zur Kontrolle *pen2-1* ein verringertes Rosettenwachstum der adulten Pflanzen auf (Abbildung 3.1a). Im Gegensatz zu *gl1-1*- und *pen2-1*-Pflanzen können vor allem auf den unteren Blättern älterer *pen2-1erp2*-Pflanzen Chlorosen und punktförmige Nekrosen beobachtet werden (Abbildung 3.1b), wobei letztere nach einer Färbung mit Trypanblau deutlicher zu erkennen sind (Abbildung 3.1c).

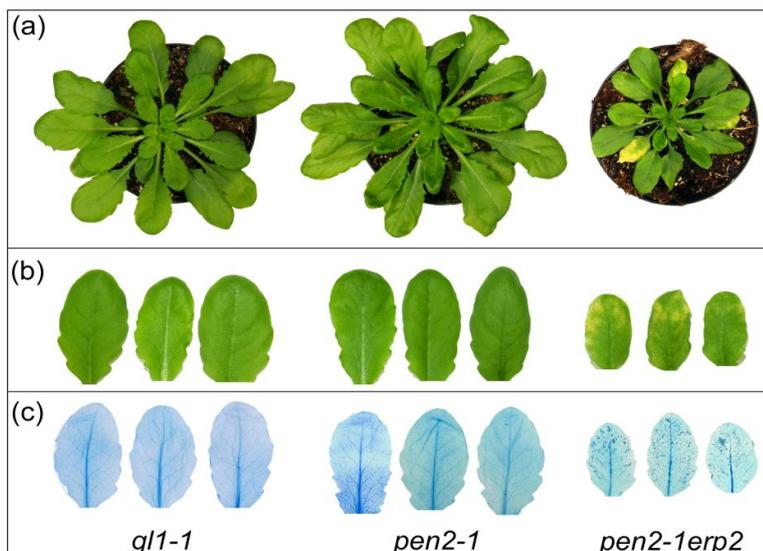


Abbildung 3.1: Morphologie der *pen2-1erp2*-Mutante. (a) Dargestellt sind unbehandelte, sechs Wochen alte Pflanzen, von denen einzelne Blätter (b) einer Trypanblaufärbung unterzogen wurden (c). Gezeigt sind repräsentative Pflanzen (a) bzw. Blätter (b, c) aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von 4 Pflanzen pro Genotyp. Zwei zusätzliche Experimente zeigten vergleichbare Ergebnisse.

3.1.2 Phänotyp nach *P. infestans* – Inokulation

Drei Tage nach Inokulation mit einer relativ hoch konzentrierten Suspension von *P. infestans*-Zoosporen ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) war bei *pen2-1* das Auftreten einer HR auf den inokulierten Blättern zu verzeichnen, während bei *gl1-1*-Pflanzen keine makroskopisch sichtbare Reaktion zu erkennen war. Die Doppelmutante *pen2-1erp2* zeigte eine im Vergleich zu *pen2-1* stärkere Ausprägung der HR, wobei die intensive Färbung der Inokulationsstellen durch Trypanblau auf ein verstärktes Auftreten toter Zellen hinweist. In Abbildung 3.2 sind repräsen-

tative Blätter aller drei Genotypen und jeweils eine Inokulationsstelle nach Trypanblaufärbung dargestellt.

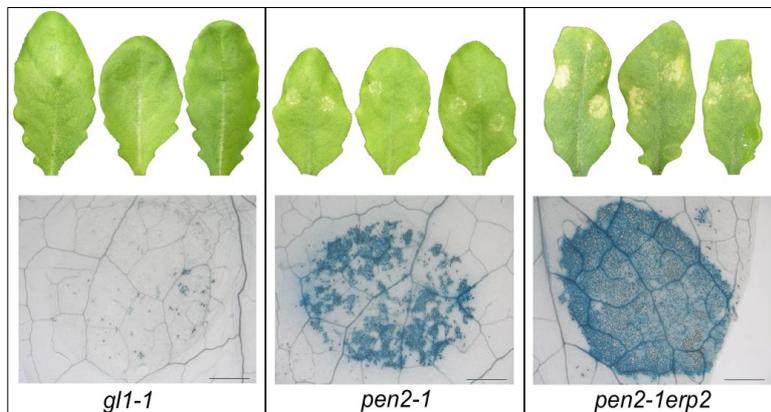


Abbildung 3.2: Phänotyp der *pen2-1erp2*-Mutante nach *P. infestans*-Inokulation.

Fünf Wochen alte *gl1-*, *pen2-1-* und *pen2-1erp2*-Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert und nach drei Tagen fotografiert (oben). Gezeigt sind je drei repräsentative Blätter aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von 3 Pflanzen pro Genotyp. Nach anschließender Trypanblaufärbung wurden die inokulierten Blätter lichtmikroskopisch untersucht (unten, Balken = 200 µm). Das Experiment wurde zweimal wiederholt, mit jeweils ähnlichen Ergebnissen.

Zur Quantifizierung der HR wurde in fünf unabhängigen Experimenten die Intensität der Blaufärbung einer größeren Anzahl von Inokulationsstellen bestimmt (Abbildung 3.3a). Die Inokulation erfolgte mit einer geringeren Sporenkonzentration von $2 \cdot 10^4$ Sporen/ml um einen Sättigungseffekt bei der Trypanblaufärbung zu vermeiden. Die statistische Auswertung der aus allen Experimenten zusammengefassten Daten ergab eine signifikant stärkere Ausprägung der Trypanblaufärbung und somit der Zelltodreaktion in *pen2-1erp2* im Vergleich zu *pen2-1*. Wurden die Datensätze einzeln ausgewertet, konnte lediglich für drei der fünf Experimente der HR-Unterschied statistisch abgesichert werden. Dies spiegelt die hohe biologische Variabilität wider, die häufig in *P. infestans*-Experimenten beobachtet wird, weshalb für zukünftige quantitative Analysen größere Stichprobenumfänge zu empfehlen sind.

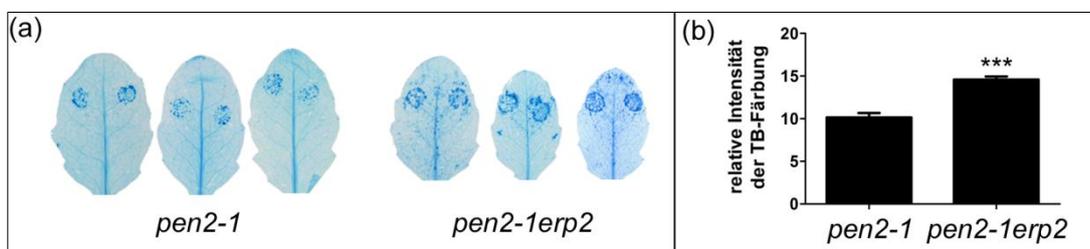


Abbildung 3.3: Quantifizierung der Reaktion von *pen2-1erp2* nach *P. infestans*-Inokulation.

(a) Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und drei Tage später mit Trypanblau gefärbt. Dargestellt sind je drei repräsentative Blätter aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. (b) Relative Intensität der Trypanblaufärbung von Inokulationsstellen, wie in (a) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler für die zusammengefassten Daten aus fünf Experimenten ($n = 204$ [*pen2-1*]; $n = 313$ [*pen2-1erp2*]). ***zeigt einen signifikanten Unterschied von *pen2-1erp2* zur Kontrolle *pen2-1* an (t-Test nach Mann-Whitney, $p < 0,001$).

Um die zelluläre Reaktion von *pen2-1erp2* auf *P. infestans* näher zu untersuchen, wurden mit $2 \cdot 10^4$ Sporen/ml inokulierte Blätter, die einer kombinierten Trypanblau- und Anilinblaufärbung unterzogen wurden, lichtmikroskopisch untersucht. Höhere Sporenkonzentrationen würden die Analyse durch das Auftreten einer Vielzahl toter Zellen erschweren. Wie aus Abbildung 3.4 ersichtlich wird, traten in *gl1-1*-Inokulationsstellen an den Orten versuchter Penetration relativ häufig Callose-enthaltende Papillen auf, während nur vereinzelt tote Epidermiszellen beobachtet wurden. Bei der *pen2-1*-Mutante konnte im Vergleich zu *gl1-1* eine Zunahme toter Epidermiszellen beobachtet werden, da es aufgrund der beeinträchtigten prä-invasiven Abwehr zu einer erhöhten Penetration durch *P. infestans* kommt. Zusätzlich wurden hier auch vereinzelt tote Mesophyllzellen beobachtet.

Nach der Anilinblaufärbung wird ersichtlich, dass die abgestorbenen Epidermiszellen in *pen2-1* und *pen2-1erp2* Calloseablagerungen entlang der Zellwand enthalten. Zusätzlich zum Absterben von Epidermiszellen zeigte *pen2-1erp2* eine verstärkte Zelltodreaktion im Mesophyll. Die Anzahl toter Epidermiszellen konnte jedoch aufgrund der starken Mesophyllreaktion nicht ermittelt werden. Weiterhin wurden in *pen2-1erp2* durch die Anilinblau-Färbung Calloseablagerungen nicht nur entlang der Zellwände toter Epidermiszellen und im Mesophyll beobachtet, sondern auch in Blattbereichen außerhalb der Inokulationsstelle. Diese sowohl in der Epidermis als auch im Mesophyll vorkommenden punktierten Calloseablagerungen stehen jedoch nicht in Verbindung mit *P. infestans*, sondern spiegeln die bereits in unbehandelten Blättern beobachteten punktförmigen Nekrosen wider.

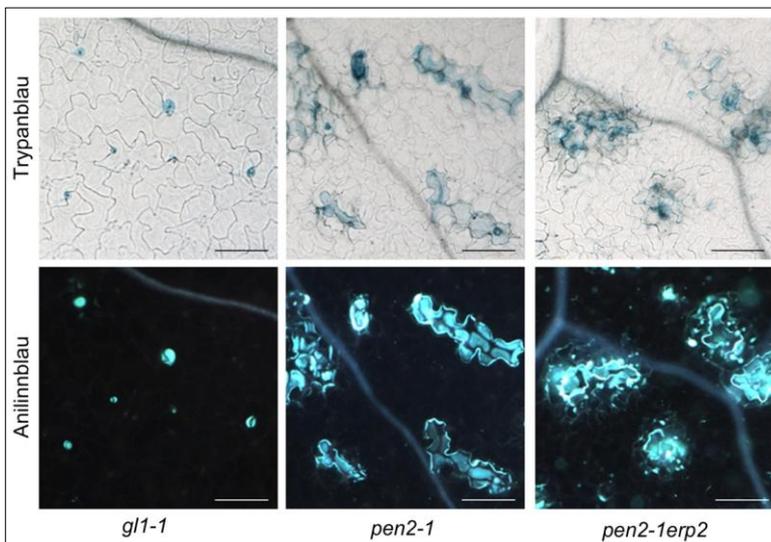


Abbildung 3.4: Lichtmikroskopische Analysen von *pen2-1erp2* nach Trypanblau- und Anilinblaufärbung. Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und drei Tage später einer kombinierten Färbung mit Trypanblau (oben) und Anilinblau (unten) unterzogen. Die Bilder wurden mit einem Stereomikroskop (AZ100, Nikon) aufgenommen (Balken = 100 μ m). Die an den Inokulationsstellen gebildete Callose wurde nach Anilinblaufärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.3 Ansätze zur Identifizierung von *ERP2*

Durch die Analyse genetischer Marker in einer F2-Population aus der Kreuzung von *pen2-1erp2* mit dem Arabidopsis-Ökotyp Landsberg *erecta* konnte die *erp2*-Mutation auf den

unteren Arm von Chromosom 5 in einem Bereich zwischen den Markern SO191 (15,02 Mb) und CIW19 (17,06 Mb) kartiert werden. Weitere Markeranalysen engten die Region auf 43 Kandidatengene zwischen den Markern BKN000011224 (16,44 Mb) und PERL288 (16,59 Mb) ein (Anja Kurth 2007, Nadine Roth, Michaela Kopischke, Dr. Lore Westphal).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ergab die Sequenzierung der kodierenden Bereiche von 42 dieser Gene jeweils eine Punktmutation in *At5g41100* und *At5g41380*. Ein Gen wurde aufgrund seiner Annotation als t-RNA von der Sequenzierung ausgeschlossen. Für 26 der Gene, inklusive der beiden Gene mit einer Nukleotidsubstitution, waren T-DNA-Insertionslinien erhältlich, die parallel zur Sequenzierung mit *P. infestans* getestet wurden. Dabei zeigte keine der untersuchten Linien die Entwicklung einer HR. In zusätzlichen Untersuchungen wurden die Mutationen in *At5g41100* und *At5g41380* auch in anderen *pen2-1erp*-Mutanten nachgewiesen, was den Schluss nahelegt, dass sie bereits als Sekundärmutationen in dem zur Mutagenese verwendeten *pen2-1*-Material enthalten waren. Dadurch konnte keines der beiden Gene als Kandidatengen bestätigt werden.

Nach Sequenzierung des Gesamtgenoms von *pen2-1erp2* wurde in keiner der kodierenden Sequenzen des Grobkartierungsbereiches eine Mutation festgestellt. Dies könnte verschiedene Ursachen haben. Zum einen wurde für die Sequenzierung Pflanzenmaterial aus einer Rückkreuzung von *pen2-1erp2* mit *pen2-1* verwendet. Obwohl nur Pflanzen mit einem eindeutigen HR-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation während der Rückkreuzung selektiert wurden, kann aufgrund der biologischen Variabilität in Inokulationsexperimenten eine Fehleinschätzung der HR und damit ein Verlust der Mutation nicht ausgeschlossen werden. Sollte das der Fall sein, müsste das Genom der nicht-rückgekreuzten Mutante sequenziert werden. Weiterhin kann es während der Kartierung zu fehlerhaften Bonituren gekommen sein, was eine falsche Lokalisation zur Folge gehabt hätte. Allerdings konnte nach Auswertung der Sequenzierungsergebnisse im gesamten Genom nur auf Chromosom 1 eine Nukleotidsubstitution in den kodierenden Bereichen identifiziert werden. Die Analyse der nicht kodierenden Regionen und die Identifizierung *pen2-1erp2*-spezifischer Deletionen bzw. Insertionen ist jedoch noch nicht abgeschlossen. Obwohl im Verlauf der Arbeit kein Kandidatengen für *ERP2* identifiziert werden konnte, wurde mit der *pen2-1erp2*-Mutante eine Reihe von Experimenten für eine detailliertere Charakterisierung durchgeführt.

3.1.4 Interaktion von *pen2-1erp2* mit verschiedenen *P. syringae*-Stämmen

Die *pen2-1erp2*-Mutante war aufgrund ihrer verstärkten Reaktion gegen das nicht-adaptierte Pathogen *P. infestans* isoliert worden. Im Hinblick auf biotrophe bakterielle Pathogene sollte der Einfluss der *erp2*-Mutation auf das Wachstum von *Pseudomonas syringae* untersucht werden. Zu diesem Zweck erfolgten Infiltrationsexperimente mit dem nicht-adaptierten Erreger der Fettfleckenkrankheit an der Bohne, *P. s. pv. phaseolicola* (*Psph*) und

dem adaptierten Pathogen *P. s. pv. tomato (Pto)*, dem Verursacher der Tüpfelschwärze an Tomate. Von *Pto* wurden sowohl ein virulentes (DC3000) als auch ein avirulentes Isolat (DC3000 *avrRPM1*) getestet.

Der virulente Stamm *Pto* DC3000 ist in der Lage, *A. thaliana* zu befallen, was sich in einem starken Anstieg des Bakterienwachstums sowie dem Auftreten chlorotischer und nekrotischer Läsionen äußert. Innerhalb der hier getesteten Zeiträume konnten für *gl1-1*, *pen2-1* und *pen2-1erp2* keine Unterschiede im Wachstum von *Pto* DC3000 beobachtet werden (Abbildung 3.5a). Analog dazu war auch bei der Ausprägung der Krankheitssymptome kein Unterschied zwischen den verschiedenen Mutanten feststellbar (Daten nicht gezeigt).

Der avirulente Stamm *Pto* DC3000 *avrRPM1* kann von *A. thaliana* Col-0 erkannt werden, wodurch es zur Ausprägung einer Resistenz kommt. Dies spiegelt sich in einem deutlich geringeren Wachstum des Bakteriums im Vergleich zu einem virulenten Stamm wider. Zwei Tage nach der Infiltration von *Pto* DC3000 *avrRPM1* wurde in *pen2-1erp2* im Vergleich zu *pen2-1* ein signifikant erhöhtes Bakterienwachstum verzeichnet, das jedoch an Tag 4 und 6 nach Infiltration nicht vorlag (Abbildung 3.5b). Bei Betrachtung der Einzelerperimente fiel auf, dass diese stark variabel waren, weshalb für eine Überprüfung des signifikant höheren Bakterienwachstums an Tag 2 zusätzliche Experimente erforderlich sind.

Die mit *Psph* durchgeführten Experimente konnten für *pen2-1erp2* keine Veränderung des Bakterienwachstums im Vergleich zu *pen2-1* nachweisen, jedoch zeigte *pen2-1* vier Tage nach Infiltration ein signifikant niedrigeres Wachstum im Vergleich zur Kontrolle *gl1-1* (Abbildung 3.5c). Wie schon bei dem avirulenten Stamm *Pto* DC3000 *avrRPM1* variierten die Einzelerperimente stark, weshalb weitere Experimente zur Überprüfung des Ergebnisses durchzuführen sind.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sehr wahrscheinlich weder die Mutation in *PEN2* noch in *ERP2* und auch nicht die Kombination beider Mutationen eine Veränderung des Wachstums der hier getesteten *Pseudomonas*-Stämme verursacht. Somit scheinen diese Gene für die Interaktion von *A. thaliana* mit *Pseudomonas syringae* nicht von Bedeutung zu sein. Ob jedoch eine spezifische Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen den Oomycet *P. infestans* vorliegt, muss durch Untersuchung weiterer Pathogene analysiert werden. Dabei sollten sowohl biotrophe, hemibiotrophe als auch nekrotrophe Pilze und Oomyceten sowie nekrotrophe Bakterien berücksichtigt werden. Für eine effiziente Durchführung dieser Experimente erscheint es sinnvoll, zunächst die Identifizierung von *ERP2* abzuwarten, um eine bestätigte *erp2*-Mutante, zurückgekreuztes *pen2-1erp2*-Material und T-DNA-Insertionslinien mit einbeziehen zu können.

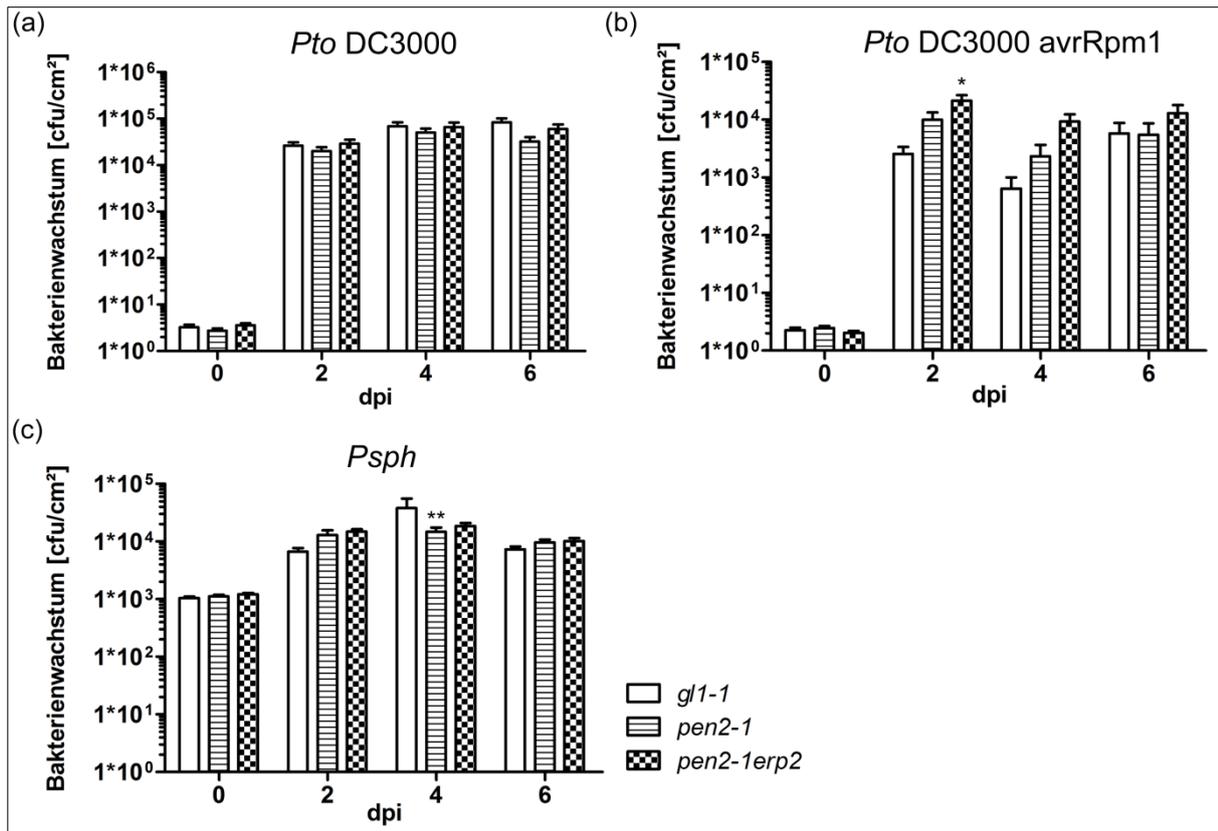


Abbildung 3.5: Wachstum verschiedener *Pseudomonas*-Stämme auf *pen2-1erp2*. Fünf bis sechs Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension von a) *Pto* DC3000 (1×10^6 cfu/ml), b) *Pto* DC3000 *avrRpm1* (1×10^6 cfu/ml) oder c) *Psph* (1×10^8 cfu/ml) infiltriert. Die Ernte und Aufarbeitung infiltrierter Blätter erfolgte nach 0, 2, 4 und 6 Tagen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei (*Psph* [n = 17]) oder vier (*Pto* DC3000 [n = 23]; *Pto* DC3000 *avrRpm1* [n = 24]) zusammengefassten Experimenten. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* bzw. *gl1-1* an (2-Wegs-ANOVA, *: p < 0,05, **: p < 0,01). cfu = koloniebildende Einheiten

3.1.5 Computer-gestützte Auswertung der Microarray-Experimente

Microarray-Analysen sollten Aufschluss darüber geben, welchen Einfluss die Mutation in *ERP2* auf die Aktivierung bzw. Reprimierung von Genen hat. Dazu wurden die Pflanzen mit *P. infestans* inokuliert oder mit Wasser besprüht und nach 6, 12 und 24 h geerntet und für die in Kapitel 2.2.19 beschriebene Microarray-Analyse vorbereitet. Im Fokus der anschließenden Auswertung der Daten unter Verwendung des Computerprogramms Robin (Lohse *et al.*, 2010) stand dabei die Identifizierung konstitutiv bzw. nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierter Gene. Als spezifisch für die *pen2-1erp2*-Mutante wurden die Gene betrachtet, deren Expression in *pen2-1erp2*, aber nicht in *pen2-1* und/oder *gl1-1* verändert war (siehe auch Abschnitt 2.2.19). Es kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die differentielle Expression dieser Gene auf der *erp2*-Mutation oder auf einer Sekundärmutation beruht. Da *ERP2* bis zum jetzigen Zeitpunkt noch unbekannt ist, konnte die Auswertung der Microarray-Daten nur sehr allgemein und nicht im Hinblick auf bestimmte Stoffwechselwege erfolgen.

3.1.5.1 Konstitutiv veränderte Gene

Gene, die durch Behandlung mit Wasser zu beiden analysierten Zeitpunkten aktiviert wurden, werden im Folgenden als konstitutiv differentiell exprimierte Gene bezeichnet. Gene, die nur zum 6h- oder 12h-Zeitpunkt nach Wasserapplikation differentiell exprimiert wurden, sind möglicherweise an der Regulation des Tag-/Nacht-Wechsels beteiligt. Entsprechend dieser Kriterien waren 3 Gene in der *pen2-1*-Mutante, 570 Gene in *pen2-1erp2* und 5 Gene sowohl in *pen2-1* als auch in *pen2-1erp2* konstitutiv differentiell exprimiert (Abbildung 3.6).

nur in <i>pen2-1</i>			in <i>pen2-1</i> und <i>pen2-1erp2</i>			nur in <i>pen2-1erp2</i>		
4 Gene			11 Gene			1487 Gene		
6h	6h+12h	12h	6h	6h+12h	12h	6h	6h+12h	12h
1	3	-	3	5	3	467	570	450

Abbildung 3.6: Nach Wasserbehandlung differentiell exprimierte Gene in *pen2-1* und *pen2-1erp2*. Für die Microarray-Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten fünf Wochen alte Pflanzen bis zur Tropfenbildung mit Wasser besprüht und nach 6 bzw. 12 h geerntet. Die differentiell exprimierten Gene sind als Gesamtzahlen und nach Zeitpunkten getrennt dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Robin (Lohse *et al.* 2010); $p < 0,05$, *fold change* ≥ 2

Der deutliche Unterschied in der Anzahl veränderter Gene in *pen2-1* und *pen2-1erp2* könnte möglicherweise daran liegen, dass das verwendete *pen2-1erp2*-Material zum Zeitpunkt der Microarray-Experimente noch nicht mit *pen2-1* zurückgekreuzt worden war. Dadurch können neben der eigentlichen *erp2*-Mutation zahlreiche Sekundärmutationen enthalten sein, die zu dieser hohen Anzahl konstitutiv differentiell exprimierter Gene beitragen. Die Auswertung der Daten ergab, dass die Gene *PR1*, *PR2*, *PR5*, *PAD3*, *EDS16* und *EDS5* zu den 10 Genen mit der höchsten konstitutiven Expression gehörten (Tabelle 3.1). Von diesen Genen ist bekannt, dass sie an der Biosynthese von Salizylsäure (SA) beteiligt sind bzw. in Abhängigkeit von SA wirken (Nawrath und Metraux, 1999; Wildermuth *et al.*, 2002; van Loon *et al.*, 2006; Lu, 2009). SA wiederum ist an der Ausprägung von Seneszenz und Zelltod beteiligt, für die das Auftreten von Chlorosen und spontanen Nekrosen charakteristisch ist (Lim *et al.*, 2007; Yoshimoto *et al.*, 2009; Yoshimoto, 2010). Die konstitutive Expression dieser Gene könnte somit die Ursache für den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen morphologischen Phänotyp (frühe Seneszenz, Chlorosen, Nekrosen) der *pen2-1erp2*-Mutante sein.

Unter den konstitutiv reprimierten Genen befinden sich u. a. *XTR8* und *EXP11*, die laut Annotation an Prozessen der Zellwandmodifikation beteiligt sein könnten (TAIR10, www.arabidopsis.org).

Tabelle 3.1: Beispiele für in *pen2-1erp2* konstitutiv differentiell exprimierte Gene

FC = fold change, x-fache Veränderung der Genexpression, Gennummer und Annotation TAIR10

aktiviert			reprimiert		
FC	Gen	Annotation	FC	Gen	Annotation
420,7	At2g14610	PR1	-15,1	At1g27030	unbekannt
234,6	At3g57260	PR2	-11,4	At3g44990	XTR8
146,4	At2g43570	putative Chitinase	-10,4	At1g78450	Häm-Bindeprotein
145,7	At2g18660	EXLB3	-8,7	At2g02100	PDF2.2
115,9	At2g24850	TAT3	-8,5	At2g47930	AGP26
91,8	At1g33960	AIG1	-7,7	At2g44490	PEN2
80,3	At1g75040	PR5	-6,6	At3g07010	Pektatlyase-Familie
50,5	At3g26830	PAD3	-5,3	At3g52840	BGAL2
21,2	At1g74710	EDS16 (SID1)	-5,2	At1g20190	EXP11
20,8	At4g39030	EDS5 (SID2)	-4,7	At3g53190	Pektatlyase-Familie

3.1.5.2 Nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierte Gene

Nach Behandlung mit dem nicht-adaptierten Pathogen *P. infestans* werden in der *pen2-1*-Mutante im Vergleich zur Wasserbehandlung über 5000 Gene differentiell exprimiert, von denen etwa die Hälfte auch bei *pen2-1erp2* auftrat (Abbildung 3.7). Von den in beiden Mutanten differentiell exprimierten Genen wird der Großteil bereits 6h nach Pathogenbehandlung aktiviert/reprimiert und nur etwa 10 % erst nach 12 h. Da an dieser Stelle die *pen2-1erp2*-spezifischen Gene im Vordergrund stehen sollen, wurden die Ergebnisse der detaillierten Auswertung der in *pen2-1* und *pen2-1erp2* differentiell exprimierten Gene im Anhang dargestellt (Abbildung 6.1). Insgesamt waren spezifisch in *pen2-1erp2* 441 Gene differentiell exprimiert, wobei ca. 80 % (356) eine transiente Expression zeigten. Während 15 Gene zu beiden Zeitpunkten aktiviert/reprimiert waren, wurde für 70 Gene erst zum 12 h-Zeitpunkt eine differentielle Expression beobachtet.

nur in <i>pen2-1</i>			in <i>pen2-1</i> und <i>pen2-1erp2</i>			nur in <i>pen2-1erp2</i>		
2733 Gene			2525 Gene			441 Gene		
6h	6h+12h	12h	6h	6h+12h	12h	6h	6h+12h	12h
899	632	1202	1390	850	285	356	15	70

Abbildung 3.7: Differentiell exprimierte Gene in *pen2-1* und *pen2-1erp2* nach *P. infestans*-Behandlung. Für die Microarray-Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten fünf Wochen alte Pflanzen mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert und nach 6 bzw. 12 h geerntet. Die Anzahl der differentiell exprimierten Gene sind nach Genotypen und Zeitpunkten getrennt dargestellt. Die Auswertung erfolgte mittels Robin (Lohse *et al.* 2010); $p < 0,05$, fold change ≥ 2

Bei Betrachtung der 441 *pen2-1erp2*-spezifischen Gene unter dem Gesichtspunkt der Induktion oder Repression (Abbildung 3.8a) fällt auf, dass ein Großteil der Gene (318) durch die Behandlung mit *P. infestans* aktiviert wurde. Sechs Stunden nach Inokulation waren bereits

273 (262 + 11) Gene aktiviert, während für 45 Gene lediglich am 12h-Zeitpunkt eine Induktion vorlag (Abbildung 3.7b). Von den 123 reprimierten Genen zeigten 98 eine frühe Reduktion der Genexpression, 25 Gene erst zum späteren Zeitpunkt.

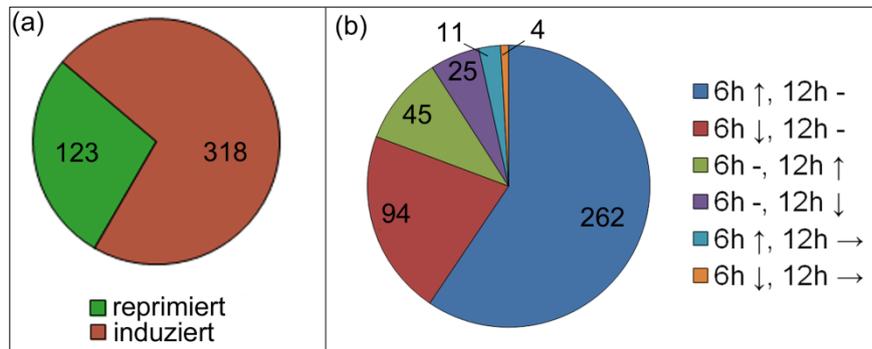


Abbildung 3.8: Übersicht der *pen2-1erp2*-spezifischen, nach *P. infestans*-Inokulation veränderten Gene. Verteilung (a) und Expressionsmuster (b) der 441 Gene, die nur in *pen2-1erp2* nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimiert sind (↑ = aktiviert, ↓ = reprimiert; → = gleichbleibend, - nicht differentiell exprimiert). Die Auswertung erfolgte mittels Robin ($p < 0,05$, $fold\ change \geq 2$).

Eine Einteilung der differentiell exprimierten Gene in Funktionsklassen ermöglicht eine detaillierte Auswertung der Microarray-Ergebnisse. Beispielhaft ist in Abbildung 3.9 die funktionelle Unterteilung der Gene dargestellt, die 6 h nach *P. infestans*-Inokulation spezifisch in *pen2-1erp2* aktiviert bzw. reprimiert waren. Die Ergebnisse für die übrigen Zeitpunkte sind im Anhang abgebildet (Abbildung 6.2). Wie aus Abbildung 3.9a ersichtlich, sind 6 h nach *P. infestans*-Behandlung überwiegend Gene aktiviert, die mit der Synthese oder dem Abbau von Proteinen im Zusammenhang stehen. Weiterhin werden sowohl Prozesse der Zellorganisation, Signaltransduktion, des Transportes und Stress-assoziierte Gene aktiviert. Die größte Gruppe der reprimierten Gene umfasst ebenfalls Prozesse der Proteinsynthese bzw. des Proteinabbaus, und zusätzlich Gene, die in der Photosynthese und dem Lipidmetabolismus involviert sind (Abbildung 3.9b).

Eine ähnliche Verteilung kann bei den Genen beobachtet werden, die an beiden Zeitpunkten differentiell exprimiert vorlagen. Während an Zellorganisations-, Signaltransduktions- und Transportprozessen beteiligte Gene sowie Stress-assoziierte Gene aktiviert werden, kann eine Reprimierung von Genen beobachtet werden, die an der Proteinmodifizierung, der Photosynthese und dem Lipidmetabolismus beteiligt sind (siehe Abbildung 6.2a und b im Anhang).

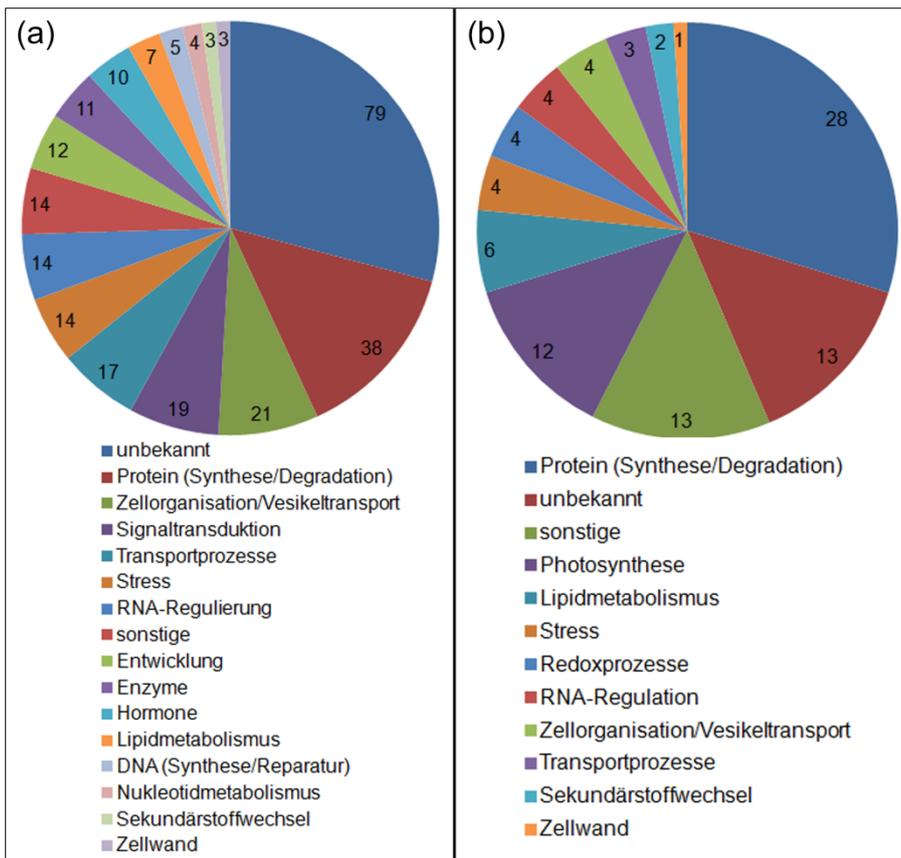


Abbildung 3.9: Einteilung der 6 h nach *P. infestans*-Behandlung in *pen2-1erp2* differentiell exprimierten Gene in Funktionsklassen. Dargestellt ist die funktionelle Einteilung der Gene, die 6 h nach *P. infestans*-Inokulation aktiviert (a) bzw. reprimiert (b) vorliegen.

3.1.5.3 Überprüfung von Microarray-Ergebnissen durch Northern Hybridisierung

Für die Überprüfung von Ergebnissen der Microarray-Analyse durch Northern-Hybridisierung wurden sechs aktivierte bzw. reprimierte Gene ausgewählt (Tabelle 3.2). Aus Platzgründen wird im Folgenden nur auf zwei der untersuchten Gene näher eingegangen. Die Ergebnisse der anderen Gene sind im Anhang dargestellt (Abbildung 6.3). Leider konnten für diese Gene die relativ geringen Veränderungen der Genexpression durch Northern-Hybridisierung nicht eindeutig nachgewiesen werden. Besser geeignet wäre in diesem Fall die Methode der quantitativen Realtime-PCR (qPCR), da sie sensitiver ist als die Northern-Hybridisierung.

Tabelle 3.2: Zur Überprüfung der Microarray-Auswertung ausgewählte Gene

FC = fold change, x-fache Veränderung der Genexpression; H₂O = Wasserbehandlung; Pi = Behandlung mit *P. infestans*; Gennummer und Annotation TAIR10

	FC		Gen
nach H ₂ O	225,4	6h und 12h	<i>At2g14610</i> (<i>PR1</i>)
	147,6		<i>At3g57260</i> (<i>PR2</i>)
	-10,9	6h	<i>At1g62510</i> (Proteaseinhibitor/Lipidtransferprotein)
nach Pi	3,1	6h und 12h	<i>At2g28930</i> (<i>APK1B</i>)
	-4,1	6h	<i>At1g78370</i> (<i>ATGSTU20</i>)
	-4,1	6h und 12h	<i>At1g01120</i> (<i>KCS1</i>)

Für die Überprüfung der Microarray-Ergebnisse wurde eine Zeitkinetik analog zu den Experimenten für die Microarrays durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.7). Zusätzlich zu *gl1-1*, *pen2-1* und *pen2-1erp2* (nicht zurückgekreuzt) wurde dabei auch die Linie einer Rückkreuzung von *pen2-1erp2* mit *pen2-1* (*BCpen2-1erp2*) verwendet.

Für die Gene *PR1* und *PR2* konnte durch Northern-Hybridisierung eine Akkumulation der Transkripte in *pen2-1erp2* nachgewiesen werden, die jedoch nach einer quantitativen Auswertung der Signalintensitäten nicht statistisch signifikant war (Abbildung 3.10). Möglicherweise liegt das an dem geringen Stichprobenumfang sowie der hohen Variabilität der Einzelexperimente, weshalb in zukünftigen Analysen die Anzahl der Experimente und damit der Stichprobenumfang zu erhöhen sind. Um die Variabilität von Northern-Hybridisierungen zu vermeiden, bietet sich zudem die Durchführung von qPCR-Analysen an.

Mit Hilfe der *BCpen2-1erp2*-Pflanzen kann ein Hinweis erhalten werden, ob die Mutation in *ERP2* für die beobachteten Veränderungen in der Genexpression verantwortlich ist. Im Fall von *PR1* und *PR2* zeigte die Rückkreuzungslinie keine Transkriptakkumulation, was die Vermutung zulässt, dass in *pen2-1erp2* nicht die *ERP2*-Mutation, sondern eine Sekundärmutation für die Änderung des Transkriptlevels dieser Gene verantwortlich ist.

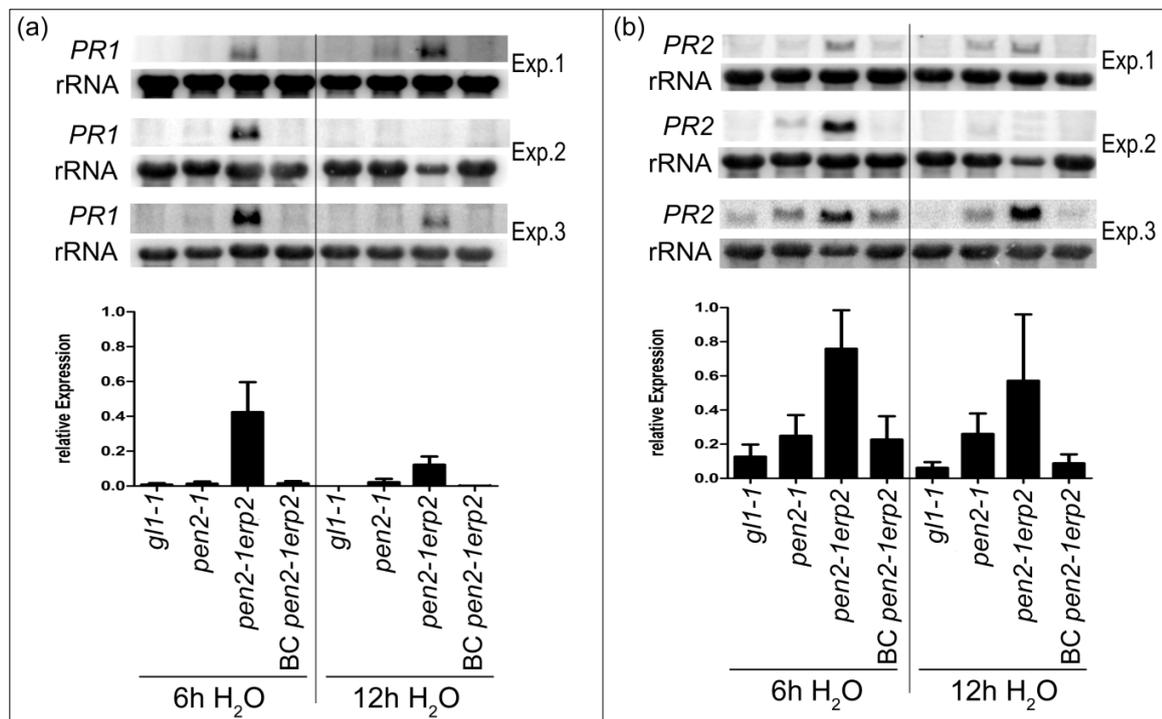


Abbildung 3.10: Überprüfung der Microarray-Ergebnisse für *PR1* und *PR2*. In drei unabhängigen Experimenten wurden fünf Wochen alte Pflanzen mit Wasser bis zur Tropfenbildung besprüht und nach 6 bzw. 12 h geerntet. Die Membranen für die Northern-Hybridisierungen wurden mit 10 µg Gesamt-RNA je Genotyp hergestellt und mit einem radioaktiv markierten (a) *PR1*- bzw. (b) *PR2*-Fragment hybridisiert (oben). Nach erneuter Hybridisierung der Membran mit einer rRNA-Sonde wurden die *PR1*- und *PR2*-Signalintensitäten gegen das rRNA-Signal normalisiert und quantitativ ausgewertet (unten). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für die zusammengefassten Daten aus drei Experimenten (n = 3). Zur statistischen Analyse wurde eine 1-Wegs-ANOVA verwendet.

3.1.5.4 Untersuchung von Kandidatengen

Nach Auswertung der Microarray-Daten wurden *pen2-1erp2*-spezifische Gene aufgrund einer besonders hohen Veränderung der Genexpression oder aufgrund der Zugehörigkeit zu bestimmten funktionellen Gruppen (Kinasen, Rezeptoren) für eine weitere Bearbeitung ausgewählt. Beispielfhaft sind in Tabelle 3.3 die jeweils 5 am stärksten konstitutiv exprimierten bzw. nach *P. infestans* aktivierten Rezeptor- und Kinase-kodierenden Gene zusammengefasst. Möglicherweise können dadurch Hinweise erhalten werden, an welchen Prozessen *ERP2* beteiligt sein könnte, oder Komponenten der Erkennung von *P. infestans* identifiziert werden. Für insgesamt 123 Gene wurden T-DNA-Insertionslinien (NASC) mit einer hochkonzentrierten Suspension von *P. infestans* ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert, jedoch konnte für keine der Linien eine makroskopisch sichtbare Zelltodreaktion beobachtet werden. Zum einen könnte die Veränderung der Genexpression die Folge einer Sekundärmutation sein, die keinen Einfluss auf die Ausprägung des HR-Phänotyps nach *Phytophthora*-Inokulation hat. Zum anderen könnte der Effekt einer Einzelmutation sehr gering und deshalb durch makroskopische Auswertung der inokulierten Blätter nicht erkennbar sein. Die Färbung inokulierter Blätter mit Trypanblau und die Einkreuzung von T-DNA-Insertionen in *pen2-1* könnten zu einer besseren Visualisierung des Effekts einer Mutation führen. Aufgrund der hohen Anzahl an Kandidatengen sind beide Ansätze kaum durchzuführen. Microarray-Analysen mit rückgekreuztem *pen2-1erp2*-Material könnten den Einfluss von Sekundärmutationen auf die Genexpression und somit auch die Anzahl der Kandidatengene reduzieren.

Tabelle 3.3: Beispiele für in *pen2-1erp2* differentiell exprimierte Kinasen und Rezeptoren
FC = fold change, x-fache Veränderung der Genexpression, Gennummer und Annotation TAIR10

konstitutiv		
FC	Gen	Annotation
59,8	<i>At4g23140</i> ; <i>At4g23160</i>	<i>CRK6 (CYSTEINE-RICH RLK 6)</i> ; putative Kinase
21,1	<i>At4g23150</i>	Proteinkinase
20,4	<i>At2g32680</i>	<i>AtRLP23 (Receptor Like Protein 23)</i>
17,0	<i>At3g25010</i>	<i>AtRLP41</i>
13,9	<i>At4g11890</i>	Proteinkinase
nach <i>P. infestans</i> -Inokulation		
FC	Gen	Annotation
3,4	<i>At2g40940</i>	<i>ERS1 (ETHYLENE RESPONSE SENSOR 1)</i>
3,4	<i>At2g16790</i>	Shikimat-Kinase
2,9	<i>At4g04960</i>	Putative Lektin-Proteinkinase
2,8	<i>At5g03730</i>	<i>CTR1 (CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1)</i>
2,6	<i>At1g53440</i>	gehört zur Familie Leucin-reicher Kinasen

3.2 Charakterisierung von *pen2-1erp6* und Identifizierung der Mutation in *ERP6*

3.2.1 Morphologie der *pen2-1erp6*-Mutante

Die *pen2-1erp6*-Mutante weist im Vergleich zu den Kontrollen *gl1-1* und *pen2-1* ein leicht verringertes Rosettenwachstum auf (Abbildung 3.11a) und auf den Blättern ausgewachsener Pflanzen können Chlorosen beobachtet werden (Abbildung 3.11b). Die Färbung mit Trypanblau zeigt, dass zusätzlich zu den Chlorosen ein punktuelles Auftreten von Zelltod beobachtet werden kann (Abbildung 3.11c).

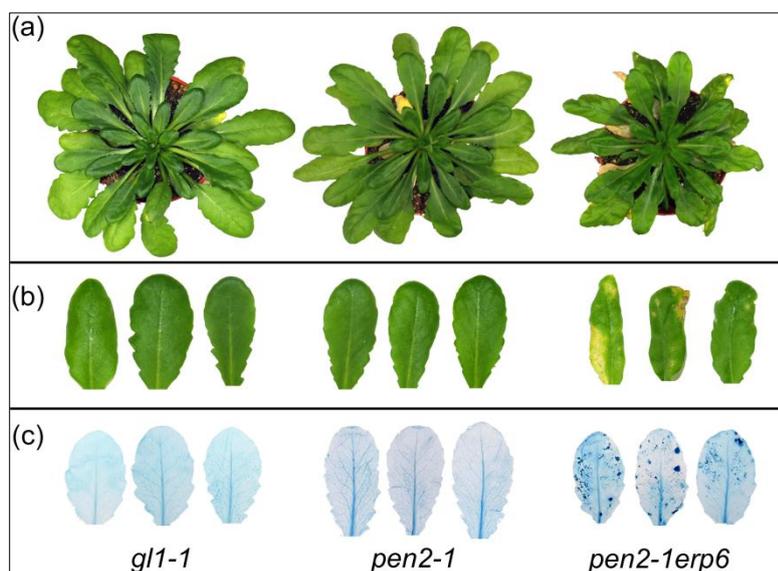


Abbildung 3.11: Morphologischer Phänotyp der *pen2-1erp6*-Mutante

(a) Dargestellt sind unbehandelte, acht Wochen alte Pflanzen, von denen einzelne Blätter (b) einer Trypanblaufärbung (c) unterzogen wurden. Gezeigt sind repräsentative Pflanzen bzw. Blätter aus einem Experiment mit je vier Pflanzen bzw. 15-20 Blättern pro Genotyp. In zwei zusätzlichen Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

3.2.2 Phänotyp von *pen2-1erp6* nach *P. infestans* – Inokulation

Drei Tage nach der Inokulation mit einer relativ hohen Konzentration von *P. infestans*-Sporen ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) war auf den inokulierten Blättern von *pen2-1* und *pen2-1erp6* die Ausbildung einer HR zu beobachten, während auf *gl1-1*-Pflanzen keine makroskopische Reaktion sichtbar wurde. Durch Trypanblaufärbung wurde deutlich erkennbar, dass die Zelltodreaktion in *pen2-1* deutlich stärker als in *gl1-1* ausfiel (Abbildung 3.12). Auch *pen2-1erp6* wies eine deutlich intensivere Trypanblaufärbung als *gl1-1* auf. Ob die Färbung und damit die Zelltodreaktion jedoch stärker als bei *pen2-1* war, konnte bei dieser hohen Sporenkonzentration nicht eindeutig beurteilt werden.

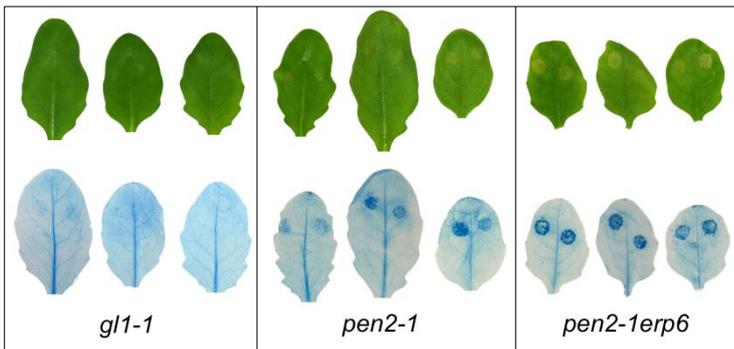


Abbildung 3.12: Phänotyp der *pen2-1erp6*-Mutante nach *P. infestans*-Inokulation. Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^5 Sporen/ml) inokuliert, nach drei Tagen fotografiert (oben) und mit Trypanblau gefärbt (unten). Gezeigt sind je drei repräsentative Blätter aus einem Experiment mit 15-20 Blättern pro Genotyp. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, mit ähnlichen Ergebnissen.

Zur besseren Differenzierung der HR in *pen2-1* und *pen2-1erp6* wurden diese Mutanten mit einer geringeren Sporenkonzentration (2×10^4 Sporen/ml) inokuliert. Wie aus Abbildung 3.13a ersichtlich ist, waren die Inokulationsstellen von *pen2-1erp6* deutlich intensiver gefärbt als die Inokulationsstellen von *pen2-1*. Die quantitative Auswertung der Trypanblaufärbung ergab für *pen2-1erp6* eine im Vergleich zu *pen2-1* signifikant stärkere Intensität der Färbung (Abbildung 3.13b).

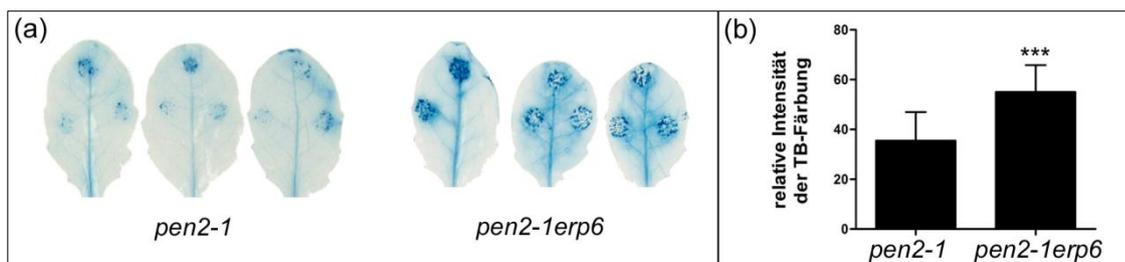


Abbildung 3.13: Darstellung der verstärkten Reaktion von *pen2-1erp6* nach *P. infestans*-Inokulation. (a) Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (2×10^4 Sporen/ml) inokuliert und drei Tage später einer Trypanblaufärbung unterzogen. Dargestellt sind je drei repräsentative Blätter aus einem Experiment mit 15-20 Blättern pro Genotyp. (b) Relative Intensität der Trypanblau (TB)-Färbung von Inokulationsstellen, wie in (a) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei zusammengefassten Experimenten ($n = 77$ [*pen2-1*]; $n = 86$ [*pen2-1erp6*]). *** zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* an (t-Test nach Mann-Whitney, $p < 0,001$).

3.2.3 *pen2-1erp6* trägt eine Mutation in *EDR1*

3.2.3.1 Kartierung der *erp6*-Mutation

Unter Verwendung einer F2-Population aus der Kreuzung von *pen2-1erp6* mit dem Arabidopsis-Ökotyp Landsberg *erecta* wurde die *erp6*-Mutation auf dem oberen Arm von Chromosom 1 kartiert (Dr. Lore Westphal, IPB Halle). Die anschließende Sequenzierung des Gesamtgenoms von *pen2-1erp6* in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von D. Weigel (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) zeigte, dass auf Chromosom 1 nur das Gen *At1g08720* eine *pen2-1erp6*-spezifische Punktmutation im kodierenden Sequenzbereich trägt. Durch das Gen *At1g08720* wird die putative MAPKKK *EDR1* kodiert (TAIR10). Die Nukleotidsubstitution im 12. Exon (Abbildung 3.14b) führt zu einem Aminosäureaustausch von

Glycin zu Glutamat innerhalb der Kinasedomäne (KD) des EDR1-Proteins (Abbildung 3.14c). Weiterhin erzeugt der Nukleotidaustausch eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *TaqI*, der den Nachweis der Mutation durch einen allelspezifischen CAPS (cleaved amplified polymorphic sequence)-Marker erlaubt. Mit den CAPS-Primern wird für den Wildtyp und die *pen2-1erp6*-Mutante ein Fragment von 750 bp amplifiziert, das jedoch nur bei *pen2-1erp6* durch *TaqI* in ein 498 bp- und ein 252 bp-großes Fragment gespalten wird (Abbildung 3.14a).

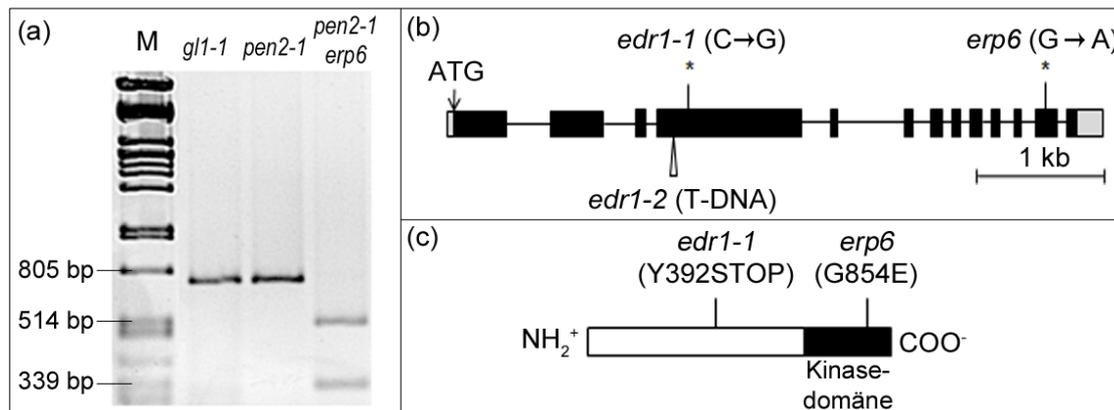


Abbildung 3.14: Nachweis der *pen2-1erp6*-Mutation und Position der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *EDR1*-Mutationen. (a) Die Sequenzierung von *pen2-1erp6* zeigte einen Nukleotid-austausch in *EDR1* auf, der in einer zusätzlichen *TaqI*-Schnittstelle resultiert. Nur das 750 bp große CAPS-Markerfragment von *pen2-1erp6* kann durch *TaqI* in ein 498 bp- und ein 252 bp-großes Fragment zerschnitten werden. (b) Schematische Intron-Exon-Struktur von *EDR1* mit der Lokalisierung der *edr1-1*- und *pen2-1erp6*- Mutation sowie der T-DNA-Insertionsstelle in *edr1-2* (SALK_053889). (c) Dargestellt ist die schematische Proteinstruktur von *EDR1*. Während die *edr1-1*-Mutation (C → G Substitution) zu einem verfrühten Stop-Codon und somit zu einem verkürzten *EDR1*-Protein führt, resultiert die *pen2-1erp6*-Mutation im Austausch von Glycin zu Glutamat innerhalb der Kinasedomäne von *EDR1*.

3.2.3.2 HR-Phänotyp und Morphologie verschiedener *edr1*-Mutanten

Aus einer Rückkreuzung von *pen2-1erp6* mit *gl1-1* wurde eine *erp6*-Mutante generiert. Dabei wurden die F2-Pflanzen auf die Ausprägung einer HR nach *P. infestans*-Inokulation hin selektiert und anschließend mit Hilfe von *pen2-1*- und *erp6*-spezifischen CAPS-Markern überprüft. Um zu bestätigen, dass Mutationen in *EDR1* die Reaktion von Arabidopsis auf *P. infestans* verändern, wurden mit der *edr1-1*-Mutante (Frye und Innes, 1998), einer von Hiruma *et al.* (2011) bereits verwendeten T-DNA-Insertionslinie (SALK_053889 = *edr1-2*; NASC), einer weiteren von NASC erworbenen KO-Linie (SALK_119307, als *edr1-5* bezeichnet) und *erp6* als Vergleichsmutante Inokulationsexperimente durchgeführt. Von den spalten-den T-DNA-Linien wurde zunächst nach allelspezifischer PCR jeweils eine Wildtyp-Pflanze als Kontrolle (*edr1-2* #4, *edr1-5* #7) und eine homozygote Mutante (*edr1-2* #3, *edr1-5* #5) selektiert und vermehrt.

Drei Tage nach Inokulation mit einer hoch konzentrierten Suspension von *P. infestans*-Zoosporen ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) war makroskopisch auf den inokulierten Blätter nur eine schwache HR-Reaktion zu erkennen. Nach Trypanblaufärbung konnte bei *erp6*, *edr1-1* und der

T-DNA-Linie *edr1-2 #3* eine deutliche Zelltodreaktion im Vergleich zu den Kontrollen Col-0, *gl1-1* und *edr1-2 #3* beobachtet werden. Die Blätter der homozygoten T-DNA-Insertionslinie *edr1-5 #5* unterschieden sich jedoch nicht von den Blättern der Wildtyp-Kontrolle *edr1-5 #7* (Abbildung 3.15a). Die quantitative Auswertung der Trypanblaufärbung ergab, dass die in *erp6*, *edr1-1* und *edr1-2 #3* vorhandene hypersensitive Reaktion im Vergleich zu *gl1-1* bzw. Col-0 signifikant erhöht war (Abbildung 3.15b). In drei zusätzlichen Experimenten, in denen die Pflanzen erst sechs Tage nach Inokulation ausgewertet wurden, war der HR-Phänotyp von *erp6*, *edr1-1* und *edr1-2 #3* auch makroskopisch sichtbar (siehe Abbildung 6.4 im Anhang). Durch Northern-Hybridisierung konnte für die Insertionslinie *edr1-2 #3* eine starke Reduktion des *EDR1*-Transkripts nachgewiesen werden, während die *EDR1*-Transkriptakkumulation von *edr1-5 #5* mit dem Transkriptlevel der Kontrollpflanzen vergleichbar war (Abbildung 3.15c). Somit konnte trotz des Nachweises der T-DNA-Insertion in *edr1-5 #5* keine Reduktion des *EDR1*-Transkriptes festgestellt werden, weshalb *edr1-5* von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

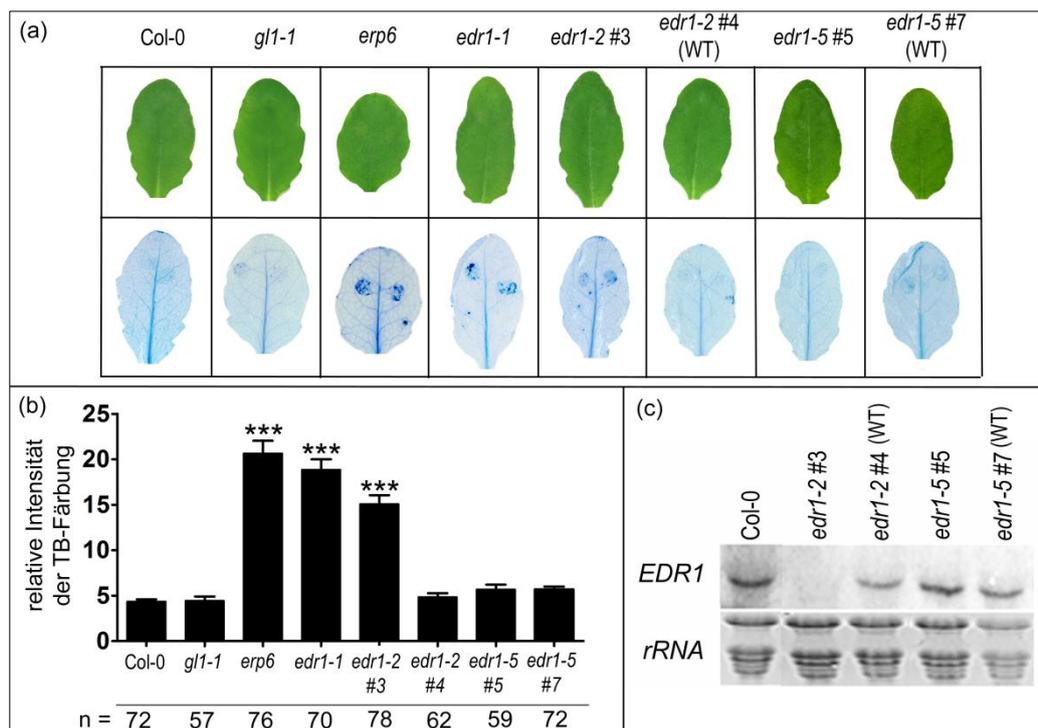


Abbildung 3.15: HR-Phänotyp der verschiedenen *edr1*-Mutanten nach *P. infestans*-Behandlung

(a) Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert. Nach drei Tagen wurden inokulierte Blätter geerntet und mit Trypanblau (TB) gefärbt. Die abgebildeten Blätter sind repräsentativ für ein Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. (b) Relative Intensität der TB-Färbung von Blättern wie in (a) gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte mit Standardfehlern aus drei zusammengefassten Experimenten. Die Stichprobenmenge (n) ist unterhalb der jeweiligen Balken dargestellt. *** zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an (1-Wegs-ANOVA, $p < 0,001$). (c) Aus unbehandelten 6 Wochen alten Pflanzen wurde Gesamt-RNA isoliert und 20 μ g Total-RNA der Northern-Blot-Analyse unterzogen. Die Membran wurde mit einem radioaktiv markierten *EDR1*-Fragment hybridisiert. Als Ladungskontrolle ist die rRNA im Ethidiumbromid-gefärbten Gel dargestellt.

Zusätzlich zu den Einzelmutanten wurde die HR-Reaktion von *pen2-1erp6* und *pen2-1edr1-1* miteinander verglichen. Zur Quantifizierung der HR wurde in drei unabhängigen Experimenten die Intensität der Trypanblaufärbung einer größeren Anzahl von Inokulationsstellen bestimmt (Abbildung 3.16a). Die Inokulation erfolgte mit einer relativ geringen Sporenkonzentration von $2 \cdot 10^4$ Sporen/ml um einen Sättigungseffekt bei der Trypanblaufärbung zu vermeiden. Die statistische Auswertung der aus allen Experimenten zusammengefassten Daten ergab eine signifikant stärkere Ausprägung der Trypanblaufärbung und somit der Zelltodreaktion in *pen2-1erp6* und *pen2-1edr1-1* im Vergleich zu *pen2-1*, aber keinen signifikanten Unterschied für den Vergleich von *pen2-1erp6* mit *pen2-1edr1-1* (Abbildung 3.16b).

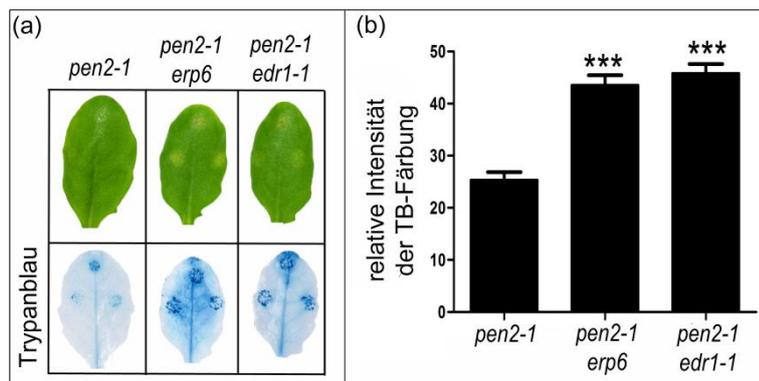


Abbildung 3.16: Vergleich der Reaktion von *pen2-1erp6* und *pen2-1edr1-1* auf *P. infestans*

(a) Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und drei Tage später einer Trypanblau (TB)-färbung unterzogen. Dargestellt sind je drei repräsentative Blätter aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. (b) Relative Intensität der TB-Färbung von Inokulationsstellen, wie in (a) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte und Standardfehler aus drei zusammengefassten Experimenten ($n = 77$ [*pen2-1*]; $n = 86$ [*pen2-1erp6*], $n = 84$ [*pen2-1edr1-1*]). ***zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* an (t-Test nach Mann-Whitney, $p < 0,001$).

Die Analyse unbehandelter Pflanzen zeigte, dass sowohl *erp6* als auch *edr1-1* ein deutlich verringertes Rosettenwachstum im Vergleich zu *gl1-1* bzw. Col-0 aufwiesen, während bei *edr1-2 #3* nur ein leicht verringertes Wachstum beobachtet werden konnte (Abbildung 3.17a). Auch *pen2-1erp6* und *pen2-1edr1-1* zeigten ein leicht verringertes Wachstum im Vergleich zu *pen2-1*, jedoch weniger stark als *erp6* und *edr1-1*, was auf eine *PEN2*-Abhängigkeit des Wachstumsphänotyps hinweisen würde. Allerdings könnten auch Sekundärmutationen für diesen Phänotyp verantwortlich sein, weshalb die Beteiligung von *PEN2* durch die Kreuzung von *edr1-1* und *erp6* mit einer weiteren *PEN2*-Mutante überprüft werden müsste.

Für *edr1-1* ist bekannt, dass es unter Trockenstress zur Ausprägung nekrotischer Läsionen kommt (Tang *et al.*, 2005). Wie aus Abbildung 3.17b hervorgeht, zeigten sowohl *erp6* als auch *edr1-2 #3* ähnlich wie *edr1-1* punktförmige Bereiche mit Zelltod, die nach einer Färbung mit Trypanblau deutlicher zu erkennen sind. Dieser Phänotyp war unabhängig von *PEN2*, denn der Phänotyp von *pen2-1edr1-1*- und *pen2-1erp6*-Pflanzen war mit dem der Einzelmutanten vergleichbar.

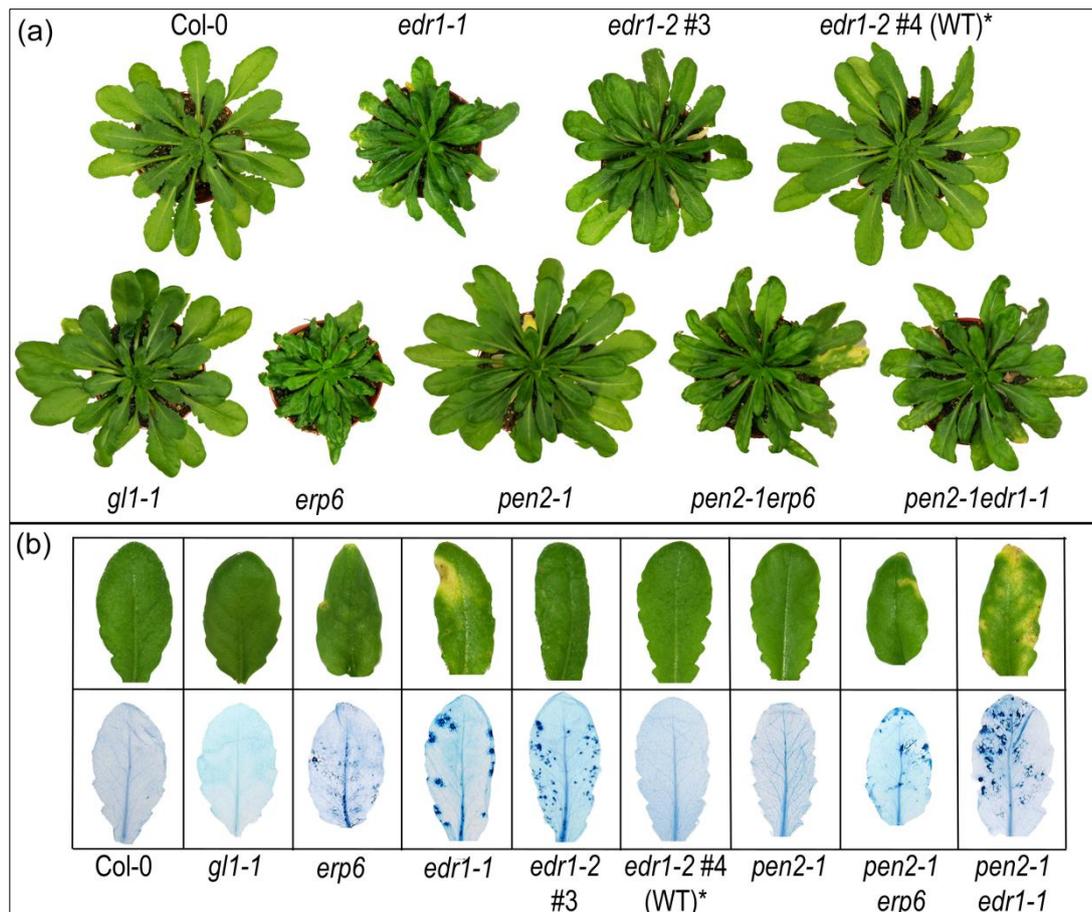


Abbildung 3.17: Morphologie der verschiedenen *edr1*-Mutanten. Die Blätter acht Wochen alter Pflanzen (a) wurden fotografiert und mit Trypanblau gefärbt (b). Dargestellt sind repräsentative Pflanzen bzw. Blätter aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. In zwei weiteren Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. *: Laut NASC ist *edr1-2* eine segregierende T-DNA-Insertionslinie. *edr1-2 #4* wies keine T-DNA-Insertion auf und zeigte *EDR1*-Transkript (s. 3.2.3.2). Diese Linie wurde als Negativkontrolle mitgeführt und repräsentiert den Wildtyp (WT).

3.2.3.3 Zellulärer Phänotyp der *edr1*-Mutanten nach *P. infestans* – Inokulation

Für die Analyse der zellulären Reaktion der *edr1*-Mutanten einzeln und in Kombination mit *pen2-1* auf *P. infestans*, wurden Pflanzen mit einer niedrigen Sporenkonzentration ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert. Wie in Abbildung 3.18 ersichtlich, konnte durch mikroskopische Untersuchung der Trypanblau-gefärbten Blätter gezeigt werden, dass in Col-0 und *gl1-1* trotz makroskopisch nicht sichtbarer HR eine Reaktion stattfindet. Vereinzelt konnte das Auftreten toter Epidermiszellen und häufig die Bildung callosehaltiger Papillen am Ort der versuchten Penetration von *P. infestans* beobachtet werden. Während bei der *pen2-1*-Mutante aufgrund der Beeinträchtigung in der Penetrationsresistenz eine Zunahme toter Epidermiszellen im Vergleich zu *gl1-1* beobachtet wurde, wiesen die *edr1*-Mutanten keine erhöhte Anzahl toter Epidermiszellen auf, jedoch war hier die Ausprägung von Mesophyllzelltod zu beobachten. Dieser ging mit einer Ablagerung von Callose in den Mesophyllzellen einher, wie aus der Anilinblau-Färbung ersichtlich wurde (Abbildung 3.18). Die als Negativkontrolle mitgeführte Linie *edr1-2 #4* zeigte analog zu Col-0 und *gl1-1* nur selten tote Epidermiszellen, jedoch häufig die

Bildung von callosehaltigen Papillen am Ort der versuchten *P. infestans*-Penetration. Ähnlich wie *pen2-1erp6* wiesen auch *pen2-1edr1-1*-Pflanzen nach Inokulation mit *P. infestans* Zelltod in der Epidermis und im Mesophyll auf, der in beiden Fällen mit einer Ablagerung von Callose verbunden war.

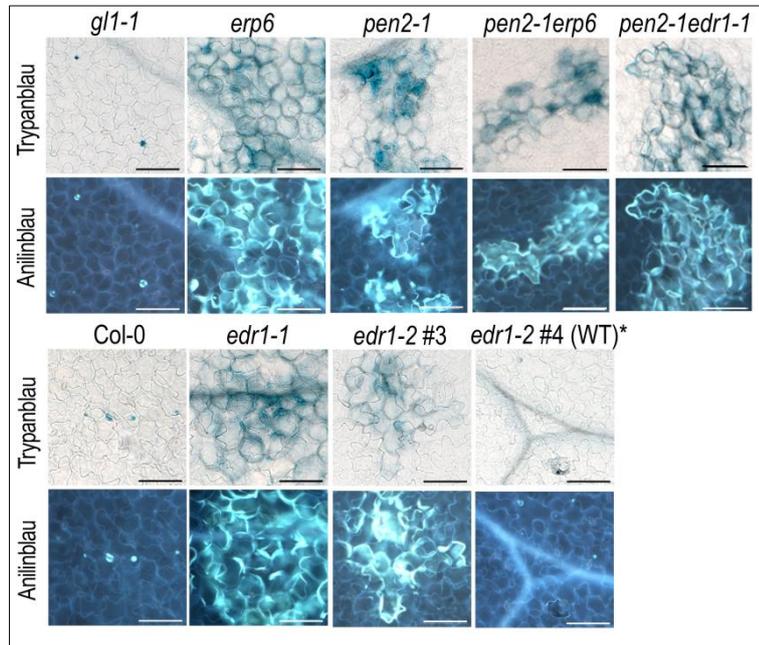


Abbildung 3.18: Lichtmikroskopische Analyse verschiedener *edr1*-Mutanten. Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und drei Tage später einer kombinierten Färbung mit Trypanblau (oben) und Anilinblau (unten) unterzogen. Die Bilder wurden mittels eines Stereomikroskopes (AZ100, Nikon) aufgenommen (Balken = 100 µm). Die an den Inokulationsstellen gebildete Callose wurde nach Anilinblaufärbung unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Experiment wurde zweimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. *: *edr1-2 #4* wurde als Negativkontrolle mitgeführt und repräsentiert den Wildtyp (WT).

3.2.3.4 Kreuzung von *pen2-1edr1-1* mit *pen2-1erp6*

Durch Kreuzung von *pen2-1edr1-1* mit *pen2-1erp6* sollte analysiert werden, ob die verstärkte HR der beiden Genotypen auf der in *EDR1* identifizierten Mutation basiert. Wäre dies nicht der Fall, würde in den F1-Pflanzen eine Komplementation zum *pen2-1*-Phänotyp erfolgen. Die Experimente umfassten 12 F1-Linien, für die mittels *erp6*- und *edr1-1*-spezifischer CAPS-Marker das Vorliegen beider Mutationen bestätigt wurde (Abbildung 3.19b). Die quantitative Analyse der Trypanblau-gefärbten Blätter (Abbildung 3.19a) ermittelte für acht der zwölf Linien signifikant höhere Trypanblau-Intensitäten im Vergleich zu *pen2-1* (Abbildung 3.19c) und damit keine Komplementation. Von den vier Linien, die sich in ihrer HR-Ausprägung statistisch nicht von *pen2-1* unterschieden (F1-4, F1-8, F1-11, F1-13), wurden F2-Nachkommenschaften mit *P. infestans* inokuliert ($n = 124$, $n = 128$, $n = 122$, $n = 130$) und mit 40 zufällig ausgewählten Blättern pro Linie erfolgte eine Trypanblaufärbung. Makroskopisch zeigte keine der F2-Pflanzen einen Wildtyp-Phänotyp, der bei Komplementation hätte herauspalten müssen. Die relativen Intensitäten der Trypanblaufärbung bestätigte, dass die Reaktion der vier Linien im Vergleich zu *pen2-1* signifikant erhöht war (Abbildung 3.19d).

Sowohl die F1- als auch F2-Pflanzen der Kreuzung *pen2-1edr1-1* mit *pen2-1erp6* wiesen keine Komplementation zum *pen2-1*-Phänotyp auf und belegen, dass die Mutation in *EDR1* für den erhöhten Zelltod verantwortlich ist.

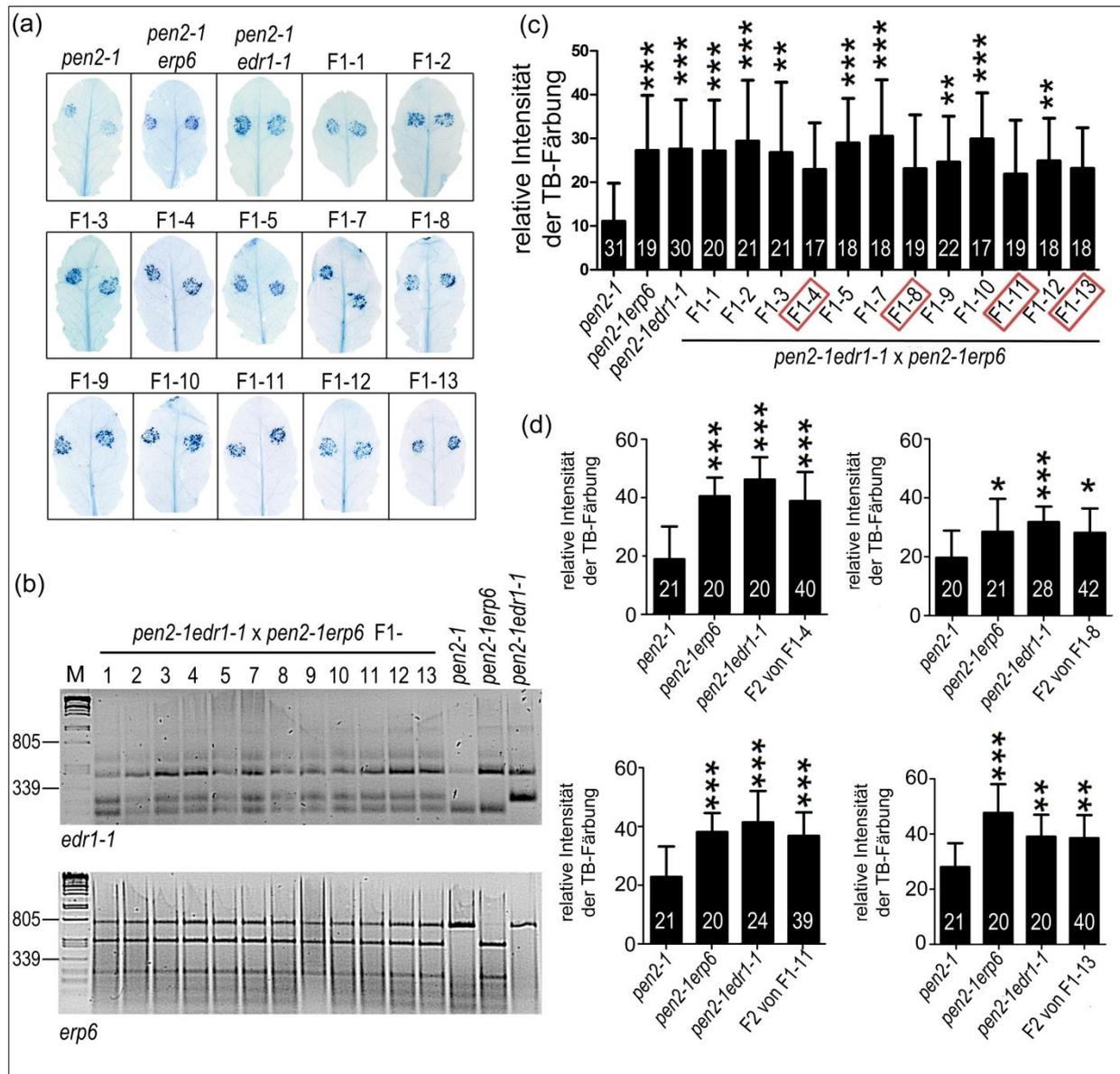


Abbildung 3.19: Phänotypische Analyse von Pflanzen aus der Kreuzung von *pen2-1erp6* mit *pen2-1edr1-1*. (a) Aus der Kreuzung von *pen2-1edr1-1* mit *pen2-1erp6* wurden 12 F1-Pflanzen im Alter von fünf Wochen mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert. Drei Tage später wurden Blätter geerntet und mit Trypanblau (TB) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Blätter der F1-Einzelpflanzen und Kontrollpflanzen aus einem Experiment mit insgesamt 8-15 Blättern pro Genotyp. (b) Von den F1-Pflanzen wurde DNA isoliert und mittels allelspezifischer PCR wurde überprüft, ob sowohl das *edr1-1*- als auch das *erp6*-Allel vorlag. Als Kontrolle wurden *pen2-1*, *pen2-1edr1-1* sowie *pen2-1erp6* in der PCR mitgeführt. Als Größenstandard (M, in bp) auf den 2%-Agarosegelen diente mit *Pst*I verdaut DNA des Phagen Lambda. Erwartete Fragmente: *edr1-1*-Marker: WT = 331 bp und 156 bp, mut. = 331 bp und 253 bp; *erp6*-CAPS: WT = 750 bp; mut. = 498 bp und 252 bp. (c) Relative Intensität der TB-Färbung von Inokulationsstellen wie in (a) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem Experiment. Die Stichprobenmenge (n) ist als weiße Zahl in den jeweiligen Balken dargestellt. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* (1-Wegs-ANOVA, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$). (d) F2-Nachkommen der Linien F1-4, F1-8, F1-11 und F1-13 wurden mit *P. infestans* ($5 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert (n = 124 [F1-4], n = 128 [F1-8], n = 122 [F1-11], n = 130 [F1-13]). Alle inokulierten Pflanzen zeigten 3 Tage nach Inokulation eine im Vergleich zu *pen2-1* verstärkte Zelltodreaktion. Anschließend wurde mit zufallsgemäß ausgewählten Blättern eine TB-Färbung und quantitative Auswertung der Inokulationsstellen durchgeführt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung. Die Stichprobenmenge (n) ist als weiße Zahl in den jeweiligen Balken dargestellt. Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* (1-Wegs-ANOVA, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

3.2.3.5 Erzeugung einer *pen2-1edr1-2*-Mutante

In Ergänzung zu den unter 3.2.3.2 und 3.2.3.4 beschriebenen Experimenten sollte durch Kreuzung der T-DNA-Insertionslinie *edr1-2* #3 mit *pen2-1* eine zusätzliche *pen2-1edr1-2*-Mutante generiert und mit *P. infestans* getestet werden. Zu diesem Zweck wurden aus der spaltenden F2-Nachkommenschaft mit Hilfe des *pen2-1*-spezifischen CAPS-Markers und des PCR-Nachweises der T-DNA-Insertion (siehe Anhang Abbildung 6.5) 6 homozygote *pen2-1edr1-2*-Pflanzen selektiert. Die nach der Abreife zur Verfügung stehenden F3-Linien wurden mit *P. infestans* in einer Sporenkonzentration von $5 \cdot 10^4$ Sporen/ml inokuliert. Wie aus den Trypanblau-gefärbten Blättern in Abbildung 3.20a ersichtlich wird, reagierten alle Linien mit einer stärkeren HR als *pen2-1* und *edr1-2*#3. Die quantitative Auswertung der relativen Intensitäten der Trypanblaufärbung bestätigte diese makroskopische Beurteilung (Abbildung 3.20b).

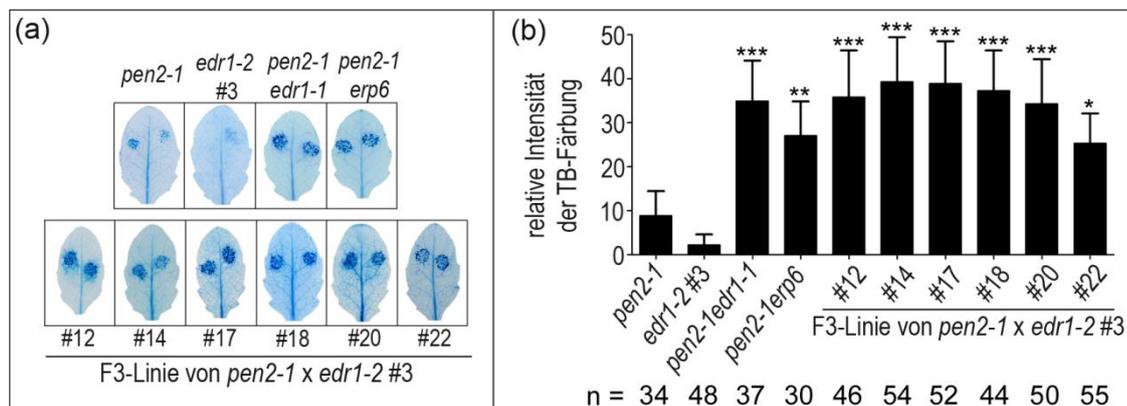


Abbildung 3.20: Quantifizierung der Reaktion der *pen2-1edr1-2*-Mutante nach *P. infestans*-Behandlung. (a) Etwa fünf Wochen alte Pflanzen verschiedener *pen2-1edr1-2*-Linien wurden mit 10 μ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert. Nach drei Tagen wurden Blätter geerntet und mit Trypanblau (TB) gefärbt. Dargestellt sind repräsentative Blätter aus einem Experiment mit 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. (b) Relative Intensität der TB-Färbung an Inokulationsstellen von Blättern wie in (a) dargestellt. Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus einem Experiment. Die Stichprobenmenge (n) ist unterhalb der jeweiligen Balken dargestellt. Sternchen bedeuten signifikante Unterschiede zur Kontrolle *pen2-1* (1-Wegs-ANOVA, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

3.2.3.6 Komplementationsanalysen

Für Komplementationsanalysen wurden *edr1-1*- und *erp6*-Pflanzen mit einem cDNA-Konstrukt von *EDR1* unter der Kontrolle des endogenen Promotors (freundlicherweise von Dr. Innes, Indiana University zur Verfügung gestellt) stabil transformiert. Sowohl für *edr1-1* als auch *erp6* konnten je vier Kanamycin-resistente T1-Pflanzen selektiert werden. Die resultierenden T2-Pflanzen wurden mit einer hohen Konzentration von *P. infestans*-Sporen ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert, jedoch wurde bei keiner der getesteten T2-Pflanzen eine Komplementation des HR-Phänotyps festgestellt. Die anschließende genotypische Analyse

der T2-Pflanzen ergab, dass keine der selektierten Pflanzen transgen war. Möglicherweise ist die transgene Expression von *EDR1* lethal. Ähnliche Beobachtungen machten auch Tang und Innes (2002), die zwar vermeintlich transgene *edr1-1*-Linien selektierten, aber ebenfalls keine Komplementation beobachten konnten. Auch der Versuch von Tang *et al.* (2005), die *edr1-1*-Mutation durch eine induzierbare Überexpression der EDR1-KD zu komplementieren, war erfolglos. In beiden Fällen wurde der konstitutive 35S-Promoter benutzt, und die Autoren spekulieren, dass die Überexpression von *EDR1* zu einer Beeinträchtigung des Genproduktes und somit zu einem dominant negativen Effekt führt.

Trotz fehlender Komplementationsanalysen konnten die durchgeführten Inokulationsexperimente und morphologische Betrachtung der verschiedenen *edr1*-Mutanten, die Kreuzung von *pen2-1erp6* mit *pen2-1edr1-1* und die Analyse der *pen2-1edr1-2*-Mutante verifizieren, dass sowohl die beschriebenen morphologischen Charakteristika als auch der HR-Phänotyp von *erp6* und *pen2-1erp6* nach *P. infestans*-Inokulation auf den identifizierten Nukleotid-austausch in *EDR1* zurückzuführen sind.

3.2.4 Detailliertere Charakterisierung der *erp6*-Mutante

3.2.4.1 Auswirkung der *erp6*-Mutation auf die *EDR1*-Transkriptakkumulation

Unbehandelte Pflanzen wurden analysiert, um einen möglichen Einfluss der *erp6*-Mutation auf die Akkumulation des *EDR1*-Transkriptes zu untersuchen. In dem in Abbildung 3.21 dargestellten Northern Blot ist ersichtlich, dass sowohl *erp6* als auch *pen2-1erp6* eine mit dem Wildtyp vergleichbare *EDR1*-Transkriptakkumulation aufwiesen, wohingegen für *edr1-1* und *pen2-1edr1-1* eine starke Reduktion des *EDR1*-Transkriptes zu beobachten war. Für *edr1-1* war diese Reduktion bereits bekannt (Frye *et al.*, 2001).

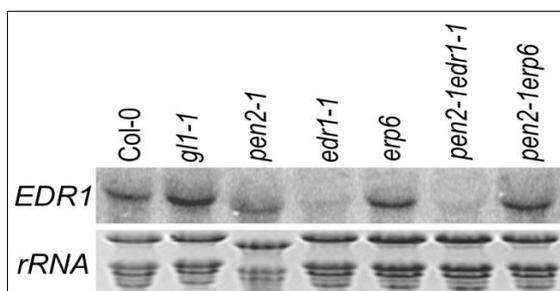


Abbildung 3.21: Analyse der *EDR1*-Transkriptakkumulation. RNA wurde aus unbehandelten sechs Wochen alten Pflanzen isoliert und der Northern Blot-Analyse unterzogen (20 µg Gesamt-RNA je Genotyp). Die Membran wurde mit einem radioaktiv markierten *EDR1*-Fragment hybridisiert. Als Ladungskontrolle ist die rRNA im Ethidiumbromid-gefärbten Gel dargestellt.

3.2.4.2 Einfluss der *erp6*-Mutation auf die Kinaseaktivität von EDR1

Da in *erp6* keine Veränderung der *EDR1*-Transkriptakkumulation beobachtet wurde, die identifizierte Mutation jedoch innerhalb der KD liegt, sollte anschließend die Kinaseaktivität

des EDR1-Proteins analysiert werden. Zu diesem Zweck wurde die EDR1-KD aus Wildtyp (Col-0) bzw. Mutante (*erp6*) in den Expressionsvektor pDEST-N112 kloniert, der neben einem N-terminalen Hexahistidin-Tag zur Aufreinigung ebenfalls ein Maltosebindeprotein (MBP) enthält, um die Löslichkeit des Fusionsproteins zu verbessern. Nach Überexpression der Fusionsproteine in *E. coli* Rosetta-gami wurden mittels SDS-PAGE verschiedene Fraktionen auf das Vorhandensein des Proteins geprüft. Wie in Abbildung 3.22 ersichtlich, konnte durch Induktion mit IPTG die Expression des ~70 kDa großen Fusionsproteins erreicht werden. Die Analyse des Überstandes und Pellets nach Zellyse zeigte, dass der Hauptteil des Proteins als unlösliche Fraktion im Pellet vorlag. Anhand einer Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen MBP konnte die Expression des Fusionsproteins bestätigt und ein geringer Anteil des Fusionsproteins in der löslichen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 3.22).

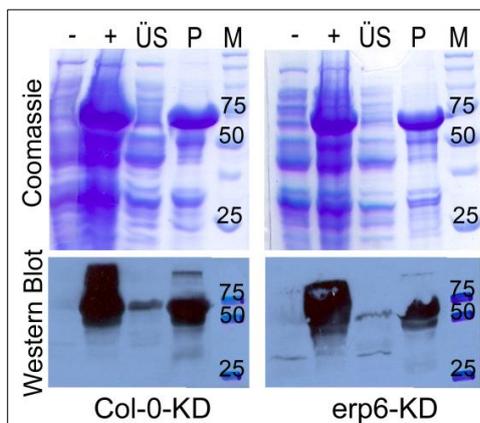


Abbildung 3.22: Überexpression der Kinasedomäne aus EDR1 in *E. coli*. Die EDR1-KD (~70 kDa) aus dem Wildtyp (Col-0) und der Mutante (*erp6*) wurde rekombinant in *E. coli* exprimiert. Vor (-) und nach (+) Induktion der Expression sowie nach Zellaufschluss (ÜS = Überstand; P = Pellet) wurden Proben entnommen und mittels SDS-PAGE (12 %-Gel; M = Größenstandard [kDa]) analysiert. Eine Visualisierung der Proteine erfolgte durch eine Coomassiefärbung (oben). Zur Bestätigung des Proteins wurde ein Western Blot mit einem Antikörper gegen das Maltosebindeprotein des Fusionsproteins durchgeführt (unten).

Für die Aufreinigung wurde die EDR1-KD in einem größeren Maßstab in *E. coli* überexprimiert und der nach Zellyse gewonnene Überstand mittels Metallaffinitätschromatografie aufgereinigt. Die Analyse der während des Aufreinigungsprozesses erfassten Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass die Kombination aus Reinheit und Menge des Fusionsproteins in der 5. und 6. Elutionsfraktion am besten war (Abbildung 3.23), weshalb diese Fraktionen für die weiteren Untersuchungen mit der KD eingesetzt wurden.

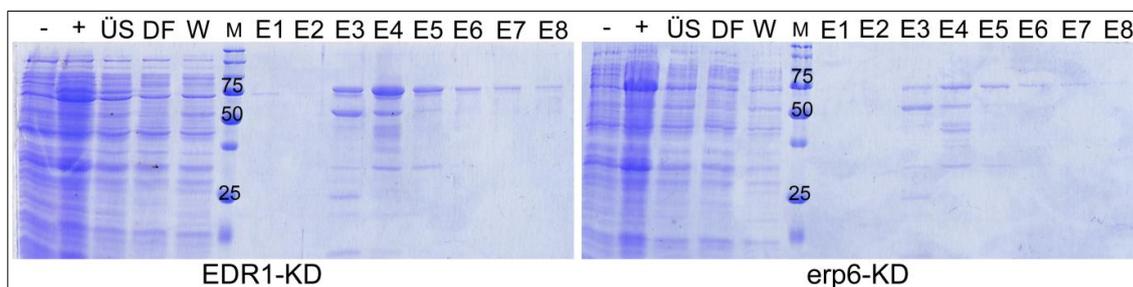


Abbildung 3.23: Aufreinigung der EDR1-Kinasedomäne. Nach der rekombinanten Expression der KD in *E. coli* folgte die Proteinextraktion und -aufreinigung. Während der Expression und des Aufreinigungsprozesses wurden Proben entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]) und Coomassiefärbung analysiert. - = vor Induktion; + = nach Induktion; ÜS = Überstand; DF = Durchfluss; W = Waschfraktion; E1-E8 = Elutionsfraktionen

Um die Fähigkeit der KD zur Phosphorylierung zu untersuchen, wurden die aufgereinigten Fraktionen der Wildtypform (Col-0) und mutierten (*erp6*) KD zusammen mit dem artifiziellen Substrat Myelin Basic Protein (MyBP) inkubiert. Für den Nachweis einer Phosphorylierung wurde die Pro-Q Diamond-Färbung eingesetzt. Dabei handelt es sich um eine spezielle Fluoreszenz-Färbung, die es ermöglicht, nur phosphorylierte Proteine darzustellen. Durch diese Analyse konnte keine Phosphorylierung des MyBP beobachtet werden (Abbildung 3.24a). Die mitgeführte Negativkontrolle, in der MyBP ohne eine Kinase inkubiert wurde, zeigte, dass das eingesetzte MyBP bereits phosphoryliert vorlag, wodurch eine eventuelle Phosphorylierung durch die KD in diesem Fall nicht nachweisbar war. Parallele Untersuchungen in einem radioaktiven Assay, mit dem eine *de novo*-Phosphorylierung nachgewiesen werden kann, zeigte jedoch ebenfalls keine Phosphorylierung des Substrates durch die EDR1-KD (Daten nicht gezeigt). Die für die EDR1-KD bekannte Fähigkeit zur Phosphorylierung von MyBP (Tang und Innes, 2002) konnte hier nicht reproduziert werden, was an der genutzten MyBP-Charge liegen könnte, die möglicherweise verunreinigt war.

Auffallend war jedoch, dass es scheinbar Unterschiede in der Autophosphorylierung der KD aus Col-0 und *erp6* gab. Aus diesem Grund wurden in einem unabhängigen Experiment beide Domänen mit und ohne ATP inkubiert und mittels Pro-Q Diamond-Färbung analysiert (Abbildung 3.24b). Dabei wies bereits die aufgereinigte Col-0-KD aus *E. coli* eine Phosphorylierung auf, die durch Inkubation mit ATP scheinbar noch etwas verstärkt wurde. Dahingegen konnte für die KD aus *erp6* kein Signal nach Pro-Q Diamond-Färbung beobachtet werden, was vermuten lässt, dass deren Autophosphorylierung gestört ist.

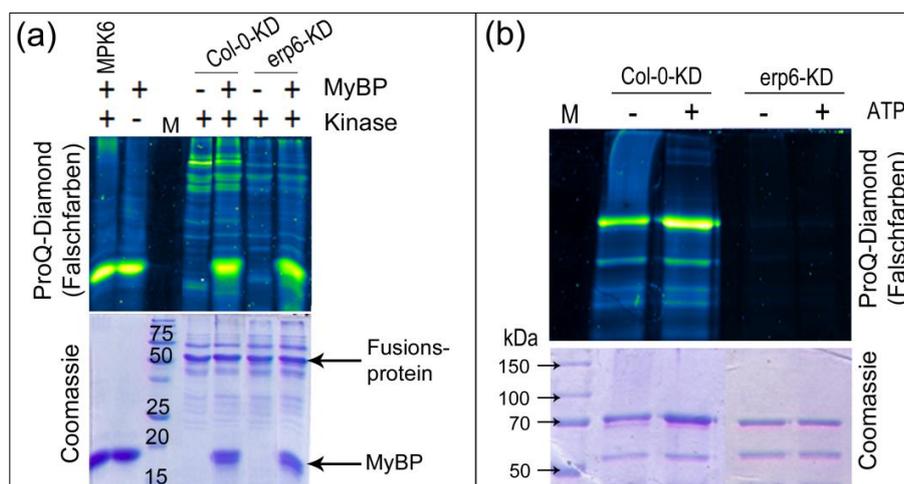


Abbildung 3.24: Untersuchung der Phosphorylierungsaktivität der EDR1-Kinasedomäne

(a) Nach Durchführung eines Kinaseassays mit Myelin Basic Protein (MyBP) als Substrat und MPK6 als Positivkontrolle wurde der Reaktionsansatz über SDS-PAGE (15 %-Gel) aufgetrennt und zur Visualisierung phosphorylierter Proteine mit Pro-Q Diamond gefärbt (oben). Angezeigt sind die zu erwartenden Proteinbanden des Fusionsproteins (~70 kDa) und des Substrates MyBP (~18 kDa). (b) Zur Analyse der Autophosphorylierung der Wildtyp- und mutierten EDR1-KD wurde im Anschluss an einen Kinaseassay der Reaktionsansatz mittels SDS-PAGE (10 %-Gel) aufgetrennt, und das Gel mit Pro-Q Diamond gefärbt (oben). Um die gleichmäßige Gelbelastung zu überprüfen, erfolgte eine Coomassiefärbung (a und b unten, M = Größenstandard [kDa]). Zwei Wiederholungen der Experimente erzielten ähnliche Resultate.

3.2.4.3 Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der EDR1-Kinasedomäne

Da bisher noch keine Erkenntnisse über Phosphorylierungsstellen in EDR1 bzw. der EDR1-KD bekannt sind, sollten mit Hilfe massenspektrometrischer Analysen mögliche Phosphorylierungsstellen identifiziert werden. In Abbildung 3.25 sind repräsentativ die in einem Experiment detektierten Phosphorylierungsstellen in der KD des Wildtyps und der Mutante schematisch dargestellt. Es fällt auf, dass in der mutierten KD eindeutig weniger Phosphorylierungsstellen identifiziert werden konnten als im Wildtyp. Abgesicherte quantitative Aussagen können nicht getroffen werden, da die drei durchgeführten Experimente zu variabel waren. Für die mutierte Form der KD konnte lediglich eine Phosphorylierung von S814 und T820 aber keiner weiteren Aminosäure beobachtet werden. Die KD aus dem Wildtyp wies hingegen in allen Experimenten eine deutlich höhere Anzahl von detektierten Phosphorylierungen auf. Anhand der Messungen kann jedoch eine semiquantitative Aussage getroffen werden, da die KD aus dem Wildtyp bedeutend mehr Spektren an Phosphopeptiden lieferte als die mutierte KD (siehe Anhang Tabelle 6.7). Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung aus der Pro-Q-Färbung (s.3.2.4.2), in der die KD aus *erp6* eine deutlich geringere Autophosphorylierung als der Wildtyp zeigte und belegen, dass der Austausch von Glycin zu Glutamat in der EDR1-KD zu einer reduzierten Kinaseaktivität führt. Inwiefern sich dieser Unterschied in den Phosphorylierungsstellen und der Autophosphorylierung auf die Funktion von *EDR1* auswirkt, kann hier nicht beurteilt werden. Für die Klärung dieser Frage sind zusätzliche Experimente erforderlich.

(a)	Col-0-KD (WT)	(b)	<i>erp6</i> -KD (mutiert)
669	L V I A E R I G L G S Y G E V Y H A D W H G T E V A V K K F L D Q D F S G A A L	669	L V I A E R I G L G S Y G E V Y H A D W H G T E V A V K K F L D Q D F S G A A L
709	A E F R S E V R I M R R L R H P N V V F F L G A V T R P P N L S I V T E F L P R	709	A E F R S E V R I M R R L R H P N V V F F L G A V T R P P N L S I V T E F L P R
749	G S L Y R I L H R P K S H I D E R R R I K M A L D V A M G M N C L H T S T P T I	749	G S L Y R I L H R P K S H I D E R R R I K M A L D V A M G M N C L H T S T P T I
789	V H R D L K T P N L L V D N N W N V K V G D F G L S R L K H N T F L S S K S T A	789	V H R D L K T P N L L V D N N W N V K V G D F G L S R L K H N T F L S S K S T A
829	G T P E W M A P E V L R N E P S N E K C D V Y S F G V I L W E L A T L R L P W R	829	G T P E W M A P E V L R N E P S N E K C D V Y S F E V I L W E L A T L R L P W R
869	G M N P M Q V V G A V G F Q N R R L E I P K E L D P V V G R I I L E C W Q T D F	869	G M N P M Q V V G A V G F Q N R R L E I P K E L D P V V G R I I L E C W Q T D F
909	N L R P S F A Q L T E V L K P L N R L V L P T P Q	909	N L R P S F A Q L T E V L K P L N R L V L P T P Q

Abbildung 3.25: Schematische Darstellung identifizierter Phosphorylierungsstellen in der Kinasedomäne von EDR1 aus Wildtyp und *erp6*-Mutante. Dargestellt sind die detektierten Phosphopeptide (grau unterlegt) aus der KD von Col-0 (a) und *erp6* (b) mit den identifizierten Phosphorylierungsstellen (rot markiert) aus einem Experiment. Die angegebene Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das native Protein. Gekennzeichnet ist zusätzlich die durch die *erp6*-Mutation veränderte Aminosäure (Fett und unterstrichen). In zwei weiteren Experimenten wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt.

3.2.4.4 Untersuchung der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression

Zur weiteren Charakterisierung der *erp6*-Mutante wurde nach einer Zeitkinetik mit *P. infestans* die Transkriptakkumulation der Abwehrgene *PR1* und *PDF1.2* untersucht. Nach Auswertung der zusammengefassten Daten aus drei unabhängigen Experimenten konnte weder konstitutiv noch nach *P. infestans*-Inokulation ein signifikanter Unterschied in der Transkriptakkumulation festgestellt werden (Abbildung 3.26). Für *erp6*, jedoch nicht für *edr1-1*

konnte eine leichte Erhöhung des *PDF1.2*-Transkriptes in unbehandelten und mit Wasser behandelten Pflanzen vermutet werden, jedoch war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Möglicherweise ist die Northern-Hybridisierung nicht für die Quantifizierung geringer Unterschiede in der Transkriptakkumulation geeignet, weshalb in zukünftigen Analysen die sensitivere quantitative Realtime-PCR verwendet werden sollte. Die konstitutive *PDF1.2*-Akkumulation in *erp6* scheint *PEN2*-abhängig zu sein, da sie für *pen2-1erp6* nicht beobachtet wurde. Die Kreuzung von *erp6* mit *pen2-2*, einem weiteren *pen2*-Allel, könnte Aufschluss darüber geben, ob eine Sekundärmutation in *pen2-1erp6* die möglicherweise erhöhte *PDF1.2*-Akkumulation von *erp6* unterdrückt.

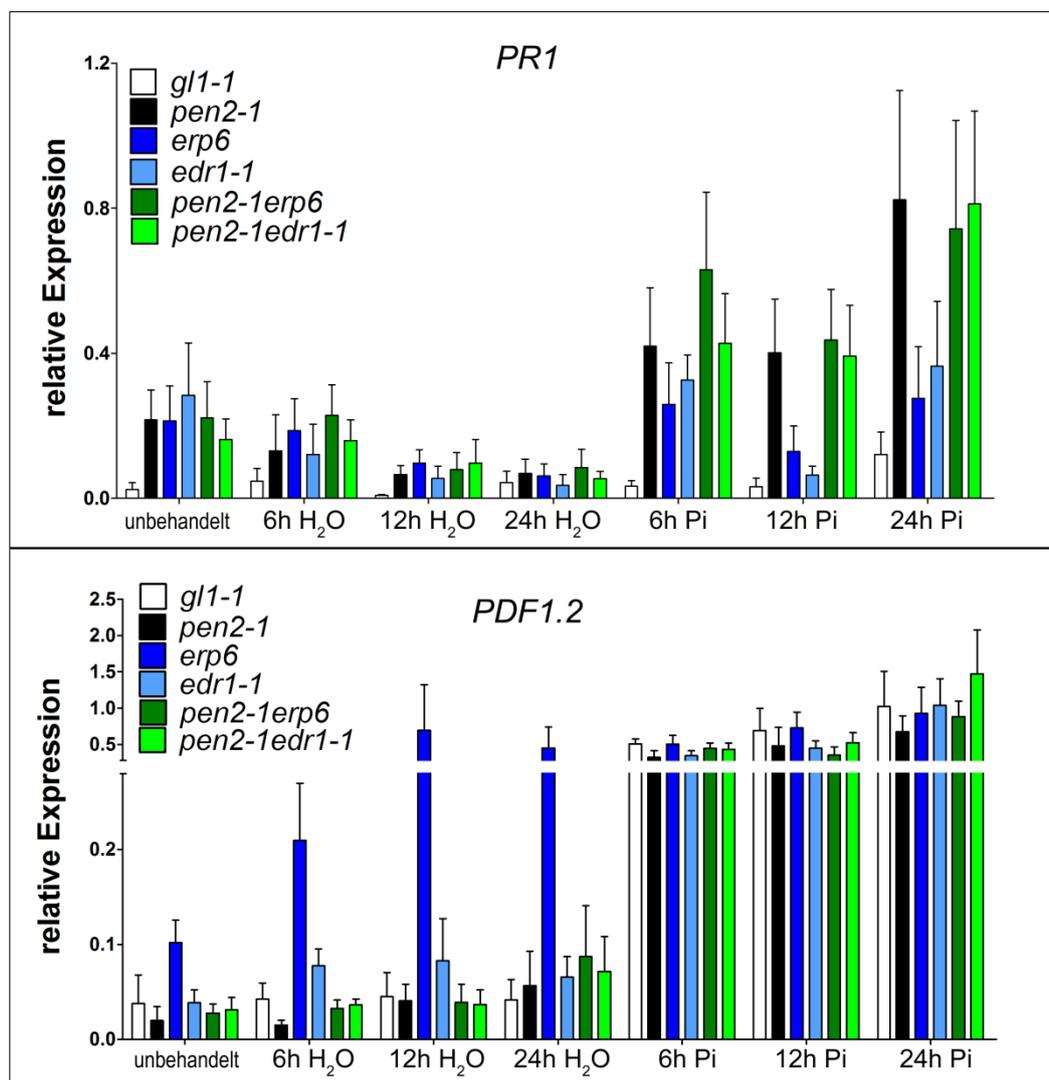


Abbildung 3.26: Relative Expression von *PR1* und *PDF1.2* nach *P. infestans*-Behandlung

Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert. Kontrollpflanzen wurden bis zur Tropfenbildung mit Wasser besprüht. Für die RNA-Isolierung wurde Material von unbehandelten Pflanzen sowie 6, 12 und 24 h nach *P. infestans*-Inokulation bzw. Wasserbehandlung geerntet. Nach anschließender Northern Blot-Analyse und der Hybridisierung mit einem radioaktiv markierten *PR1*- bzw. *PDF1.2*-Fragment erfolgte die quantitative Auswertung der Expression. Dazu wurden die Membranen zunächst mit einem rRNA-Fragment hybridisiert und das erhaltene Signal wurde anschließend zur Normalisierung herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler von drei zusammengefassten Experimenten ($n = 6$). Zum Vergleich der Werte je Zeitpunkt wurde eine 1-Wegs-ANOVA durchgeführt.

3.2.4.5 Salizylsäure-Abhängigkeit des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Behandlung

Für einige der *edr1-1*-vermittelten Phänotypen ist bekannt, dass sie SA-abhängig sind (Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). Um zu analysieren, ob die nach *P. infestans*-Inokulation beobachtete HR ebenfalls SA-abhängig ist, wurden Kreuzungen mit *sid2-1* durchgeführt, da diese Mutante unfähig ist, SA zu akkumulieren (Nawrath und Metraux, 1999). Zunächst waren die *erp6sid2-1*-, *edr1-1sid2-1*- sowie *pen2-1edr1-1sid2-1*-Linien nach Kreuzung von *pen2-1edr1-1* bzw. *pen2-1erp6* mit *sid2-1* unter Verwendung allelspezifischer CAPS-Marker selektiert worden. Daraufhin wurden zunächst *erp6sid2-1* und *edr1-1sid2-1* mit den entsprechenden Kontrollen mit einer hohen Konzentration von *P. infestans*-Sporen ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert. Wie in Abbildung 3.27a zu sehen, konnte die in *erp6* und *edr1-1* nach Trypanblaufärbung deutlich erkennbare HR durch *sid2-1* unterdrückt werden. Die quantitative Auswertung der relativen Intensitäten der Trypanblaufärbung bestätigte, dass die vorhandene Reaktion in *erp6* und *edr1-1* im Vergleich zu *gl1-1* signifikant erhöht war, während *erp6sid2-1* und *edr1-1sid2-1* sich nicht signifikant von den Kontrollen unterschieden (Abbildung 3.27b).

Für die Inokulation von *pen2-1edr1-1sid2-1* wurde eine geringere Sporenkonzentration eingesetzt ($5 \cdot 10^4$ Sporen/ml) um eine bessere Unterscheidung der HR zu ermöglichen. Bei den zwei unabhängigen *pen2-1edr1-1sid2-1*-Linien (#48 und #57) lag nach Inokulation mit *P. infestans* eine Abschwächung der HR im Vergleich zu *pen2-1edr1-1* vor (Abbildung 3.27c). Wie aus Abbildung 3.27d ersichtlich, wurde die Ausprägung der HR signifikant auf das Level der *edr1-1*-HR und nicht auf die Stärke der *pen2-1*-Reaktion reduziert. Letzteres wäre jedoch zu erwarten gewesen, da die *edr1-1*-HR durch *sid2-1* vollkommen unterdrückt werden kann (Abbildung 3.27a/b). Damit würde die in *pen2-1edr1-1sid2-1* beobachtete HR eine verringerte *pen2-1*-HR darstellen. Inwiefern die in *pen2-1* beobachtete HR-Ausprägung SA-abhängig ist, kann derzeit nicht abschließend beurteilt werden. Zwar wurden bereits *pen2-1sid2-1*-Linien erzeugt, diese standen jedoch erst nach den oben beschriebenen Experimenten zur Verfügung. Einen ersten Hinweis auf eine teilweise Unterdrückung der *pen2-1*-HR durch *sid2-1* lieferten Trypanblau-gefärbte Blätter von *pen2-1sid2-1*-F2-Pflanzen, die mit Hilfe allelspezifischer PCR-Marker aus verschiedenen Kreuzungen selektiert und anschließend inokuliert worden waren. Inzwischen liegt das Saatgut dieser Einzelpflanzen vor, so dass eine umfangreichere Pflanzenzahl getestet werden kann. Dabei ist möglicherweise angebracht, eine Sporenkonzentration von $2 \cdot 10^4$ Sporen/ml zu verwenden, um eine bessere Differenzierung der HR zu erreichen. Zudem könnten nun auch Untersuchungen mit der *pen2-1erp6sid2-1*-Dreifachmutante durchgeführt werden, die erst im späteren Verlauf der Genotypisierung selektiert werden konnten.

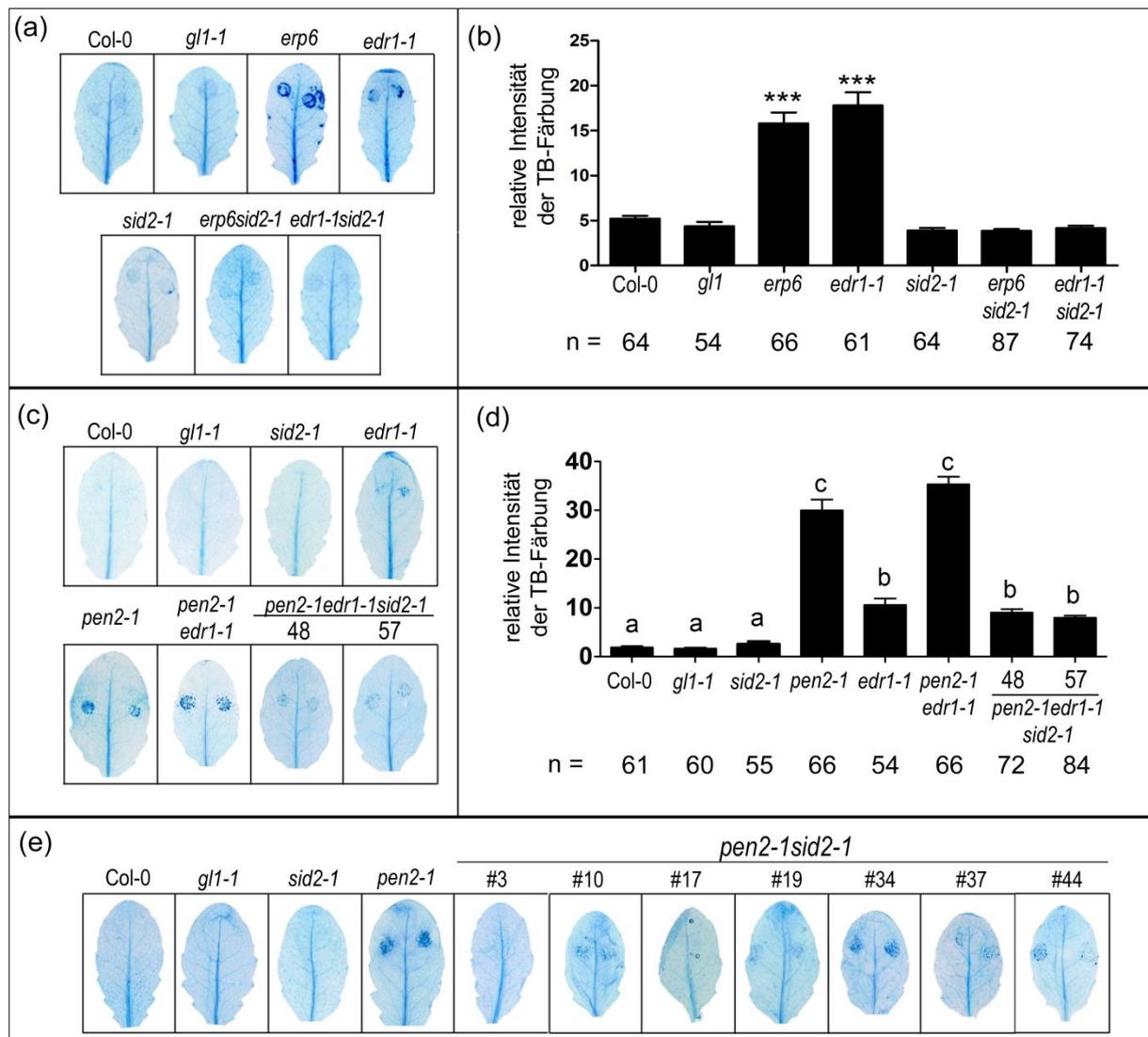


Abbildung 3.27: Salizylsäure-Abhängigkeit der HR nach *P. infestans*-Inokulation

Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit $5 \cdot 10^5$ Sporen/ml (a) oder $5 \cdot 10^4$ Sporen/ml (c, e) einer *P. infestans*-Zoosporensuspension inokuliert. Nach drei Tagen wurden inokulierte Blätter geerntet und einer Trypanblau (TB)-Färbung unterzogen. Die in (a) und (c) abgebildeten Blätter sind repräsentativ für ein Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. (b) und (d) zeigen die relative Intensität der TB-Färbung von Blättern wie in (a) bzw. (c). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus je drei zusammengefassten Experimenten. Die Stichprobenmenge (n) ist unterhalb der jeweiligen Balken dargestellt. (b): *** zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle *gl1-1* an (1-Wegs-ANOVA, $p < 0,001$). (d) Unterschiedliche Buchstaben zeigen verschiedene Signifikanzklassen (1-Wegs-ANOVA). (e): Aus verschiedenen Kreuzungen wurden sieben F2-Pflanzen selektiert, die Mutationen in *PEN2* und *SID2* aufwiesen. Diese Pflanzen wurden mit *P. infestans* inokuliert und nach drei Tagen mit Trypanblau gefärbt. Die abgebildeten Blätter sind repräsentativ für ein Experiment mit insgesamt 5-8 Blättern pro Genotyp.

Somit wurde der Nachweis erbracht, dass die bei *erp6* und *edr1-1* nach *P. infestans*-Inokulation beobachtete HR SA-abhängig ist. Die HR von *pen2-1edr1-1* wird durch *sid2-1* nur teilweise unterdrückt. Durch zusätzliche Experimente ist zu klären, ob der *pen2-1*-Anteil an der *pen2-1edr1-1*-Reaktion vollkommen oder nur teilweise SA-abhängig ist.

3.2.5 Untersuchungen zur Funktion von EDR1

3.2.5.1 Analyse potentieller EDR1-Substrate

Da EDR1 als putative MAPKKK annotiert ist, stellen MKKs potentielle Substrate dar. Aus diesem Grund wurde in zwei verschiedenen Kinaseassays untersucht, ob die EDR1-KD aus Col-0 in der Lage ist, MKKs in einer Kinase-inaktiven Variante zu phosphorylieren. Dazu wurden zunächst die kodierenden Bereiche von MKK1 bis MKK10 aus *A. thaliana* in den Vektor pCR2.1 (MKK1 bis MKK5, MKK9, MKK10; Tino Unthan, IPB Halle) bzw. pCR8 (MKK6, MKK7 und MKK8) kloniert. Nach sequenzspezifischer Mutagenese der ATP-Bindestelle (für MKK1 bis MKK5, MKK9, MKK10 von Tino Unthan, IPB Halle, durchgeführt) und Umklonierung der Konstrukte in den Expressionsvektor pDEST15 erfolgte die Überexpression der MKK-Proteine in *E. coli*. Die anschließende Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass alle zehn MKKs in der richtigen Größe exprimiert wurden (Abbildung 3.28).

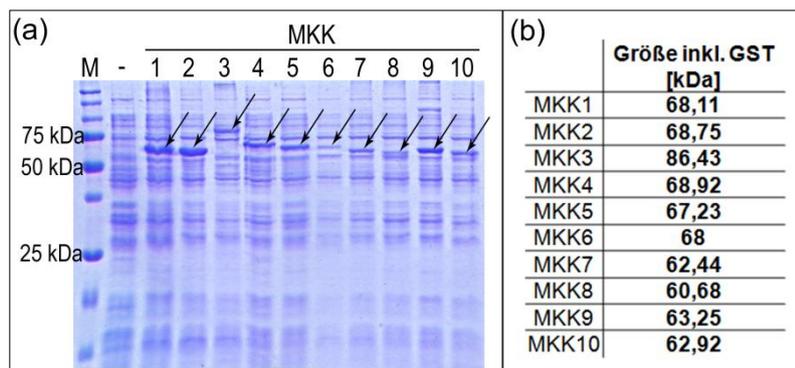


Abbildung 3.28: Überexpression der Arabidopsis-MKKs in *E. coli*

Die Arabidopsis MKKs (1-10) wurden rekombinant in *E. coli* exprimiert. Zur Kontrolle wurden die Rohextrakte nach der Expression mittels SDS-PAGE (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]) analysiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde eine Coomassiefärbung durchgeführt (a; - = vor Induktion). Pfeile zeigen die richtigen Proteine entsprechend der zu erwartenden Größe (b) an. GST = Glutathion-S-Transferase

Als putative Positivkontrolle für die folgenden Analysen wurde die MAPKKK MEKK1 ebenfalls überexprimiert. Der Vektor pDEST15 ermöglichte eine Aufreinigung der Proteine über den N-terminalen GST-Tag. Die Elution der Proteine von der Glutathionsepharose erfolgte nacheinander mit vier Elutionspuffern mit zunehmender Glutathion-Konzentration. Je verwendetem Puffer wurde eine Elutionsfraktion gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 3.29 ist repräsentativ die Aufreinigung von MKK1 bis MKK4 dargestellt, eine ausführliche Darstellung der Aufreinigung der restlichen MKKs und MEKK1 befindet sich im Anhang (Abbildung 6.6). Die beste Elution bei allen MKKs konnte mit dem vierten Elutionspuffer (mit 200 mM reduziertem Glutathion) erreicht werden, weshalb in den anschließenden Kinaseassays jeweils die Fraktion E4 eingesetzt wurde. Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte

zudem, dass der Großteil der Fusionsproteine auf der Sepharose verblieb, obwohl bereits eine relativ hohe Konzentration an Glutathion eingesetzt worden war.

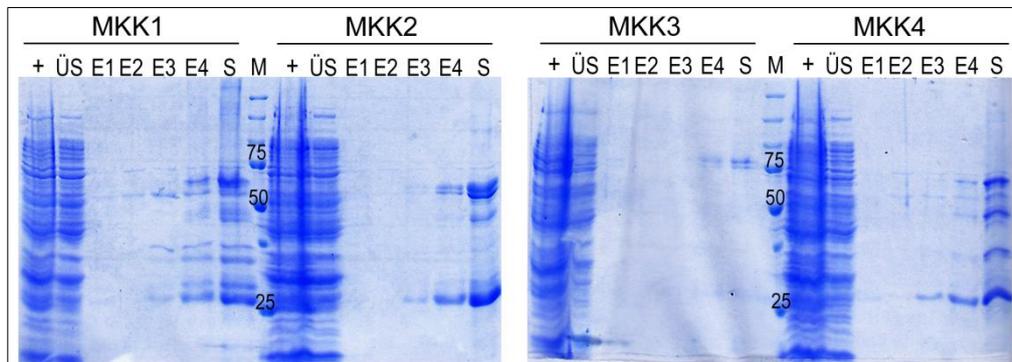


Abbildung 3.29: Aufreinigung von MKK1 bis MKK4

Nach der rekombinanten Expression der MKKs in *E. coli* folgte die Proteinextraktion und -aufreinigung. Während der Expression und des Aufreinigungsprozesses wurden Proben entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]) und anschließender Coomassiefärbung analysiert. + = induziert; ÜS = Überstand; E1-E4 = Elutionsfraktionen; S = Sepharose); aus Platzgründen sind nur die SDS-Gele für MKK1 bis MKK4 dargestellt, eine ausführliche Darstellung der übrigen MKK-Proteine ist im Anhang in Abbildung 6.6 aufgeführt.

Anschließend wurde in einem Kinaseassay mit radioaktiv markiertem ATP getestet, ob durch Inkubation der einzelnen MKK zusammen mit der Wildtyp-EDR1-KD eine *de novo*-Phosphorylierung nachgewiesen werden kann. Wie in dem Autoradiogramm in Abbildung 3.30 ersichtlich, konnte in jedem Reaktionsansatz ein Signal beobachtet werden. Der Vergleich mit dem Coomassie-gefärbten Gel zeigte, dass dieses Signal der EDR1-KD selbst, aber keiner MKK zugeordnet werden konnte und somit die Autophosphorylierung der KD widerspiegelt. Für MKK1, 2, 4 und 5 wurde MEKK1 als putative Positivkontrolle mitgeführt, allerdings konnte auch hier keine Phosphorylierung beobachtet werden.

Die Ergebnisse des radioaktiven Kinaseassays deuten darauf hin, dass die MKKs keine Substrate der EDR1-KD darstellen. Weiterhin kam es bei der Interaktion von MKK1, 2, 4 und 5 mit MEKK1 nicht zur Phosphorylierung der MKKs, weshalb MEKK1 im verwendeten Ansatz vermutlich nicht als Positivkontrolle geeignet ist.

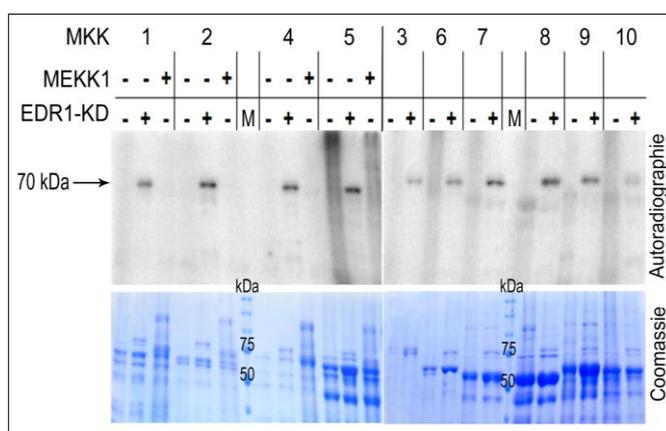


Abbildung 3.30: Analyse putativer EDR1-Substrate im radioaktiven Kinaseassay

Die Reaktionsansätze des radioaktiven Kinaseassays mit der Wildtyp EDR1-Kinasedomäne und MKK1 bis MKK10 als Substrat wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]). Nach der Coomassie-Färbung (unten) wurde das Gel getrocknet, auf einen Phosphorscreen aufgelegt und nach 1-2 Tagen mit einem PhosphorImager eingelese (oben). Im Autoradiogramm ist die Größe des Fusionsproteins angezeigt. Das Experiment erzielte in der Wiederholung vergleichbare Ergebnisse.

Nach Durchführung eines Kinaseassays, bei dem jede MKK mit der Wildtyp-EDR1-KD sowie mit und ohne ATP inkubiert wurde, erfolgte eine Pro-Q Diamond-Färbung zur Analyse des Phosphorylierungsstatus der Proteine (Abbildung 3.31). Analog zu dem radioaktiven Kinaseassay konnte auch hier keine Phosphorylierung der MKKs nach Inkubation mit der EDR1-KD beobachtet werden. Das in jedem Ansatz vorhandene Signal ist erneut auf die Autophosphorylierung der KD zurückzuführen. Weiterhin wurde ersichtlich, dass MEKK1 eine Autophosphorylierung aufwies, wodurch eine Aussage über eine Phosphorylierung von MKK1, 2, 4 und 5 durch MEKK1 nur schwer möglich ist, da es eventuell zur Überlagerung der Fluoreszenzsignale kam. Eventuell verhinderte eine unzureichende Aufreinigung von MEKK1 die Phosphorylierung der MKKs, weshalb in zukünftigen Untersuchungen dieser Schritt zu optimieren wäre.

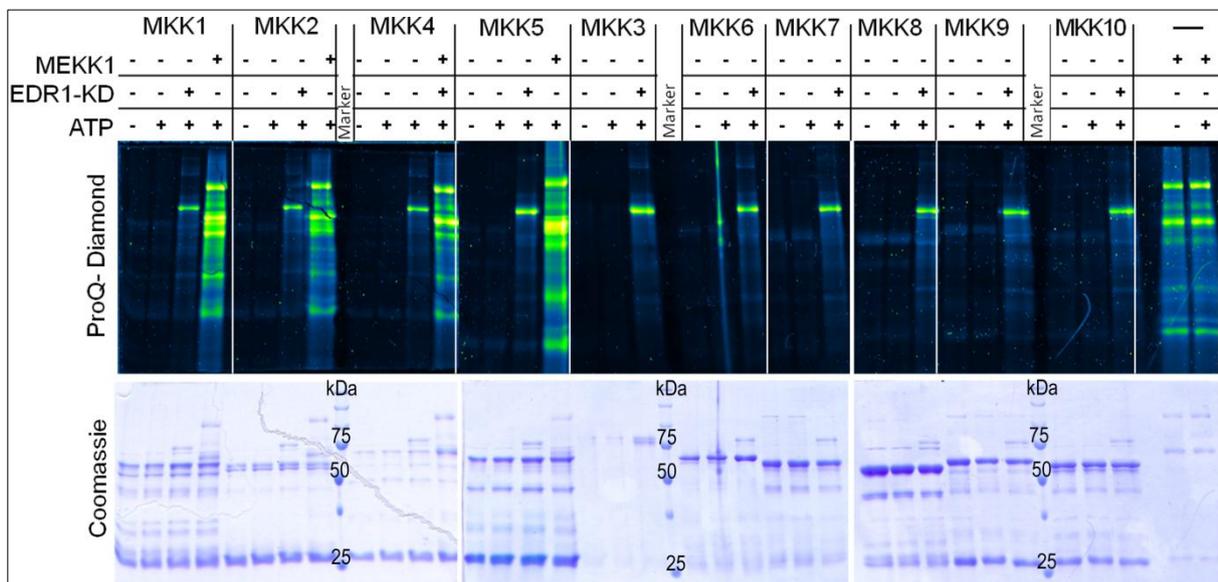


Abbildung 3.31: Analyse putativer EDR1-Substrate nach Pro-Q Diamond-Färbung

Nach Durchführung eines Kinaseassays mit der Wildtyp EDR1-KD und MKK1 bis MKK10 als putatives Substrat wurden die Reaktionsansätze mittels SDS-PAGE (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]) aufgetrennt und zur Visualisierung phosphorylierter Proteine einer Pro-Q Diamond-Färbung unterzogen (oben). Um eine gleichmäßige Gelbeladung zu überprüfen, erfolgte eine Coomassiefärbung (unten). Die Wiederholung des Experiments erzielte ähnliche Ergebnisse.

3.2.5.2 Bedeutung von EDR1 für die Immunantwort auf PAMPs

Eine Mitwirkung von EDR1 an PAMP-induzierten Signaltransduktionswegen ist bisher nicht bekannt. Deshalb wurde eine mögliche Beteiligung von EDR1 in der Signaltransduktion infolge der Behandlung mit den bakteriellen PAMPs flg22 und elf18 überprüft.

Als Antwort auf die Behandlung mit diesen PAMPs reagieren Pflanzen u. a. mit einer Inhibierung des Wurzelwachstums und Reduktion des Frischgewichtes (Gómez-Gómez *et al.*, 1999). Es wurde untersucht, wie sich das Wurzelwachstum von *edr1*-Mutanten nach Behandlung mit verschiedenen flg22-Mengen verändert. Wie aus Abbildung 3.32 hervorgeht, konnte

bei unbehandelten Pflanzen kein Unterschied im Wurzelwachstum von *erp6*, *edr1-1* und *edr1-2 #3* im Vergleich zu Col-0 festgestellt werden. Die Applikation von 1 μM flg22 führte zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums, welche bei allen *edr1*-Mutanten jedoch signifikant stärker als bei Col-0 war (Abbildung 3.32a). Dieser Effekt konnte für *erp6* und *edr1-2 #3* auch bei der Behandlung mit 10 μM flg22 beobachtet werden, jedoch war hier kein signifikanter Unterschied zwischen *edr1-1* und Col-0 zu verzeichnen.

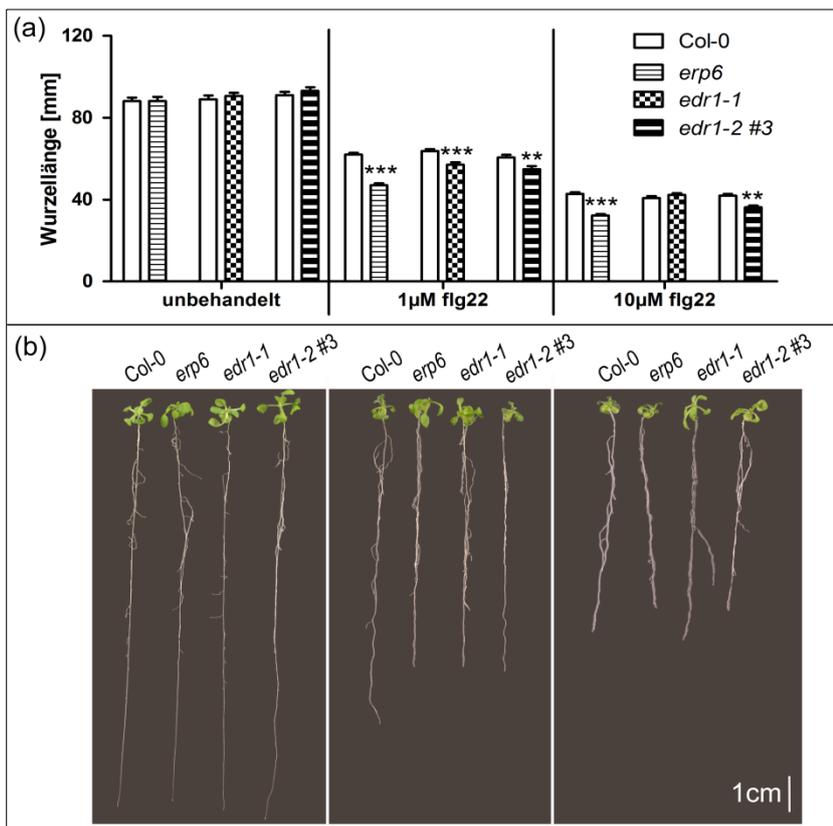


Abbildung 3.32: Wurzellänge von Arabidopsiskeimlingen nach flg22-Applikation. Samen wurden auf ATS-Platten zur Keimung gebracht und nach 5 Tagen auf ATS-Platten ohne (unbehandelt) oder mit 1 μM bzw. 10 μM flg22 transferiert. Nach weiteren 9 Tagen wurde die Wurzellänge aller Keimlinge bestimmt. (a) Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardfehler aus drei zusammengefassten Experimenten ($n = 72$). Sternchen zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle Col-0 an (2-Wegs-ANOVA, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$). (b) Die abgebildeten Keimlinge sind repräsentativ für ein Experiment mit je 12 Keimlingen pro Genotyp pro Behandlung.

Neben flg22 wurde auch eine mögliche Beteiligung der EDR1-KD an der elf18-Signaltransduktion überprüft. Die Applikation von elf18 führt zwar ebenfalls zu einer Inhibierung des Wurzelwachstums (Zipfel *et al.*, 2006; Ranf *et al.*, 2011), jedoch ist die Untersuchung des Keimlingfrischgewichtes nach elf18-Applikation besser geeignet um mögliche Unterschiede zu detektieren (Ranf *et al.* (2012), persönliche Kommunikation Dr. S. Ranf, IPB Halle). Keimlinge wurden mit elf18 behandelt und nach 13 Tagen das Frischgewicht bestimmt. Während unbehandelte Pflanzen sich nicht in ihrem Keimlingsfrischgewicht unterschieden, führte die Applikation von 100 nmol elf18 zu einer drastischen Reduktion des Frischgewichtes. Diese war in *erp6*, *edr1-1* und *edr1-2 #3* im Vergleich zu Col-0 signifikant stärker (Abbildung 3.33).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass EDR1 möglicherweise an der Signaltransduktion in Folge von flg22- und elf18-Applikation beteiligt ist, da alle *edr1*-Mutanten im Vergleich zu Col-0 sensitiver auf diese PAMPs reagierten. Jedoch wurde bisher nur eine späte zelluläre

Antwort nach PAMP-Behandlung untersucht. Um eine genauere Einordnung von EDR1 in der Signaltransduktionskaskade vornehmen zu können, müssten auch frühe Antworten wie z. B. die Aktivierung von MAPK-Kaskaden oder bestimmter Abwehrgene analysiert werden.

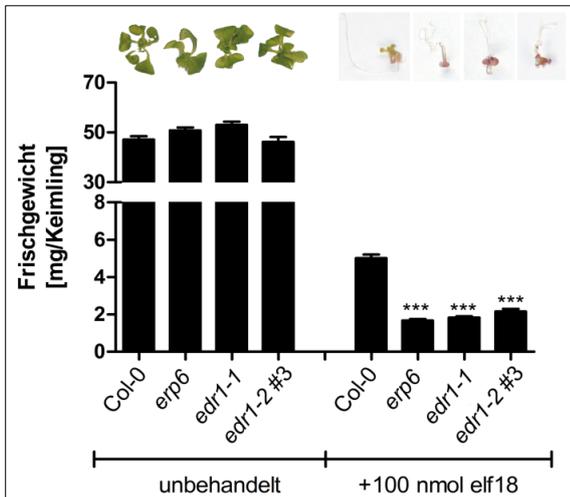


Abbildung 3.33: Keimlingsfrischgewicht nach elf18-Applikation. Nach Keimung auf ATS-Platten wurden 5 Tage alte Keimlinge in 24-Well-Platten in Flüssigmedium ohne (unbehandelt) bzw. mit 100 nmol elf18 transferiert. Nach 13 Tagen wurde das Frischgewicht der einzelnen Pflanzen bestimmt. Die Balken stellen die Mittelwerte und Standardfehler aus drei vereinten Experimenten ($n = 72$) dar. ***zeigt signifikante Unterschiede zur jeweiligen Kontrolle (Col-0 behandelt/unbehandelt) entsprechend einer 1-Wege-ANOVA ($p < 0,001$). Oberhalb der Säulen sind repräsentative Keimlinge aus einem Experiment mit je 12 Keimlingen pro Genotyp pro Behandlung abgebildet.

3.2.5.3 Bakterien-Wachstumsassay mit *Pto* DC3000

Die *edr1-1*-Mutante weist eine SA-abhängige erhöhte Resistenz gegen das biotrophe adaptierte Pathogen *Pto* DC3000 auf (Frye und Innes, 1998). Das Vorliegen einer erhöhten Resistenz sollte auch für die Mutanten *erp6* und *edr1-2 #3* überprüft werden. Um die SA-Abhängigkeit zu analysieren, wurden die bereits unter 3.2.4.5 beschriebenen *edr1-1sid2-1* und *erp6sid2-1*-Pflanzen verwendet. In vier unabhängigen Experimenten wurde das Pflanzenmaterial mit einer Suspension von *Pto* DC3000 besprüht und nach vier Tagen das Pathogenwachstum bestimmt. Sowohl in den vier Einzelerperimenten als auch bei der Auswertung der zusammengefassten Daten konnte die Tendenz beobachtet werden, dass *edr1-1*, *erp6* und *edr1-2 #3* ein verringertes Bakterienwachstum und damit eine höhere Resistenz gegen *Pto* DC3000 im Vergleich zu den Kontrollen Col-0 bzw. *gl1-1* aufwiesen. Dieser Phänotyp schien SA-abhängig zu sein, da die Verringerung des Pathogenwachstums in *edr1-1sid2-1* und *erp6sid2-1* aufgehoben wurde (Abbildung 3.34). Diese Beobachtungen waren nicht statistisch signifikant, was möglicherweise auf der hohen biologischen Variabilität beruht, weshalb für zukünftige quantitative Analysen größere Stichprobenumfänge zu empfehlen sind. Eine hohe Variabilität dieses Phänotyps beobachteten auch Frye und Innes (1998). Die Autoren berichten, dass die erhöhte Resistenz nur bei gestressten und nicht bei ungestressten Pflanzen auftrat. Wawrzynska *et al.* (2008) spekulieren, dass die Resistenz von *edr1-1* gegen *Pto* DC3000 indirekt durch die Resistenz der Mutante gegen abiotischen Stress, wie z. B. Trockenstress, ausgelöst wird und dass Pflanzen, die ein verringertes Wachstum des Pathogens aufweisen, vor Inokulation bereits einem abiotischen Stress ausgesetzt waren.

Obwohl die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Pflanzen unter kontrollierten Bedingungen angezogen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine leicht ungleichmäßige Bewässerung eine unterschiedlich starke Ausprägung abiotischen Stresses und als Folge davon ein variables Bakterienwachstum in den inokulierten Pflanzen verursacht hat.

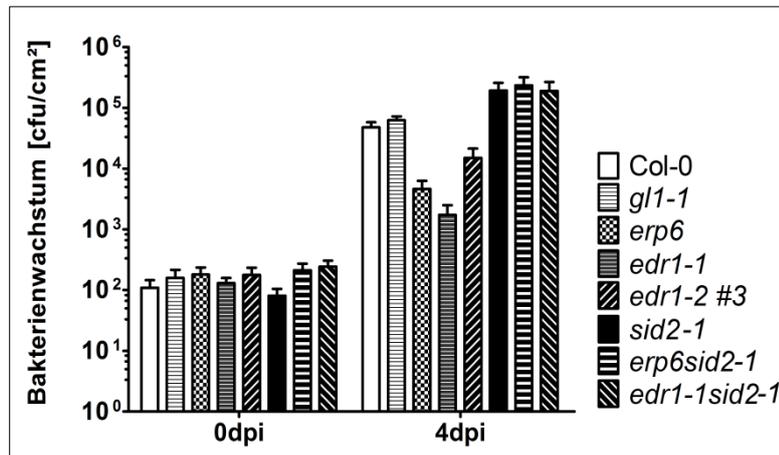


Abbildung 3.34: Wachstum des Bakterienstammes *Pto* DC3000

Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension ($5 \cdot 10^8$ koloniebildende Einheiten [cfu/ml]) von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 besprüht, nach 4 Tagen geerntet und aufgearbeitet. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (n = 12) aus vier zusammengefassten Experimenten. Eine 2-Wegs-ANOVA wurde durchgeführt um mögliche signifikante Unterschiede zu ermitteln.

3.2.5.4 Rolle von EDR1 in der prä-invasiven Resistenz gegen *P. infestans*

In der Interaktion von *A. thaliana* mit dem nicht-adaptierten Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* scheint *EDR1* an der prä-invasiven Resistenz beteiligt zu sein, da in *edr1-1*-Mutanten eine erhöhte Penetration des Pilzes beobachtet werden kann (Hiruma *et al.*, 2011). Um zu analysieren, ob *EDR1* auch für die Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* von Bedeutung ist, wurden in zwei unabhängigen Experimenten Pflanzen mit einer geringen Konzentration von *P. infestans*-Sporen ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert, und nach Trypanblaufärbung der Blätter wurde die Anzahl toter Epidermiszellen erfasst. Wie in Abbildung 3.35 zu erkennen, zeigte weder *erp6* noch *edr1-1* sondern nur *pen2-1* eine im Vergleich zur Kontrolle *gl1-1* signifikant erhöhte Anzahl toter Epidermiszellen. Damit scheint *EDR1* anders als bei der Interaktion mit *C. gloeosporioides* in der Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* keine Rolle zu spielen.

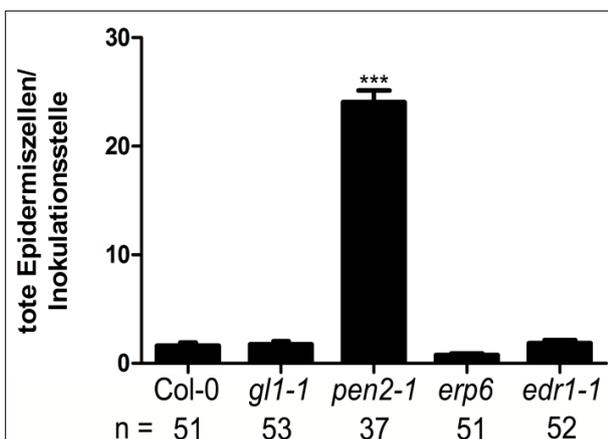


Abbildung 3.35: Anzahl toter Epidermiszellen in Blättern von *erp6* und *edr1-1* nach *P. infestans*-Inokulation.

Blätter fünf Wochen alter Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporen-suspension ($2 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und nach drei Tagen einer Trypanblaufärbung unterzogen. Die Auszählung toter Epidermiszellen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei zusammengefassten Experimenten. Die Anzahl ausgewerteter Inokulationsstellen (n) ist unterhalb der jeweiligen Balken dargestellt. *** zeigen signifikante Unterschiede zur Kontrolle *gl1-1* (1-Wegs-ANOVA, $p < 0,001$).

4. Diskussion

Bei Arabidopsis nimmt die putative MPKKK EDR1 eine bedeutende Stellung in der Abwehrantwort gegen ein breites Spektrum von Pathogenen ein. Unter anderem fungiert diese Kinase in der Interaktion mit den biotrophen adaptierten Pathogenen *G. cichoracearum* und *H. arabidopsisdis* als Negativregulator für Zelltod, Seneszenz und Pathogen-induzierte Calloseablagerung (Frye und Innes, 1998; Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Xiao *et al.*, 2005; van Hulst *et al.*, 2006; Pan *et al.*, 2012). Weiterhin erbrachten Hiruma *et al.* (2011) den Nachweis, dass EDR1 als positiver Regulator von Defensinen an der Nichtwirts-Interaktion von *A. thaliana* mit dem hemibiotrophen Pathogen *C. gloeosporioides* beteiligt ist und dort in der prä-invasiven Abwehr wirkt. Obgleich bereits mehrere Komponenten der EDR1-vermittelten Reaktionen identifiziert werden konnten (Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005; Wawrzynska *et al.*, 2008; Wawrzynska *et al.*, 2010; Gu und Innes, 2011; Pan *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2012), wurden bisher keine Substrate dieser Kinase nachgewiesen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde *erp6* als ein neues Allel von *EDR1* identifiziert und charakterisiert. Die durchgeführten Analysen legen eine Beteiligung von EDR1 in der Interaktion von Arabidopsis gegen den nicht-adaptierten Oomyceten *P. infestans* nahe.

4.1 Bedeutung von EDR1 in der Interaktion von *A. thaliana* mit dem nicht-adaptierten Pathogen *P. infestans*

Es wird davon ausgegangen, dass sich die Nichtwirtsresistenz aus mehreren Ebenen zusammensetzt und aufgrund der synergistischen und/oder additiven Wirkung der verschiedenen Komponenten eine sehr stabile Form der Resistenz darstellt (Heath, 1996, 2000). Im Hinblick auf die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *P. infestans* stellen PEN2 und PEN3 wichtige Komponenten der ersten Abwehrebene dar, was sich in einer deutlich erhöhten Penetrationsfrequenz des Pathogens auf *pen2*- bzw. *pen3*-Mutanten widerspiegelt (Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). Weitere Faktoren, die neben PEN2 und PEN3 zur Aufrechterhaltung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beitragen, sind bisher unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei verschiedene *edr1*-Mutanten auf *P. infestans* mit der Ausprägung einer hypersensitiven Reaktion reagieren (Abbildung 3.15). Diese HR ist durch einen stark ausgeprägten Mesophyllzelltod charakterisiert, der mit der Ablagerung von Callose einhergeht (Abbildung 3.18). Eine der untersuchten Mutanten ist die *erp6*-Mutante, die nach EMS-Mutagenese von *pen2-1* isoliert wurde und sich durch einen Aminosäureaustausch in der Kinase-Domäne des EDR1-Proteins auszeichnet (Abbildung 3.14c). Die anderen beiden Mutanten sind Nullmutanten, deren Allele *edr1-1* und *edr1-2* ein Stop-Codon bzw. eine T-DNA-Insertion im Exon 4 aufweisen (Abbildung 3.14b, Frye *et al.* 2001).

Die Beteiligung von EDR1 an Abwehrreaktionen von Arabidopsis gegen nicht-adaptierte Pathogene wurde bisher am ausführlichsten für die Interaktion von *A. thaliana* mit dem hemibiotrophen Pilz *C. gloeosporioides* beschrieben (siehe Tabelle 1.1). Die *edr1-1*-Mutante weist nach Inokulation mit *C. gloeosporioides* eine erhöhte Penetrationshäufigkeit des Pilzes auf und ordnet EDR1 damit in der prä-invasiven Abwehr gegen dieses Pathogen ein (Hiruma *et al.*, 2011). Die Autoren untersuchten zudem die Reaktion der *edr1-1*-Mutante auf die ebenfalls nicht-adaptierten Pilze *C. orbiculare* und *E. pisi*, konnten jedoch keine Beteiligung von EDR1 an der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen diese Pathogene feststellen. Weiterhin wurden in dieser Studie Experimente mit dem adaptierten Pilz *C. higginsianum* durchgeführt. Im Vergleich zu Col-0 wurde bei *edr1-1* eine höhere Penetrationshäufigkeit beobachtet, während die spätere Entwicklung der Krankheitssymptome vergleichbar verlief. Demnach scheint EDR1 in der basalen Resistenz gegen dieses adaptierte Pathogen eine Rolle zu spielen, und zwar ebenfalls in der Abwehr von Penetration (Hiruma *et al.* 2011).

Ein weiterer Hinweis auf die Beteiligung von EDR1 in Nichtwirts-Interaktionen kann aus einer Veröffentlichung von Zimmerli *et al.* (2004) erhalten werden. Die Autoren berichteten, dass die *edr1-1*-Mutante nach Inokulation mit dem nicht-adaptierten Pilz *Bgh* einen erhöhten Zelltod im Vergleich zum Wildtyp aufwies. Es wird jedoch leider nicht erwähnt, ob eine Veränderung der Penetrationsresistenz vorlag und in welcher Zellschicht die Zelltodreaktion auftrat bzw. ob diese mit Calloseablagerungen verbunden war.

In den im Abschnitt 3.2.5.4 erläuterten Experimenten wurde analysiert, ob EDR1 auch für die prä-invasive Abwehr von *A. thaliana* gegen *P. infestans* von Bedeutung ist. Um die Penetrationshäufigkeit zu beurteilen, erfolgte die Auszählung toter Epidermiszellen in Trypanblau-gefärbten Blättern nach Inokulation mit *Phytophthora*. Die *edr1*-Mutanten *erp6* und *edr1-1* wiesen im Vergleich zu den Kontrollen *gl1-1* bzw. Col-0 keine erhöhte Anzahl toter Epidermiszellen auf (Abbildung 3.35), so dass eine Mitwirkung von EDR1 an der Ausprägung der Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* unwahrscheinlich ist. Die erfolgreiche Durchführung des Experiments wurde durch die signifikant erhöhte Anzahl toter Epidermiszellen der Penetrationsmutante *pen2-1* bestätigt. Die Myrosinase PEN2 ist an der prä-invasiven Resistenzausprägung gegen ein breites Pathogenspektrum beteiligt und in der *pen2-1*-Mutante kann sowohl für biotrophe, hemibiotrophe als auch nekrotrophe Pathogene eine erhöhte Penetrationshäufigkeit beobachtet werden (Lipka *et al.*, 2005; Hiruma *et al.*, 2011). Die bisher über EDR1 zur Verfügung stehende Literatur und die *P. infestans*-Experimente der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass es sich bei der EDR1-vermittelten Penetrationsresistenz um einen spezifischen Mechanismus handelt, der lediglich für die prä-invasive Abwehr einiger Vertreter der Spezies *Colletotrichum* wichtig ist, die jedoch adaptierte (*C. higginsianum*) und nicht adaptierte Pathogene (*C. gloeosporioides*)

umfassen. Damit würde sich EDR1 als Komponente der Penetrationsabwehr deutlich von PEN2 unterscheiden.

Die in Kapitel 3.2.3.3 beschriebene Zelltodreaktion und Calloseablagerung im Mesophyll von *edr1*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation lässt eine Beteiligung von EDR1 an post-invasiven Abwehrmechanismen vermuten. Im Rahmen von mikroskopischen Untersuchungen konnte jedoch kein Unterschied hinsichtlich der von *P. infestans* ausgebildeten Strukturen auf *edr1-1* und *erp6*-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen Col-0 bzw. *gl1-1* beobachtet werden. Dabei beschränkte sich das Wachstum der Hyphen-artigen Strukturen von *P. infestans* auf die Blattoberfläche und konnte zu keiner Zeit im Bereich des Mesophylls beobachtet werden.

Hinsichtlich der Interaktion von Arabidopsis mit nicht-adaptierten Pathogenen wird in mehreren Publikationen darüber berichtet, dass erst durch Kombination mehrerer Mutationen die Nichtwirtsresistenz zu beeinträchtigen bzw. zu durchbrechen ist. Lipka *et al.* (2005) konnten für die Arabidopsis-Einzelmutanten *eds1*, *pad4* und *sag101* keine deutliche Veränderung im Wachstum des nicht-adaptierten Pathogens *Bgh* beobachten. Die *pad4sag101*-Doppelmutante wies zwar keine erhöhte Penetration, aber ein vermehrtes Pathogenwachstum von *Bgh* verglichen mit den Einzelmutanten auf. Wurde die *sag101*-, *eds1*- oder *pad4*- mit der *pen2-1*-Mutation kombiniert, kam zu der erhöhten Penetrationshäufigkeit von *pen2-1* ein leicht höheres Pathogenwachstum hinzu, doch erst in der *pen2-1pad4sag101*-Dreifachmutante konnte das Pathogen seinen kompletten Lebenszyklus durchlaufen und es kam zur Sporulation, d. h. die Nichtwirtsresistenz war durchbrochen (Lipka *et al.* 2005). Aufgrund dieser Beobachtungen ordnen die Autoren EDS1, PAD4 und SAG101 der post-invasiven Abwehr von *Bgh* zu und vermuten zudem eine redundante Wirkung von PAD4 und SAG101. Bei diesen drei Komponenten handelt es sich um Lipase-ähnliche Proteine, die durch Zusammenwirkung die SA-abhängige systemische Resistenz bei Pflanzen induzieren können und wichtige Bestandteile sowohl der basalen Abwehr von virulenten biotrophen Pathogenen als auch der TIR-NB-LRR-vermittelten ETI darstellen (Rietz *et al.* 2011).

Untersuchungen mit *A. thaliana* und dem nicht-adaptierten hemibiotrophen Reis-Pathogen *Magnaporthe oryzae* belegen ebenfalls die Mehrschichtigkeit von Nichtwirtsresistenz. Maeda *et al.* (2009) zeigten, dass neben PEN2 auch PMR5 (POWDERY MILDEW RESISTANT5; Funktion unbekannt) und AGB1 (ARABIDOPSIS GTP-BINDING PROTEIN β 1) zur prä-invasiven Abwehr von *M. oryzae* beitragen, da *pen2pmr5*- und *pen2agb1*-Doppelmutanten im Vergleich zur *pen2*-Einzelmutante eine erhöhte Penetrationsfrequenz des Pilzes aufwiesen. Über die *pmr5*- und *agb1*-Einzelmutanten liegen in der Veröffentlichung keine Daten vor. Wurde in der *pen2pmr5agb1*-Dreifachmutante zusätzlich die Salizylsäure-Hydroxylase *NahG* aus *Pseudomonas* transgen exprimiert, konnte eine deutliche Zunahme der

Penetrationshäufigkeit und des Pathogenwachstums im Vergleich zu den oben genannten Doppelmutanten verzeichnet werden (Nakao *et al.*, 2011).

Jarosch *et al.* (1999) zeigten, dass eine Mutation in den *MLO* (*MILDEW RESISTANT LOCUS O*)-Loci 1, 3 und 5 in Gerste zu einer Hypersuszeptibilität gegen das nicht-adaptierte Pathogen *M. oryzae* führt, wohingegen diese Mutanten nach Behandlung mit dem adaptierten Mehltaupilz *Bgh* im Vergleich zum Wildtyp eine verringerte Anfälligkeit aufweisen (Jorgensen und Mortensen, 1977; Lyngkjaer *et al.*, 1995). Aus diesem Grund untersuchten Nakao *et al.* (2011) eine mögliche Beteiligung des *MLO*-Lokus auch in der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *M. oryzae*. Die von den Autoren getesteten *pen2mlo2*-Doppelmutanten, in denen neben *PEN2* auch das für ein intergrales Membranprotein kodierende Gen *MLO2* (*MILDEW RESISTANT LOCUS O2*) mutiert ist, zeigten hinsichtlich der Penetrationsfrequenz keinen Unterschied zur *pen2*-Mutante. Erst durch Kombination mit NahG oder der *pmr5*-Mutation konnte eine weitere Zunahme der Penetrationshäufigkeit im Vergleich zu den entsprechenden Doppelmutanten verzeichnet werden. Aus diesem Grund postulieren die Autoren, dass auch *MLO2* an der prä-invasiven Resistenz von *A. thaliana* gegen *M. oryzae* beteiligt ist. Da das Pathogen jedoch zu keinem Zeitpunkt sporulierte, schließen die Autoren auf eine effektive Aufrechterhaltung der Resistenz durch post-invasive Abwehrmechanismen.

In ähnlicher Weise identifizierten Löhner *et al.* (2008) mehrere Komponenten der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen den nicht-adaptierten biotrophen Pilz *Phakopsora pachyrhizi*, den Verursacher des Sojabohnenrostes. Die Autoren beobachteten für die *pen3*-Einzelmutante im Vergleich zu Col-0 makroskopisch sichtbare Läsionen und Mesophyllzelltod nach Inokulation mit *P. pachyrhizi*, ein stärkeres Pathogenwachstum und zudem eine erhöhte Penetrationshäufigkeit. Auch *pen1* und *pen2* wiesen eine leicht erhöhte Anzahl penetrierter Zellen auf, im Gegensatz zu *pen3* jedoch keinen Zelltod im Mesophyll. Die zusätzlich getesteten Mutanten *jar1* (*jasmonic acid response1*) und *sid2*, die in der JA- bzw. SA-Signaltransduktion beeinträchtigt sind, zeigten den Wildtypphänotyp bzw. ein leicht erhöhtes Pathogenwachstum. Für die *pen3jar1*- und *pen3sid2*-Doppelmutanten konnte verglichen mit den Einzelmutanten eine weitere Zunahme der Penetrationsfrequenz und des Pathogenwachstums im Mesophyll verzeichnet werden, wobei die Autoren eine synergistische Wirkung von *PEN3* mit *SID2* bzw. *JAR1* vermuten. Allerdings waren die Doppelmutanten noch immer resistent, was wiederum auf weitere an der Nichtwirtsresistenz beteiligte Komponenten hinweist. Die Ergebnisse dieser Studie lassen eine Beteiligung sowohl von JA- als auch SA-abhängigen Prozessen in der Abwehr von Arabidopsis gegen den biotrophen Pilz *P. pachyrhizi* vermuten, wobei die Autoren *JAR1* und *SID2* der post-invasiven Resistenz gegen dieses Pathogen zuordnen.

Die in den beschriebenen Studien beobachtete offensichtliche Vielschichtigkeit der Nichtwirtsresistenz könnte nahelegen, dass sich die *edr1*-Mutation erst auf die Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* auswirkt, wenn die prä-invasive Abwehr aufgrund einer anderen Mutation, z. B. *pen2*, bereits beeinträchtigt ist. Da die verstärkte Zelltodreaktion von *pen2-1erp6* und *pen2-1edr1-1* keine Auszählung toter Epidermiszellen ermöglichte (siehe auch Kapitel 3.2.3.3.), kann die Frage nach der Beteiligung von EDR1 an der prä-invasiven Resistenz nicht abschließend geklärt werden.

Eine weitere Komponente der Penetrationsresistenz in Nichtwirtsinteraktionen stellt der Transkriptionsfaktor ATAF1 dar, der in Arabidopsis an der prä-invasiven Abwehr von *Bgh* beteiligt ist (Jensen *et al.* 2007). ATAF1 gehört zur Gruppe der NAC-Transkriptionsfaktoren, die für Entwicklungsprozesse und Reaktionen auf Stress bedeutend sind. Jensen *et al.* (2008) beobachteten nach Inokulation mit *Bgh* eine Reduktion des ABA-Levels in Wildtyppflanzen, die jedoch in der *ataf1*-Mutante nicht vorlag. Dies korrelierte mit der differentiell stärkeren Expression des ABA-Biosynthesegens *AAO3*, in den *ataf1*-Pflanzen. Aufgrund ihrer Analysen postulieren die Autoren eine Rolle von ATAF1 als Negativregulator für die Biosynthese von ABA, wodurch wiederum die Penetrationsresistenz gegen *Bgh* aufrechterhalten wird. Der mechanistische Zusammenhang zwischen ABA und der Penetrationsresistenz gegen *Bgh* ist jedoch noch unbekannt.

Bisher waren hauptsächlich zwei Signaltransduktionswege dafür bekannt, eine wichtige Rolle in der Abwehr von biotischem Stress einzunehmen. Dabei wird SA-abhängigen Abwehrmechanismen eher eine Bedeutung für die Resistenz gegen biotrophe und/oder hemibiotrophe Pathogene zugeschrieben, während die Abwehr nekrotropher Pathogene durch JA/Ethylen-abhängige Mechanismen reguliert wird (Glazebrook 2005). Dahingegen beruht die Adaption an abiotischen Stress vorrangig auf Prozessen, die in Abhängigkeit des Hormons ABA wirken (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2007). Mittlerweile deuten jedoch diverse Studien darauf hin, dass ABA auch für die Pathogenabwehr von Bedeutung ist (Ton *et al.*, 2009).

Möglicherweise handelt es sich bei ATAF1 ähnlich wie bei PEN2 um einen Abwehrmechanismus, der Penetrationsresistenz gegen ein breites Pathogenspektrum vermittelt, andererseits könnte ATAF1 analog zu EDR1 auch nur für die prä-invasive Abwehr bestimmter Pathogene von Bedeutung sein. Vorläufige Experimente mit der Mutante *ataf1* wurden durchgeführt, um eine mögliche Beteiligung des Transkriptionsfaktors an der Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* zu analysieren. Erste Experimente zeigten, dass *ataf1* im Vergleich zu Col-0 keine erhöhte Anzahl toter Epidermiszellen aufwies (siehe Abbildung 6.8 im Anhang). Vielmehr ergab die statistische Auswertung der drei durchgeführten Einzelexperimente sowie der zusammengefassten Daten, dass für *ataf1* in einem der drei Experimente sowie nach Auswertung der zusammengefassten Daten eine signifikant geringere

Anzahl toter Zellen erfasst wurde. Dieses Ergebnis würde nahelegen, dass *ATAF1* als Regulator von prä-invasiven Abwehrreaktionen von *Arabidopsis* gegen *P. infestans* von Bedeutung ist. Dazu ist jedoch zu bemerken, dass die Anzahl toter Epidermiszellen bei beiden Genotypen sehr gering war (unter 10). In zukünftigen Experimenten sollte *pen2-1* mitgeführt werden, um den Erfolg der Inokulation zu überprüfen, und es sollte eine höhere Sporenkonzentration eingesetzt werden, um Unterschiede zwischen Col-0 und *ataf1* besser beurteilen zu können. Um zu überprüfen, ob die *edr1*- bzw. *ataf1*-Mutation erst in Kombination mit Penetrationsresistenz-Mutationen einen Effekt auf die Penetrationsfrequenz von *P. infestans* hat, könnten *edr1ataf1*- und *pen2-1ataf1*-Doppelmutanten getestet werden. Bei diesen Experimenten ist jedoch zu bedenken, dass *ATAF1* Teil eines scheinbar stringent kontrollierten Netzwerkes darstellt und bereits minimale Veränderungen vor Experimenten unterschiedliche Reaktionen der *ataf1*-Mutanten hervorrufen können (Mauch-Mani und Flors, 2009). So beobachteten Jensen *et al.* (2008) einen Anstieg, Lu *et al.* (2007) hingegen eine Reduktion der Trockenstresstoleranz der *ataf1*-Mutante. Zudem wurde nach Inokulation mit dem adaptierten Pathogen *B. cinerea* in *ATAF1*-überexprimierenden Pflanzen eine unterschiedliche Transkriptakkumulation von *PR1* und *PDF1.2* verzeichnet. In einer Studie konnte eine Akkumulation von *PR1* und *PDF1.2* nachgewiesen werden (Wu *et al.*, 2009), in einer anderen Untersuchung wurde *PR1* jedoch reprimiert und *PDF1.2* war im Vergleich zum Wildtyp unverändert (Wang *et al.*, 2009). Eine Erklärung für diese Diskrepanzen gibt es bisher nicht, jedoch diskutieren Mauch-Mani und Flors (2009), dass eine Ähnlichkeit zwischen dem unterschiedlichen Verhalten von *ATAF1* mit den verschiedenen Funktionen von ABA in der Reaktion auf biotische und abiotische Faktoren vorliegt. Die Autoren vermuten weiterhin, dass *ATAF1* bzw. ABA eine Art Schnittstelle für die komplexen zellulären Reaktionen auf Stress darstellen und auf einen starken Einfluss von Umweltbedingungen in der Regulation von (a)biotischem Stress hinweisen. Demnach resultiert jeglicher (a)biotischer Stress möglicherweise in einer veränderten ABA-Homöostase, was zu einer Destabilisierung des Systems führt, wodurch sich wiederum das Gleichgewicht der verschiedenen beteiligten Signalwege verschiebt. Dadurch kommt es in unterschiedlichen Laboren möglicherweise zu verschiedenen Ergebnissen, obwohl die gleichen Parameter analysiert wurden. Der Transkriptionsfaktor *ATAF1* ist nach Ansicht von Mauch-Mani und Flors (2009) möglicherweise maßgeblich in diesem Prozess involviert.

Die Kombination der *edr1*-Mutationen mit dem *pen2-1*-Allel führte zwar zu einer im Vergleich zu *pen2-1* signifikant verstärkten Zelltodreaktion (Abbildung 3.16), jedoch konnte hier visuell kein Unterschied in der Ausprägung von *P. infestans*-Strukturen festgestellt werden. Um diese Beobachtungen der mikroskopischen Analysen der Einzel- und Doppelmutanten quantitativ zu belegen, müssten umfangreiche Experimente zur Auswertung einer Vielzahl

von Inokulationsstellen durchgeführt werden. Desweiteren könnte die Bestimmung der Pathogen-Biomasse Aufschluss über das Wachstum von *P. infestans* geben.

Möglicherweise gibt es analog zu PAD4 und SAG101 auch für EDR1 eine Komponente mit einer redundanten Funktion und/oder zusätzliche Abwehrwege sind beteiligt, so dass erst durch Mutation dieser weiteren Komponente ein deutlicher Effekt auf das Pathogenwachstum zu verzeichnen wäre. Wie Frye *et al.* (2001) berichteten, liegen im Genom von *A. thaliana* fünf zu *EDR1* homologe Gene vor. Die höchste Homologie besteht zwischen EDR1 und CTR1, bei denen die Kinasedomänen mehr als 65 % identisch sind (Frye *et al.* 2001). Charakterisiert ist bisher nur CTR1, diese scheint aber nach bisherigem Wissensstand eine andere Funktion als EDR1 zu besitzen. CTR1 ist ein Negativregulator der Ethylen-Signaltransduktion und verhindert vermutlich über die Inaktivierung der MKK9-MPK3/MPK6-Kaskade und den Abbau des Transkriptionsfaktors EIN3 die Expression Ethylen-responsiver Gene (Yoo *et al.* 2008). Da bereits die *edr1*-Einzelmutanten nach *P. infestans*-Behandlung einen Phänotyp aufweisen, scheint eine redundante Funktion der homologen Proteine unwahrscheinlich. Eine teilweise Redundanz könnte durch die Analyse von T-DNA-Insertionslinien und deren Kreuzung zukünftig untersucht werden.

Es konnte nicht abschließend geklärt werden, ob EDR1 in der Interaktion von *A. thaliana* mit *P. infestans* in der prä- oder post-invasiven Abwehr involviert ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, müssten weitere Komponenten in dieser Interaktion identifiziert werden, z. B. durch Kreuzung verschiedener Mutanten. Für die Einkreuzung von Mutationen in den *pen2-1erp6*- bzw. *pen2-1edr1-1*-Hintergrund erscheinen zusätzlich zu den bereits erwähnten Signaltransduktionswegen vor allem die übrigen *erp*-Mutanten besonders vielversprechend. Anhand von Allelietests konnte bereits bestätigt werden, dass nur 2 der insgesamt 14 *erp*-Mutanten allelisch sind, d. h. die anderen sind möglicherweise in unterschiedlichen Signalwegen beeinträchtigt und stellen damit einen aussichtsvollen Ausgangspunkt für diesen Ansatz dar. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch Remutagenese von *pen2-1edr1-1* bzw. *pen2-1erp6* weitere Komponenten der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* zu identifizieren.

4.2 Beteiligung verschiedener Komponenten an der Ausprägung des Phänotyps der *edr1*-Mutanten

Parallel zur Aufklärung von Komponenten der Nichtwirtsresistenz steht auch die Identifizierung der jeweils beteiligten Signaltransduktionswege, die zur Ausprägung bestimmter Mutanten-Phänotypen beitragen, im Fokus vieler Studien. Eine Remutagenese von *edr1-1* und das Einkreuzen bestimmter Mutationen führte zur Identifizierung von Komponenten, die für die Ausprägung der *edr1-1*-Phänotypen erforderlich sind (siehe Abbildung 1.7). Frye *et al.* (2001) analysierten die Beteiligung der Hormone SA, JA und Ethylen an der

edr1-1-vermittelten Resistenzhöhung gegen das adaptierte Pathogen *G. cichoracearum* und erbrachten den Nachweis, dass dieser Phänotyp SA-abhängig ist. Die in *edr1-1* beobachtete erhöhte Resistenz gegen das getestete Pathogen konnte durch Kombination von *edr1-1* mit einer Mutation in *EDS1*, *PAD4* oder *NIM1* (*NONINDUCIBLE IMMUNITY1*) unterdrückt werden. Diese Gene werden für die Biosynthese von SA bzw. SA-vermittelte zelluläre Antworten benötigt. Eine *edr1-1ein2*-Doppelmutante, in der aufgrund einer Mutation in *EIN2* alle Ethylen-vermittelten Zellantworten unterdrückt sind, war in ihrer Resistenzausprägung mit *edr1-1* vergleichbar, weshalb die Autoren eine Beteiligung von Ethylen-abhängigen Prozessen ausschließen.

Weiterhin beobachteten Tang *et al.* (2005) eine SA-Abhängigkeit der in *edr1-1* beobachteten Trockenstress-induzierten Zelltodreaktion. In Pflanzen, die neben der *edr1-1*-Mutation auch einen Defekt in den Genen *PAD4*, *EDS1*, *NIM1* oder *SID2* trugen und somit in der SA-Biosynthese bzw. SA-vermittelten Zellantworten beeinträchtigt waren, konnte der *edr1-1*-vermittelte Zelltod unter Trockenstress aufgehoben werden.

Durch Kreuzung von *edr1-1* und *erp6* mit der Mutante *sid2-1*, in der kein SA akkumuliert wird, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass auch die nach *P. infestans*-Behandlung in *erp6* und *edr1-1* beobachtete HR in Abhängigkeit von SA ausgebildet wurde (Abbildung 3.27). Nach allgemeinem Verständnis sind reaktive Sauerstoffspezies wie z. B. H_2O_2 und das Hormon SA an der Ausprägung hypersensitiver Reaktionen beteiligt und agieren synergistisch (Shirasu *et al.*, 1997; Coll *et al.*, 2011). Die Signal-Kaskade, durch die eine Zelltodreaktion initiiert wird, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Bekannt sind jedoch zwei unabhängige Module, die die Bildung von HR in kompatiblen Interaktionen regulieren und zur Akkumulation von SA führen. Immunantworten, die CC-NB-LRR involvieren, werden dabei in den meisten Fällen über das Protein NONRACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANCE1 (NDR1) reguliert, während der EDS1-PAD4-SAG101-Komplex in TIR-NB-LRR-vermittelten Immunantworten eine Rolle spielt (Coll *et al.*, 2011). Es könnte spekuliert werden, dass EDR1 möglicherweise eine regulierende Komponente in dieser Signalkaskade ist, die die Ausprägung von Zelltod kontrolliert.

Van Hulst *et al.* (2006) bezeichnen *edr1-1* aufgrund der verstärkten *PR1*-Akkumulation und den Calloseablagerungen, die *edr1-1*-Pflanzen nach Behandlung mit den adaptierten Pathogenen *G. cichoracearum* und *H. arabidopsidis* im Vergleich zum Wildtyp aufweisen, auch als Priming-Mutante. Priming bezeichnet den physiologischen Zustand von Pflanzen, der es ihnen im Vergleich zu Pflanzen ohne Priming ermöglicht, eine schnellere Abwehrreaktion auf biotische und abiotische Stressoren zu aktivieren (Conrath *et al.*, 2002). Beckers *et al.* (2009) stellen die Hypothese auf, dass der in *edr1-1* beobachtete Priming-Effekt möglicherweise auf eine erhöhte Aktivierung der Stress-responsiven Kinasen MPK3 und MPK6 zurückzuführen ist. Diese Vermutung wird durch die Beobachtung der Autoren unterstützt,

dass unbehandelte *edr1-1*-Pflanzen eine leicht erhöhte *MPK3*-Transkriptakkumulation und nach Wasserinfiltration eine stärkere Phosphorylierung des TEY-Motivs der MAP-Kinasen *MPK3* und *MPK6* im Vergleich zum Wildtyp aufweisen. Obwohl die *edr1*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulation eine verstärkte Zelltod-Reaktion und Calloseablagerungen aufweisen, konnte keine Veränderung der Transkriptakkumulation des Abwehrgens *PR1* beobachtet werden (Abbildung 3.26). Damit liegt im Zusammenhang mit der Reaktion auf *P. infestans* scheinbar kein Priming-Effekt vor.

Die Unterdrückung der SA-abhängigen Ausprägung von Zelltod/HR durch *EDR1* scheint ein unspezifischer Mechanismus zu sein, der in der Interaktion von *A. thaliana* mit einem breiten Pathogenspektrum eine Rolle spielt, so auch in der Nichtwirts-Interaktion mit *P. infestans*. Im Gegensatz dazu basiert die Bildung der Läsionen in *edr1-1* nach Behandlung mit dem nicht-adaptierten Pilz *C. gloeosporioides* auf einem SA-unabhängigen Mechanismus, da durch Kombination mit der *pad4*- oder *sid2*-Mutation die Ausprägung dieser Läsionen nicht unterdrückt werden konnte (Hiruma *et al.* 2011).

Anhand von Microarray-Analysen stellten die Autoren fest, dass in *edr1-1* nach Inokulation mit *C. gloeosporioides* u. a. vier Gene reprimiert waren, die für die Pflanzendefensine *PDF1.2a*, *PDF1.2b*, *PDF1.2c* und *PDF1.3* kodieren. Weiterführende Untersuchungen bestätigten, dass 9 h nach Pathogen-Behandlung eine Reduktion des *PDF1.2*-Transkriptes in *edr1-1* im Vergleich zur Kontrolle vorlag. Ein gegenteiliger Effekt bezüglich der *PDF1.2*-Expression kann in Pflanzen mit einer Mutation im Transkriptionsfaktor *MYC2* beobachtet werden. Da *myc2*-Mutanten eine erhöhte Expression von *PDF1.2a* aufweisen scheint *MYC2* im Wildtyp an der Repression von *PDF1.2a* beteiligt zu sein (Anderson *et al.*, 2004; Lorenzo *et al.*, 2004). Hiruma *et al.* (2011) beobachteten, dass die in *myc2* vorliegende Erhöhung des *PDF1.2*-Transkriptlevels nach *C. gloeosporioides*-Inokulation durch die Mutation in *EDR1* aufgehoben wird. Die Autoren schließen daraus, dass in der Interaktion von Arabidopsis mit dem nicht-adaptierten Pilz *C. gloeosporioides* *EDR1* als Negativregulator von *MYC2* fungiert und dadurch die Expression des Abwehrgens *PDF1.2* positiv reguliert. In der *edr1-1*-Mutante wird *MYC2* jedoch nicht reprimiert, wodurch die Expression des Abwehrgens *PDF1.2* unterdrückt wird. Diese Resultate legen eine Beteiligung von Pflanzendefensinen an der Abwehr des Pilzes *C. gloeosporioides* nahe. Pflanzendefensine sind kleine, Cystein-reiche Proteine, die anders als ihre Vertreter aus Säugetieren und Insekten nur in Ausnahmefällen eine antibakterielle Aktivität aufweisen (Stotz *et al.*, 2009). Vielmehr besitzen sie eine antifungale Wirkung und sind an der Abwehr gegen ein breites Spektrum an Pilzen beteiligt, wie z. B. *B. cinerea* bei Arabidopsis und *Alternaria longipes* bei Tabak (Thomma *et al.*, 1999; Thomma *et al.*, 2002; Lay und Anderson, 2005; Wong *et al.*, 2007).

Die von Hiruma *et al.* (2011) dargelegte Bedeutung von *EDR1* als positiver Regulator der *PDF*-Gene und damit der Expression von Pflanzendefensinen konnte für die Interaktion von

Arabidopsis mit *P. infestans* nicht beobachtet werden. Da es im vorliegenden Fall nicht zu einer Reduzierung des *PDF1.2*-Transkriptlevels nach Pathogenbehandlung kam (Abbildung 3.26), kann spekuliert werden, dass dieser Mechanismus in dem hier untersuchten Pathosystem nicht von Bedeutung ist und die Regulation der Expression von *PDF1.2* durch andere Komponenten erfolgt. Es bleibt offen, ob Pflanzendefensine in Arabidopsis für die Abwehr des Oomyceten *P. infestans* von Bedeutung sind, jedoch kann aufgrund der deutlichen Akkumulation des *PDF1.2*-Transkriptes nach *P. infestans*-Inokulation (Abbildung 3.26), die in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Landtag (2006) auch im vorliegenden Fall verzeichnet wurde, eine Beteiligung in dieser Interaktion vermutet werden.

4.3 Einfluss der Aminosäuresubstitution in *erp6* auf die Funktion von EDR1

Die Genom-Sequenzierung von *pen2-1erp6* ergab, dass diese aus der Remutagenese von *pen2-1* hervorgegangene Mutante eine Punktmutation in *EDR1* trägt. Dabei führt die Substitution von Guanin zu Adenin im 12. Exon zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutamat an Position 854 (Abbildung 3.14) innerhalb der Kinasedomäne (KD) des EDR1-Proteins. Northern Blot-Analysen belegen, dass diese Mutation keinen Einfluss auf die *EDR1*-Transkriptakkumulation in *erp6* hat (Abbildung 3.21). Im Gegensatz dazu weist *edr1-1*, bei der eine Mutation im 4. Exon zu einem verfrühten Stop-Codon führt, kein nachweisbares *EDR1*-Transkript auf (Abbildung 3.21). Ähnliches wurde von Tang und Innes (2002) beobachtet, die zusätzlich zeigten, dass in *edr1-1* kein EDR1-Protein nachweisbar ist, so dass *edr1-1* als Nullmutante bezeichnet werden kann.

Neben den bereits diskutierten Phänotypen von *edr1-1* und *erp6* nach Behandlung mit *P. infestans* zeigen diese *EDR1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontrollen zusätzlich eine erhöhte Sensitivität gegen die bakteriellen PAMPs flg22 und elf18 (Abbildung 3.32 und Abbildung 3.33), ein leicht verringertes Pflanzenwachstum sowie Chlorosen und punktförmigem Zelltod auf unbehandelten, voll entwickelten Blättern (Abbildung 3.17). Da zwischen *edr1-1* und *erp6* kein Unterschied in der Ausprägung dieser Phänotypen besteht, scheint die in *erp6* substituierte Aminosäure von essentieller Bedeutung für die Funktion von EDR1 zu sein. Abbildung 4.1 zeigt die Primärstruktur der EDR1-KD mit *in silico* vorhergesagten Motiven, deren Bedeutung in EDR1-homologen Kinasen bekannt ist. Da die Aminosäuresubstitution keine für die Kinase-Funktion essentielle Position betrifft, ist aufgrund der vorhergesagten Motive nicht ersichtlich, weshalb ein Verlust der EDR1-Funktion vorliegt. Eine bisher unbekannte Beteiligung der Aminosäure an der katalytischen Aktivität oder Proteinfaltung von EDR1 kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

WT	LVIAERIGLGSYGEVYHADWHGTEVAVKRFLDQDFSGAALAEFRSEVRIIMRRLRHPNVVFFLGAVTRPPN	739
erp6	LVIAERIGLGSYGEVYHADWHGTEVAVKRFLDQDFSGAALAEFRSEVRIIMRRLRHPNVVFFLGAVTRPPN	739
WT	LSIVTEFLPRGSLYRIILHRPKSHIDERRRIKMALDVAMGMNCLHTSTPTIVHRDLKTPNLLVDNNWNVKV	809
erp6	LSIVTEFLPRGSLYRIILHRPKSHIDERRRIKMALDVAMGMNCLHTSTPTIVHRDLKTPNLLVDNNWNVKV	809
WT	GDFGLSRLKHNTFLSSKSTAGTPEWMAPEVLRNEPSNEKCDVYSFGVILWELATLRLPWRGMNPMQVVGA	879
erp6	GDFGLSRLKHNTFLSSKSTAGTPEWMAPEVLRNEPSNEKCDVYSFEVILWELATLRLPWRGMNPMQVVGA	879
WT	VGFGNRRLEIPKELDPVVGRIILECWQTDPNLRPSFAQLTEVLKPLNRLVLPQP-	933
erp6	VGFGNRRLEIPKELDPVVGRIILECWQTDPNLRPSFAQLTEVLKPLNRLVLPQP-	933

Abbildung 4.1: Vergleich der EDR1-Kinasedomäne aus WT und *erp6*-Mutante

Dargestellt sind die EDR1-Kinasedomänen aus dem Ökotyp Col-0 (WT) und der *erp6*-Mutante (ClustalW; Goujon *et al.*, 2010). Mit Hilfe der PROSITE-Software (Sigrist *et al.*, 2010) wurden aufgrund der Ähnlichkeit mit anderen Kinasen wichtige Motive innerhalb der Kinasedomäne vorhergesagt: grün unterlegt ist die ATP-Bindestelle für Proteinkinasen, grau unterlegt die aktive Tasche von Serin/Tyrosin-Proteinkinasen mit der katalytisch aktiven Aminosäure (blau markiert). Rote Buchstaben kennzeichnen den in *erp6* vorliegende Aminosäureaustausch von Glycin zu Glutamat.

Ein von Frye *et al.* (2001) durchgeführter Vergleich der Aminosäuresequenz der EDR1-KD mit fünf EDR1-Homologen aus *A. thaliana* zeigte, dass die in *erp6* betroffene Aminosäure innerhalb der untersuchten Homologe stark konserviert ist. Der in Abbildung 4.2a dargestellte Vergleich von *AtEDR1*-Orthologen aus *A. lyrata*, Soja (*Glycine max*), Reis (*Oryza sativa*), Gerste (*Hordeum vulgare*) und Weizen (*Triticum aestivum*) bestätigt die hohe Konserviertheit von Glycin⁸⁵⁴ aus *AtEDR1* auch in anderen Pflanzenspezies und unterstützt die Vermutung, dass es sich hierbei um eine für die EDR1-Funktion essentielle Aminosäure handeln könnte. Weiterhin weisen *in silico* Vorhersagen der Sekundärstruktur des Proteins auf eine Lokalisierung der in *erp6* substituierten Aminosäure in einer scheinbar hoch konservierten α -Helix-Region hin (Abbildung 4.2b). Insgesamt ist die vorhergesagte Sekundärstruktur der gesamten Kinasedomäne von EDR1 innerhalb der gegenübergestellten Pflanzenarten hoch konserviert (siehe Anhang Abbildung 6.7).

(a)	nicht konserviert	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	konserviert		
<i>A. thaliana</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>A. lyrata</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>G. max</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>O. sativa</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRMPW
<i>H. vulgare</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW
<i>T. aestivum</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW
(b)	α -Helix	β -Faltblatt			
<i>A. thaliana</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>A. lyrata</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>G. max</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW
<i>O. sativa</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRMPW
<i>H. vulgare</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW
<i>T. aestivum</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW

Abbildung 4.2: Vergleich der EDR1-Kinasedomäne aus verschiedenen Pflanzenspezies

Gezeigt ist ein Ausschnitt aus einem Vergleich der EDR1-KD aus *A. thaliana* und fünf Orthologen im Hinblick auf die Konserviertheit der Aminosäuren (a) bzw. die vorhergesagte Sekundärstruktur des Proteins (b). Die Position der in *erp6* substituierten Aminosäure ist durch einen Rahmen angezeigt. Der Abgleich wurde mit Hilfe der Software PRALINE durchgeführt (Simossis und Heringa, 2005).

Im Hinblick auf die vorhergesagte Sekundärstruktur von EDR1 zeigt der Vergleich von Wildtyp- und *erp6*-KD, dass sich durch den Aminosäureaustausch in *erp6* umfangreiche Veränderungen ergeben (Abbildung 4.3). Möglicherweise bedingt die veränderte Sekundärstruktur eine andere Konformation des Proteins, die zu einer Modifizierung der Proteinfunktion führt. Erste Hinweise darauf lieferten die Ergebnisse des Kinaseassays und die Analyse von Phosphopeptiden mittels massenspektrometrischer Methoden. Im Kinaseassay wies die EDR1-KD aus *erp6* im Gegensatz zur Wildtypform keine Autophosphorylierung auf (Abbildung 3.24) und in den massenspektrometrischen Untersuchungen wurden für die mutierte Form der EDR1-KD deutlich weniger Phosphorylierungsereignisse ermittelt (Abbildung 3.25), was eine Störung der Phosphorylierungsaktivität von EDR1 nahelegt. Das in *erp6* vorliegende Glutamat besitzt eine längere/größere Seitenkette als Glycin, weshalb möglicherweise Phosphorylierungsstellen abgedeckt und nicht phosphoryliert werden.

Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass durch die modifizierte Konformation native Substrate nicht mehr oder andere Substrate im aktiven Zentrum binden können, wodurch die ursprüngliche Funktion von EDR1 verloren geht und eventuell andere Komponenten aktiviert werden. Bis auf den Beleg der Phosphorylierung des artifziellen Substrates MyBP sowie der Fähigkeit zur Autophosphorylierung durch Tang und Innes (2002) gibt es in der Literatur keine Informationen zu Substraten von EDR1, weshalb eine abschließende Beurteilung der oben genannten Ergebnisse nicht möglich ist.

WT	L V I A E R I G L G S Y G E V Y H A D W H G T E V A V K K F L D Q D F S G A A I A E F R S E V R I M	718
<i>erp6</i>	L V I A E R I G L G S Y G E V Y H A D W H G T E V A V K K F L D Q D F S G A A I A E F R S E V R I M	718
WT	R R L R H P N V V F F L G A V T R P P N L S I V T E F L P R G S L Y R I L H R P K S H I D E R R R I	768
<i>erp6</i>	R R L R H P N V V F F L G A V T R P P N L S I V T E F L P R G S L Y R I L H R P K S H I D E R R R I	768
WT	K M A L D V A M G M N C L H T S T P T I V H R D L K T P N L L V D N N W N V K V G D F G L S R L K H	818
<i>erp6</i>	K M A L D V A M G M N C L H T S T P T I V H R D L K T P N L L V D N N W N V K V G D F G L S R L K H	818
WT	N T F L S S K S T A G T P E W M A P E V L R N E P S N E K C D V Y S F E V I L W E L A T L R L P W R	868
<i>erp6</i>	N T F L S S K S T A G T P E W M A P E V L R N E P S N E K C D V Y S F E V I L W E L A T L R L P W R	868
WT	G M N P M Q V V G A V G F Q N R R L E I P K E L D P V V G R I I L E C W Q T D P N L R P S F A Q L T	918
<i>erp6</i>	G M N P M Q V V G A V G F Q N R R L E I P K E L D P V V G R I I L E C W Q T D P N L R P S F A Q L T	918
WT	E V L K P L N R L V L P T P Q	933
<i>erp6</i>	E V L K P L N R L V L P T P Q	933

Abbildung 4.3: Vorhergesagte Sekundärstruktur der EDR1-Kinasedomäne aus Wildtyp und *erp6*-Mutante. Abgebildet ist die mit Hilfe der Software PRALINE (Simossis und Heringa, 2005) vorhergesagte Sekundärstruktur der EDR1-Kinasedomäne aus Col-0 (WT) und *erp6*. Die Position der Aminosäuresubstitution ist durch einen schwarzen Rahmen markiert. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das native Protein.

Zusätzliche Hinweise auf eine veränderte Faltung und Funktion des EDR1-Proteins aus *erp6* könnten durch *in silico* Modelling-Versuche erlangt werden. Die Voraussetzung für eine möglichst genaue Vorhersage ist dabei die Verwendung einer Proteinsequenz mit einer

hohen Homologie zu EDR1. Besonders geeignet scheint dafür die Kinase CTR1 zu sein, die eine mehr als 65 % identische Kinasedomäne besitzt. Aufgrund dieser hohen Homologie wurde EDR1 als MAPKKK annotiert und zur selben Familie von MAPKKKs wie CTR1 zugeordnet (Frye *et al.*, 2001; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2010). Die erst vor kurzem von Mayerhofer *et al.* (2011, 2012) veröffentlichte Röntgenkristallstruktur der CTR1-KD würde ein solches Homologie-Modelling mit der EDR1-KD ermöglichen. Weiterhin wäre eine vollständige Strukturaufklärung für das EDR1-Protein aus *erp6* und dem Wildtyp mittels Röntgenkristallstrukturanalyse bzw. NMR (nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz)-Spektroskopie möglich und die Faltung von Wildtyp- und mutiertem Protein könnte mit Hilfe von CD (Circulardichroismus)-Spektren verglichen werden.

Möglicherweise könnte die Bedeutung der in *erp6* substituierten Aminosäure detaillierter beurteilt werden, wenn *erp6* mit zusätzlichen Pathogenen, abiotischen Stressoren und Hormonen getestet wird. Die *edr1-1*-Mutante ist durch eine Hypersensibilität gegen ABA, eine verfrühte Seneszenz nach Ethylenbehandlung und die Ausprägung nekrotischer Läsionen unter Trockenstress charakterisiert (Tang *et al.*, 2005; Wawrzynska *et al.*, 2008). An *erp6*-Pflanzen wurden trotz ausreichender Bewässerung ebenfalls Läsionen beobachtet (Abbildung 3.17), was auf eine Reaktion nach abiotischem Stress hinweisen könnte.

4.4 Untersuchung putativer Substrate für EDR1

Aufgrund der Homologie zu CTR1, einem Negativregulator der Ethylen-Signaltransduktion, ist EDR1 als putative MAPKKK annotiert (Frye *et al.* 2001; TAIR10) und damit Bestandteil einer in eukaryotischen Lebewesen hoch konservierten MAPK-Kaskade. Mit Hilfe dieser Kaskaden werden externe Stimuli in zelluläre Antworten konvertiert und eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie z. B. die Reaktion auf Hormone, biotische und abiotische Stressoren sowie Entwicklungsprozesse reguliert. In Arabidopsis gibt es ungefähr 80 verschiedene MAPKKKs (Colcombet und Hirt, 2008), von denen in der Literatur die Kinasen YODA, ANP1/2/3, MEKK1, MAP3K ϵ 1/ ϵ 2, CTR1 und EDR1 ausführlich beschrieben sind (Ichimura *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 1998; Frye *et al.*, 2001; Krysan *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003; Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004; Chaiwongsar *et al.*, 2006). Zwar ist die physiologische Bedeutung dieser MAPKKKs meist bekannt, jedoch fehlen häufig Hinweise auf mögliche Substrate, wie im Fall von MAP3K ϵ 1/ ϵ 2 und EDR1.

Für EDR1 wurden in einem Ansatz mit dem Hefe-2-Hybrid-System (yeast two hybrid; Y2H) bereits Ethylenrezeptoren getestet, die aufgrund der Homologie von EDR1 zu CTR1 als mögliche Substrate in Frage kamen, jedoch wurde keine Interaktion mit der EDR1-KD beobachtet (Tang *et al.*, 2000). In einem weiteren Y2H-Assay von Christiansen (2008) wurden das Kinesin-ähnliche Protein KCA1 und der Transkriptionsfaktor MYC2 als putative

Interaktionspartner von EDR1 *in vitro* identifiziert, aber in weiterführenden Co-Immuno-präzipitations-Analysen konnte eine Interaktion *in planta* nicht verifiziert werden.

Um weitere putative Substrate für EDR1 zu analysieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die 10 für Arabidopsis bekannten MKKs in Kinaseassays eingesetzt. Dabei konnte für keine der getesteten MKKs eine Phosphorylierung durch die EDR1-KD aus Col-0 beobachtet werden (Abbildung 3.30 und Abbildung 3.31).

Als Positivkontrolle für MKK1, 2, 4 und 5 wurde die MAPKKK MEKK1 eingesetzt, da eine Zusammenwirkung dieser Kinasen innerhalb bestimmter MAPK-Kaskaden beschrieben ist (Ichimura *et al.*, 1998; Mizoguchi *et al.*, 1998; Gao *et al.*, 2008; Kong *et al.*, 2012). Allerdings wurde bisher keine Phosphorylierung gezeigt, sondern lediglich eine direkte Interaktion von MEKK1 mit der jeweiligen MKK mit Hilfe des Y2H-Assays nachgewiesen. Da in der vorliegenden Arbeit keine Phosphorylierung der MKKs beobachtet werden konnte (Abschnitt 3.2.5.1), ist MEKK1 nicht als Positivkontrolle für den verwendeten Assay geeignet. Über einen indirekten Nachweis könnte in einer Wiederholung des Experimentes überprüft werden, ob es zu einer Aktivierung der MKKs durch MEKK1 kommt, indem z. B. MyBP als allgemeines Substrat für MKKs dem Reaktionsansatz zugefügt wird. Eine Phosphorylierung von MyBP würde anzeigen, dass die MKKs durch MEKK1 aktiviert werden konnten. Damit könnte ein grundsätzlicher Erfolg des Experimentes überprüft werden.

Diese Ergebnisse lassen zwar vermuten, dass keine der MKKs ein Substrat für EDR1 darstellt, jedoch kann diese Annahme nicht vollständig ausgeschlossen werden, da bisher in keiner Veröffentlichung über die direkte Phosphorylierung einer MAP2K durch eine MAPKKK in Pflanzen berichtet wurde. Asai *et al.* (2002) gelang zwar der Nachweis, dass die durch MEKK1 aktivierte MKK5 eine Phosphorylierung von MPK6 bewirkte, jedoch wurde keine direkte Phosphorylierung der MAPKK MKK5 gezeigt. Die bisher identifizierten MAPK-Kaskaden wurden durch Y2H-Versuche, also durch den Nachweis einer physischen Interaktion zwischen den Kinasen aufgeklärt. Interessante Ergebnisse lieferten Studien von Kong *et al.* (2012), in denen eine Phosphorylierung der MAPKKK MEKK2 durch die MAP-Kinase MPK4 nachgewiesen wurde. Die Kaskade, an der MEKK2 beteiligt sein könnte, ist dabei bisher unbekannt. Allerdings steht dieses Resultat im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass eine MAPKKK nicht als ein Substrat für eine MAP-Kinase fungiert, da sie in der Kaskade oberhalb der MAP-Kinasen eingeordnet wird. Die Autoren vermuten, dass durch die Phosphorylierung von MEKK2 durch MPK4 eine weitere MAPK-Kaskade aktiviert wird, die ihrerseits wieder bestimmte andere Substrate aktivieren kann. Möglicherweise stellt EDR1 ebenfalls ein Substrat dar, welches durch eine andere Kinase aktiviert wird und dabei selbst aber nicht zwingend erneut eine MAPK-Kaskade aktiviert. Weiterhin phosphoryliert EDR1 möglicherweise nicht direkt eine MAPKK sondern analog zu der MAPKKK MEKK1 ein in der Kaskade weiter unterhalb angeordnetes Substrat. Wie Miao *et al.* (2007) berichteten, ist

MEKK1 *in vitro* in der Lage, den an Seneszenz-Prozessen beteiligten Transkriptionsfaktor WRKY53 direkt zu phosphorylieren und mit ihm im Bimolekularen Fluoreszenz-Komplementations-Assay zu interagieren.

Es bleibt somit offen, welche Komponenten ober- und unterhalb von EDR1 agieren und möglicherweise stellt EDR1 keine typische MAPKKK dar, die nach dem bisher geltenden Modell eine MAPKK als Substrat nutzt. Zwar wurden durch Tang und Innes (2002) eine Kinaseaktivität für EDR1 und in der vorliegenden Arbeit eine Autophosphorylierung der EDR1-KD nachgewiesen (Abbildung 3.24), solange jedoch kein physiologisches Substrat identifiziert wird, kann die Bedeutung von EDR1 für Signaltransduktionen nicht beurteilt werden. Analog zu EDR1 konnte für CTR1 bisher lediglich die Fähigkeit zur Phosphorylierung des artifiziellen Substrates MyBP und zur Autophosphorylierung gezeigt werden (Huang 2003), jedoch ermöglichten genetische Analysen die weitestgehende Aufklärung der MAPK-Kaskade, an der CTR1 beteiligt ist (Yoo *et al.*, 2008). Demnach ist CTR1 ein Negativregulator der Ethylen-Signaltransduktion und verhindert wahrscheinlich durch die Inaktivierung der MKK9-MPK3/MPK6-Kaskade und des damit verbundenen Abbaus des Transkriptionsfaktors EIN3 die Expression Ethylen-responsiver Gene.

Gezielte Analysen mit Hilfe eines Y2H-Assays könnten zeigen, ob eine Interaktion zwischen EDR1 und einer der MKKs stattfindet und diese somit als physiologisches Substrat in Frage kommt. Y2H-Experimente mit dem EDR1-Protein aus Wildtyp und *erp6*-Mutante könnten Aufschluss darüber geben, ob es aufgrund des Aminosäureaustausches zu einer Modifizierung des Substratspektrums kommt, wodurch ebenfalls Hinweise auf mögliche Interaktionspartner erlangt werden könnten. Da in bisherigen Y2H-Untersuchungen mit der EDR1-KD keine validierten Interaktionspartner identifiziert werden konnten (Christiansen, 2008), sollten diese Untersuchungen mit dem vollständigen EDR1-Protein aus Wildtyp und *erp6*-Mutante durchgeführt werden. Möglicherweise konnte in bisherigen Analysen keine Interaktion beobachtet werden, da zusätzlich zur Kinasedomäne weitere, eventuell regulatorisch aktive Domänen erforderlich sind, um eine Interaktion mit putativen Substraten und eine anschließende Phosphorylierung zu etablieren. Die von Kong *et al.* (2012) beschriebene Interaktion von MPK4 im Y2H-Assay nur mit der N-terminalen Region von MEKK2, aber nicht dem C-Terminus inklusive der Kinasedomäne, sprechen für diese Hypothese. Weiterhin vermuteten bereits Ichimura *et al.* (1998), dass es nach Deletion des N-terminalen regulatorischen Bereiches von MEKK1 zu einer Aktivierung anderer Kinasen kommt und die eigentliche Funktion der MAPKKK nicht ermittelt werden kann.

Um die in Kapitel 4.1 bis 4.4 diskutierten Ergebnisse zusammenzufassen, ist in Abbildung 4.4 eine Hypothese über die Funktion von EDR1 als Negativregulator verschiedener zellulärer Reaktionen in Folge von abiotischem Stress bzw. nach Behandlung mit *P. infestans* als Modell dargestellt.

Wird in Arabidopsis ein abiotischer Stress wahrgenommen, wie z. B. Trockenstress, führt dies unter anderem zur Aktivierung einer Signalkaskade, an der EDR1 als MAPKKK beteiligt ist. In Wildtyppflanzen der Accession Col-0 wird durch ein aktives/intaktes EDR1-Protein (EDR1^a) die Ausprägung von Zelltod bzw. nekrotischen Läsionen reprimiert. Dahingegen führt der Aminosäureaustausch in *erp6* bzw. die fehlende Kinasedomäne in *edr1-1* zu einem Verlust der Kinaseaktivität und somit inaktivem EDR1-Protein (EDR1ⁱ), wodurch es zur Ausprägung von Zelltod und nekrotischen Läsionen kommt (Abbildung 4.4a). Eine mögliche Beteiligung des Hormons SA an der Ausprägung dieser Phänotypen wurde bisher nicht untersucht und könnte in weiterführenden Experimenten analysiert werden.

Den Ausgangspunkt einer Interaktion mit dem hemibiotrophen Oomyceten *P. infestans* bilden Sporen des Pathogens, die auf die Blattoberfläche gelangt sind und sich enzystiert haben. Nach Keimung einer Zyste erfolgen die Bildung eines Appressoriums und der Versuch, mit Hilfe einer Penetrationshyphs die Cuticula und Zellwand der Pflanze zu durchdringen. Im Rahmen dieses Prozesses werden PAMPs von entsprechenden Plasmamembranständigen Rezeptoren der Pflanze perzipiert. Daraufhin werden diverse Abwehrmechanismen aktiviert, die unter anderem die Penetrationsresistenz gewährleisten. Teil dieser ersten Abwehrebene sind die Peroxisom-assoziierte Myrosinase PEN2 und der Plasmamembranlokalisierte ABC-Transporter PEN3. Dabei werden durch PEN2 putativ toxische Substanzen aus Indolderivatglucosinolaten freigesetzt, die mit Hilfe von PEN3 in den Apoplast transferiert werden, wo sie an der Stelle des Penetrationsversuches gegen das Pathogen wirken können. Obwohl die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nicht darauf hindeuten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch EDR1 eine Funktion in der prä-invasiven Abwehr einnimmt.

Zusätzlich zur Penetrationsresistenz verfügen Pflanzen über post-invasive Abwehrmechanismen, die im Falle einer erfolgreichen Penetration ein weiteres Eindringen des Pathogens verhindern sollen. Diese Abwehrreaktionen involvieren u. a. die Bildung von Callose-haltigen Papillen am Ort der versuchten Penetration und möglicherweise die Aktivierung von MAPK-Kaskaden, die EDR1 als MPKKK beinhalten. In Col-0-Pflanzen sorgt ein intaktes EDR1-Protein (EDR1^a) für eine kontrollierte Ablagerung von Callose im Mesophyll und Ausprägung von Zelltod. Möglicherweise unterdrückt EDR1 im Wildtyp eine unnötige Initiierung dieser Prozesse um somit die allgemeine Fitness der Pflanze zu unterstützen, indem energetisch ungünstige zelluläre Reaktionen verhindert werden.

Dahingegen scheint die Mutation in *erp6* bzw. *edr1-1* zu einem Verlust der EDR1-Aktivität bzw. des Proteins zu führen, wodurch diese Feinregulation entfällt. Aufgrund eines inaktiven

bzw. fehlenden EDR1-Proteins (EDR1ⁱ) kann nach Inokulation mit *P. infestans* eine makroskopisch sichtbare HR beobachtet werden, die in Abhängigkeit des Hormons SA ausgebildet wird. Weiterhin führt der Verlust der EDR1-Aktivität zu Calloseablagerungen im Mesophyll inokulierter Blattbereiche. Eine Beteiligung der Callose-Synthase PMR4 an der Ausprägung dieses Phänotyps scheint möglich, konnte jedoch noch nicht abschließend untersucht werden (Abbildung 4.4b).

Im Modell wurde vorerst nur der Einfluss von EDR1 auf den Zelltod im Mesophyll berücksichtigt. Eine mögliche Beteiligung am Zelltod in der Epidermis, der in *edr1-1* und *erp6* ähnlich stark wie in Col-0 ausgeprägt ist, müsste in weiterführenden Untersuchungen noch analysiert werden.

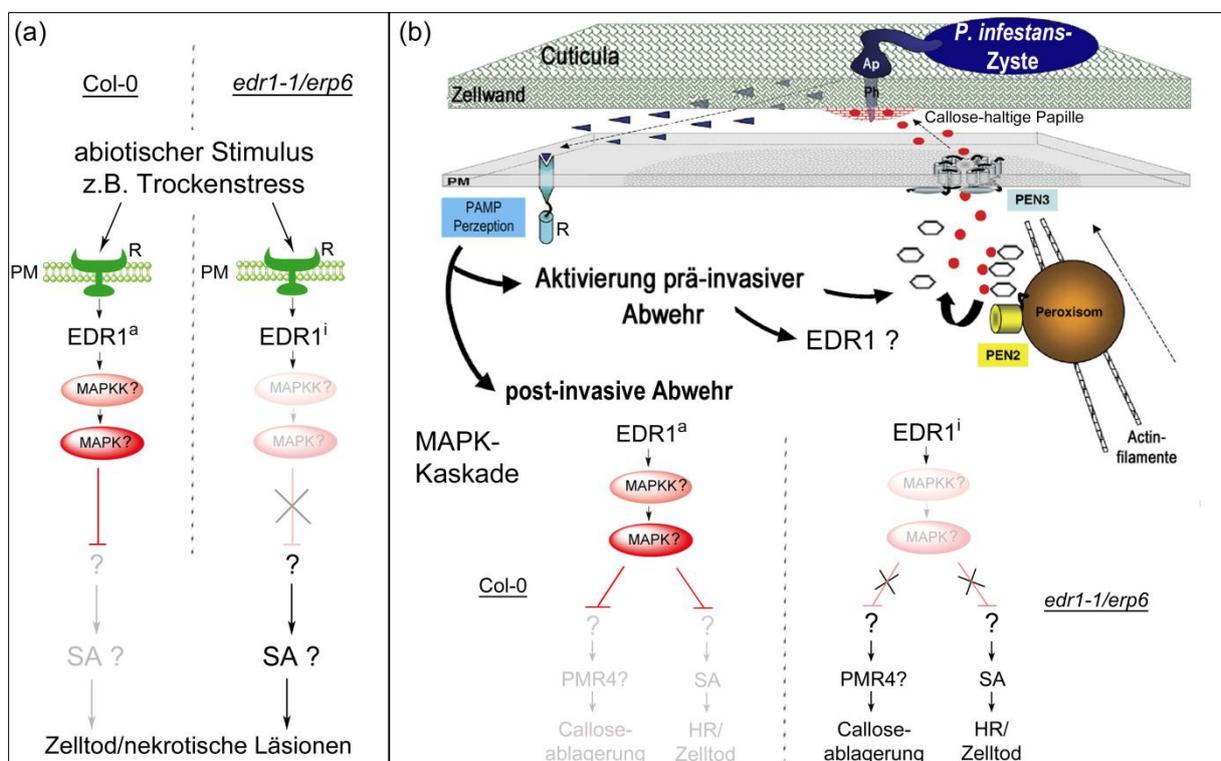


Abbildung 4.4: Modell für die Funktion von EDR1 als Negativregulator verschiedener zellulärer Reaktionen unter (a)biotischem Stress

Schematisch dargestellt ist die mögliche Beteiligung von EDR1 an der Reaktion auf abiotischen Stress (a) bzw. Behandlung mit dem Pathogen *P. infestans* (b, Modell modifiziert nach Lipka *et al.* 2010). PM = Plasmamembran, R = Rezeptor, EDR1^a = aktives EDR1-Protein, EDR1ⁱ = inaktives EDR1-Protein, MAPKK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase, Ap = Appressorium, Ph = Penetrationshyph, PAMP = Pathogen-associated molecular pattern (blaue Dreiecke), PEN2/3 = Penetration2/3, rot umrahmte Rechtecke = Zellwand-Vorläufer-Verbindungen; rote Kreise = putativ toxische Indolderivat-Verbindungen; Hexagon = Glukose; PMR4 = Powdery Mildew Resistant4, SA = salicylic acid (Salizylsäure), HR = hypersensitive Reaktion; detaillierte Beschreibung siehe Text.

5. Zusammenfassung

Neben der Myrosinase PEN2 und dem ABC-Transporter PEN3 sind noch keine weiteren Komponenten bekannt, die in der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurde die *pen2*-Mutante, die eine eingeschränkte Penetrationsresistenz gegen *Phytophthora* aufweist, einer EMS-Mutagenese unterzogen. Insgesamt wurden 14 Mutanten selektiert, die einen verstärkten HR-Phänotyp nach Inokulation mit *P. infestans* aufwiesen und deshalb die Bezeichnung *enhanced response to Phytophthora infestans* (*erp*)-Mutanten erhielten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Mutanten *pen2erp2* und *pen2erp6* näher analysiert. Für beide Mutanten konnte nach quantitativer Auswertung der Trypanblaufärbung inokulierter Blätter bestätigt werden, dass sie im Vergleich zu *pen2* eine signifikant stärkere Zelltodreaktion aufweisen. Zur weiteren Charakterisierung wurde für *pen2erp2* in einem Microarray-Experiment untersucht, welche Gene nach Wasserbehandlung bzw. Inokulation mit *P. infestans* differentiell exprimiert wurden. Anhand Computer-gestützter Auswertungen wurden Kandidatengene identifiziert und erste Experimente mit verschiedenen T-DNA-Insertionslinien durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, dass die in *pen2erp6* vorliegende Aminosäuresubstitution in der putativen MAPKKK EDR1 für die morphologischen Veränderungen und den HR-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation verantwortlich ist. Die beobachtete HR ist dabei durch Zelltod und Calloseablagerungen im Mesophyll charakterisiert. Verschiedene Experimente mit der aus einer Rückkreuzung isolierten *erp6*-Mutante und zwei aus der Literatur bekannten *EDR1*-Nullmutanten (*edr1-1*, *edr1-2*) bestätigten die beobachteten Phänotypen. Da die Penetrationsresistenz im vorliegenden Fall nicht beeinträchtigt ist, scheint EDR1 an der post-invasiven Abwehr von *P. infestans* beteiligt zu sein, jedoch kann eine Mitwirkung an der Penetrationsabwehr auch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Kreuzungen von *edr1*-Mutanten mit der Salizylat-Biosynthesemutante *sid2* zeigten die SA-Abhängigkeit der nach *P. infestans*-Inokulation beobachteten HR. Experimente mit der rekombinant exprimierten Kinasedomäne von EDR1 deuten darauf hin, dass die *erp6*-Mutation in EDR1 zu einem Verlust der Autophosphorylierungsaktivität führt. Dieses Ergebnis korreliert mit einer deutlich geringeren Anzahl an Phosphorylierungsereignissen der EDR1-Kinasedomäne aus *erp6* im Vergleich zum Wildtypprotein.

Zusätzlich zur Identifizierung von EDR1 als Komponente der Nichtwirtsinteraktion von Arabidopsis gegen *P. infestans* konnten erstmals Hinweise auf eine Beteiligung von EDR1 an der PTI gegen bakterielle Pathogene erhalten werden. Die *edr1*-Mutanten *erp6* und *edr1-1* reagierten auf die PAMPs flg22 und elf18 mit einer signifikant stärkeren Inhibierung des Wurzelwachstums bzw. Verringerung des Keimlingfrischgewichtes.

Die durchgeführten Kinaseassays konnten keine der eingesetzten MKKs aus *A. thaliana* als Substrate für EDR1 identifizieren. Y2H-Assays mit dem Gesamtprotein aus Wildtyp und *erp6* könnten zukünftig zur Identifizierung physiologischer Substrate von EDR1 beitragen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der EDR1-Aktivität zu einer veränderten Reaktion von *A. thaliana* auf das nicht-adaptierte hemibiotrophe Pathogen *P. infestans* führt. EDR1 ist dabei möglicherweise nicht Teil der prä-invasiven Resistenz, wie es für die Interaktion von Arabidopsis mit verschiedenen *Colletotrichum*-Spezies belegt ist. Der beobachtete Zelltod und die Calloseablagerungen im Mesophyll der *edr1*-Mutanten weisen auf eine Beteiligung an post-invasiven Abwehrmechanismen hin. Da auf keiner der untersuchten Mutanten eine Durchbrechung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beobachtet werden konnte, ist von der Existenz weiterer Abwehrkomponenten auszugehen. Die Einkreuzung verschiedener Mutationen in *pen2erp6* oder *pen2edr1-1*, eine Remutagenese dieser Mutanten und die Durchführung von Microarray-Experimenten könnten zur Identifizierung dieser Komponenten beitragen.

6. Anhang

zu Kapitel 1.1.1: Pflanzliche Pathogenperzeption

Tabelle 6.1: Übersicht der AGI-Nummern der in der Einleitung aufgeführten Gene

Gen	AGI-Nummer	Gen	AGI-Nummer
<i>ABI5</i>	<i>At2g36270</i>	<i>PAD3</i>	<i>At3g26830</i>
<i>ATAF1</i>	<i>At1g01720</i>	<i>PAD4</i>	<i>At3g52430</i>
<i>ATAF2</i>	<i>At5g08790</i>	<i>PDF1.2</i>	<i>At5g44420</i>
<i>CTR1</i>	<i>At5g03730</i>	<i>PEN1</i>	<i>At3g11820</i>
<i>CUC2</i>	<i>At5g53950</i>	<i>PEN2</i>	<i>At2g44490</i>
<i>EDR1</i>	<i>At1g08720</i>	<i>PEN3</i>	<i>At1g59870</i>
<i>EDS1</i>	<i>At3g48090</i>	<i>PR1</i>	<i>At2g14610</i>
<i>EIN2</i>	<i>At5g03280</i>	<i>PR2</i>	<i>At3g57260</i>
<i>GSL5</i>	<i>At4g03550</i>	<i>PR5</i>	<i>At1g75040</i>
<i>HPR1</i>	<i>At5g09860</i>	<i>RD29A</i>	<i>At5g52310</i>
<i>KEG</i>	<i>At5g13530</i>	<i>RPN1a</i>	<i>At2g20580</i>
<i>MYC2</i>	<i>At1g32640</i>	<i>SAG101</i>	<i>At5g14930</i>
<i>NAM</i>	<i>At1g52880</i>		

zu Kapitel 2.1.2: Pflanzen

Tabelle 6.2: Verwendete Ökotypen und T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana*

Mutante	genetischer Hintergrund	Referenz
<i>edr1-1 (At1g08720)</i>	Col-0	Frye und Innes (1998)
<i>gl1-1 (At3g27920)</i>	Col-3	Lee-Chen und Steinitz-Sears (1967)
<i>pen2-1 (At2g44490)</i>	Col-3 <i>gl1-1</i>	Lipka <i>et al.</i> (2005)
<i>pmr4-1 (At4g03550)</i>	Col-0	Vogel und Somerville (2000)
<i>sid2-1 (At1g74710)</i>	Col-0	Nawrath und Metraux (1999)
<i>pen2-1edr1-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	AG Schulze-Lefert, MPIPZ Köln
<i>pen2-1erp6</i>	Col-3 <i>gl1-1</i>	diese Arbeit
<i>pen2-1pmr4-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	Kopischke (2012)
<i>pen2-1erp6sid2-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	diese Arbeit
<i>pen2-1edr1-1sid2-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	diese Arbeit
<i>pen2-1erp6pmr4-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	diese Arbeit
<i>pen2-1edr1-1pmr4-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> /Col-0	diese Arbeit
T-DNA-Linie	genetischer Hintergrund	Herkunft
SALK_053889 (<i>edr1-2</i>)	Col-0	NASC
SALK_119307 (<i>edr1-5</i>)	Col-0	NASC
SALK_057618C (<i>ataf1</i>)	Col-0	NASC

zu Kapitel 2.1.11: PCR und Kolonie-PCR

Tabelle 6.3: Übersicht der verwendeten Primer zum Nachweis verschiedener Mutationen

Allel, PCR-Typ	Primername	Primersequenz (5' → 3')	Restriktionsenzym	erwartete Fragmente
<i>erp6</i> , CAPS	edr9-f	aatctgggggtacggcttctt	<i>TaqI</i>	WT: 750 bp
	edr9-r	cagcatagcggcctttccta		Mut.: 498 bp, 252 bp
<i>edr1-1</i> , TPAP	EDR1_TPAP_IPF	cagaggctgaaaggacagattctcaaac	entfällt	WT: 331 bp, 156 bp
	EDR1_TPAP_IPR	tatgttccgaagtggcccaccttctgc		Mut.: 331 bp, 253 bp
	EDR1_TPAP_OPF2	agtactgggtgatcttatgacagatcctg		
	EDR1_TPAP_OPR2	tttgggtcttctcactgttctgat		
<i>pen2-1</i> , CAPS	PEN2C-F	tgtgctgaaaatttgaagttga	<i>AclI</i>	WT: 504 bp, 361 bp
	PEN2C-R	ggcgatcgattgtcgtaaa		Mut.: 865 bp
<i>pnr4-1</i> , CAPS	pnr4-1-CAPS-F	agatcaggacatgggacag	<i>CfrI</i>	WT: 482 bp, 317 bp
	pnr4-1-CAPS-R	ttaccagccaaccaatttc		Mut.: 799 bp
<i>sid2-1</i> , CAPS	sid2-CAPS-F	tgctgcagtgaaagcttgg	<i>MunI</i>	WT: 404 bp, 376 bp
	sid2-CAPS-R	cccgactgcaaattcactct		Mut.: 780 bp

Tabelle 6.4: Verwendete Primer zum Nachweis von T-DNA-Insertionen

KO-Linie	Primername	Primersequenz (5' → 3')	Fragmentgröße
SALK_053889	SALK_053889-LP	gtatctcaaggcatcgtgctc	1130 bp
	SALK_053889-RP	gtttccataacgaggatcacg	
SALK_119307	SALK_119307-LP	aaaactccttggttctttggc	1027 bp
	SALK_119307-RP	ctcgataacctctgggctacc	
-	LBb1.3_SALK	attttgccgatttcggaac	-

zu Kapitel 2.1.16: Sequenzspezifische Mutagenese

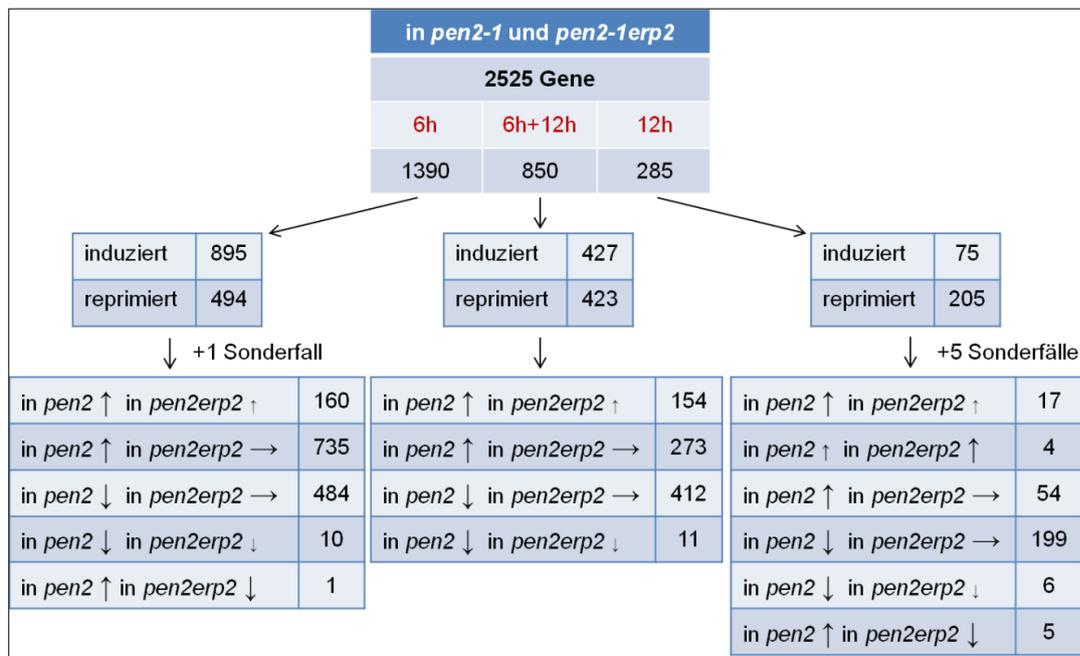
Tabelle 6.5: Verwendete Primer für die Klonierung der MKKs und deren Mutagenese

Gen	Primername	Primersequenz (5' → 3')	Verwendungszweck
At5g56580 (MKK6)	MKK6-F	atggtgaagatcaaatcgaactgaagc	Klonierung
	MKK6-R	ttatctaaggtagttaacaggtggttc	
	AtMKK6-KR-F	ggcaaattcttgctatgagggtacacagatgaatatac	Mutagenese
	AtMKK6-KR-R	gtatattcatctgatgacctccatagcaaagaattgccc	
At1g18350 (MKK7)	MKK7-F	atggctctgttcgtaaaccgccc	Klonierung
	MKK7-R	ctaaagactttcagggagaaaaggggtg	Mutagenese
	AtMKK7-KRfwd	ggagatatacgcctctgagatcagtcacagggcg	
	AtMKK7-KRrev	cgccgttgactgatctcagagcgtatatctcc	
At3g06230 (MKK8)	MKK8-F	atggttatggttagagataatcaattcc	Klonierung
	MKK8-R	ctatctctcgttcttcttctgcg	Mutagenese
	AtMKK8-KR-F	ctcagagatctacgcgttgaggaaagtgaaagaaaactgg	
	AtMKK8-KR-R	ccagtttcttctcacttctcaacgcgtagatctctgag	

zu Kapitel 2.1.20: Northern Blot

Tabelle 6.6: Verwendete Primer zur Sonden-Herstellung für Northern Blot-Analysen

Gen	Primernamen	Primersequenz (5' → 3')	Fragmentgröße
At1g01120	At1g01120SondeF	caactcttgcaacgtgacca	617 bp
	At1g01120SondeR	ccattcctccgaggtgtaa	
At1g62510	At1g62510SondeF	tggcttcaagaaccacaaaa	444 bp
	At1g62510SondeR	attggaagccacgaggaact	
At1g78370	At1g78370SondeF	gacgcccaattcaaggatg	513 bp
	At1g78370SondeR	tgttcttctatactcagcagca	
At2g28930	At2g28930SondeF	gggtgttgcttttgagggt	432 bp
	At2g28930SondeR	aaacagaggcgaatcagacg	
At1g08720 (EDR1)	EDR1-5-F	atcctgggacgcttataccc	935 bp
	EDR1-5-R	cttaagcctcgatcacagc	

zu Kapitel 3.1.5.2: Nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierte GeneAbbildung 6.1: Anzahl differentiell exprimierter Gene nach *P. infestans*-Behandlung

Für die Microarray-Analysen wurden in drei unabhängigen Experimenten fünf Wochen alte Pflanzen mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert und nach 6 und 12h geerntet. Dargestellt ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene sowohl nach Genotypen als auch Zeitpunkten getrennt. Detaillierter ist die Anzahl der Gene dargestellt, die sowohl in *pen2-1* als auch *pen2-1erp2* auftreten (unten; ↑ = induziert, ↑ = weniger stark induziert; ↓ = reprimiert, ↓ = weniger stark reprimiert; → = gleichbleibend; Sonderfälle sind Gene, die in *pen2-1* induziert, in *pen2-1erp2* jedoch reprimiert sind). Die Auswertung erfolgte mittels Robin (Lohse *et al.* 2010) $p < 0,05$, $fold\ change \geq 2$.

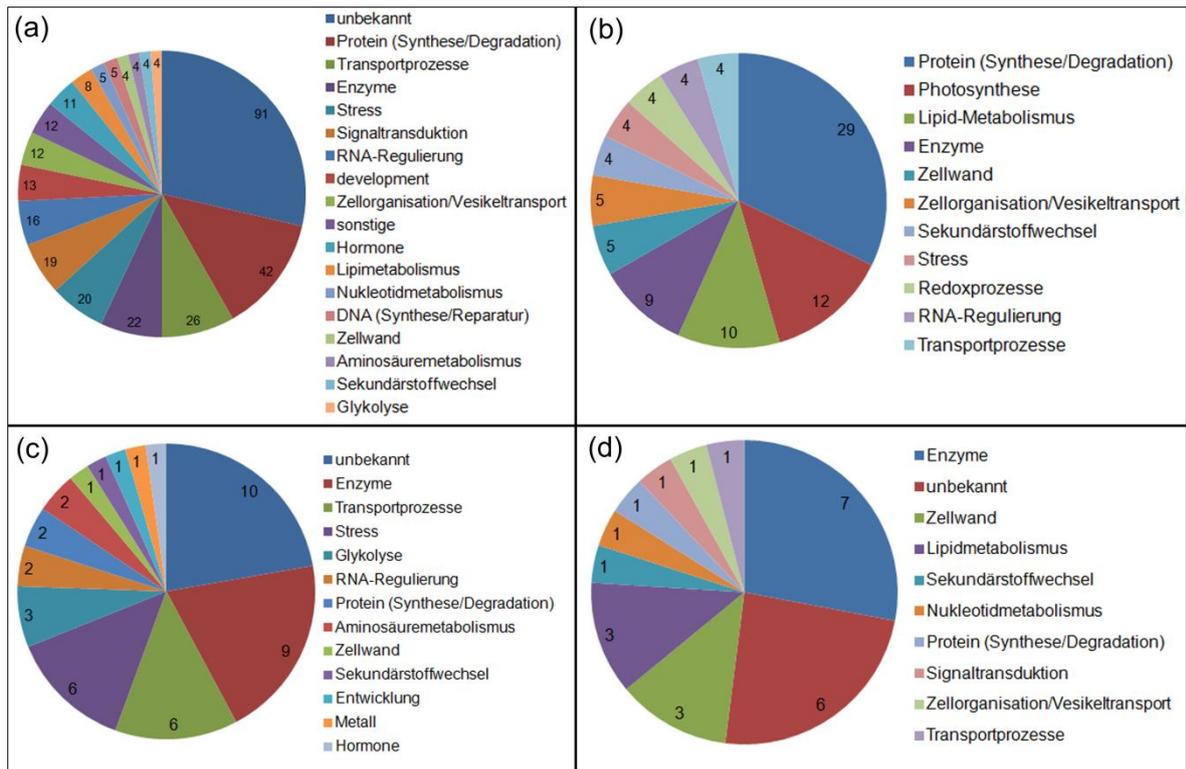
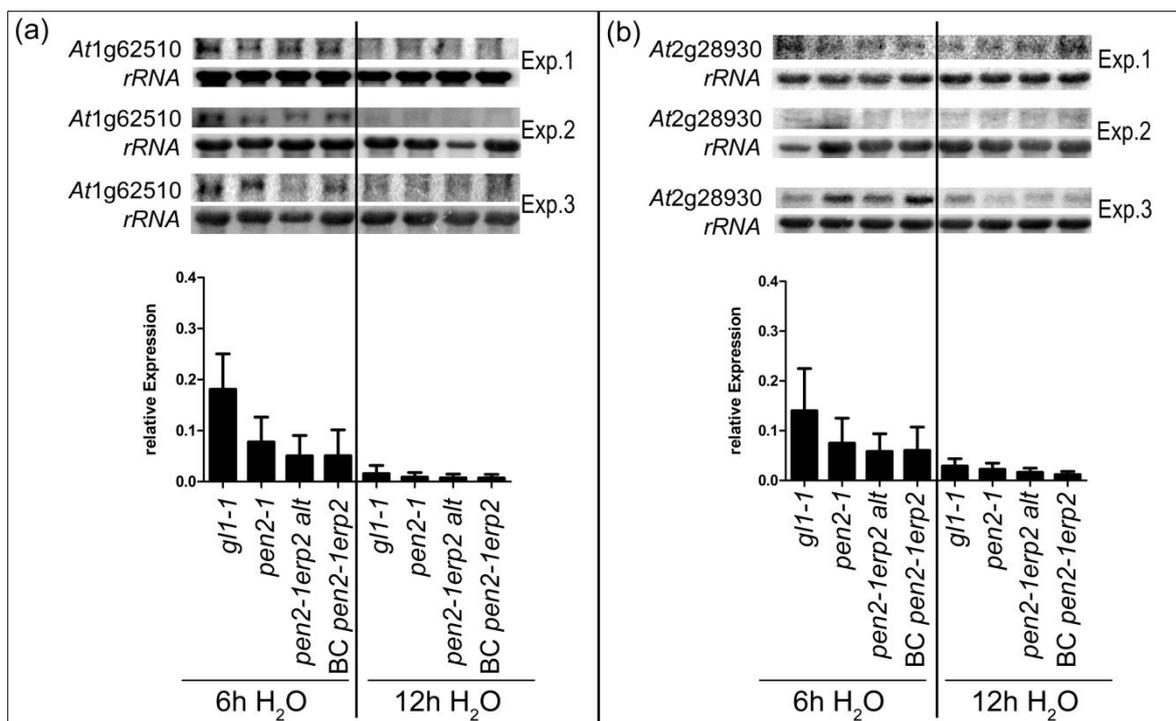


Abbildung 6.2: Einteilung der nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierten Gene in Funktionsklassen. Dargestellt ist die funktionelle Einteilung der Gene, die 6 h und 12 h nach *P. infestans*-Behandlung induziert (a) oder reprimiert waren (b) bzw. die nur zum 12 h-Zeitpunkt induziert (c) oder reprimiert (d) vorlagen.

zu Kapitel 3.1.5.3: Überprüfung von Microarray-Ergebnissen durch Northern-Hybridisierung



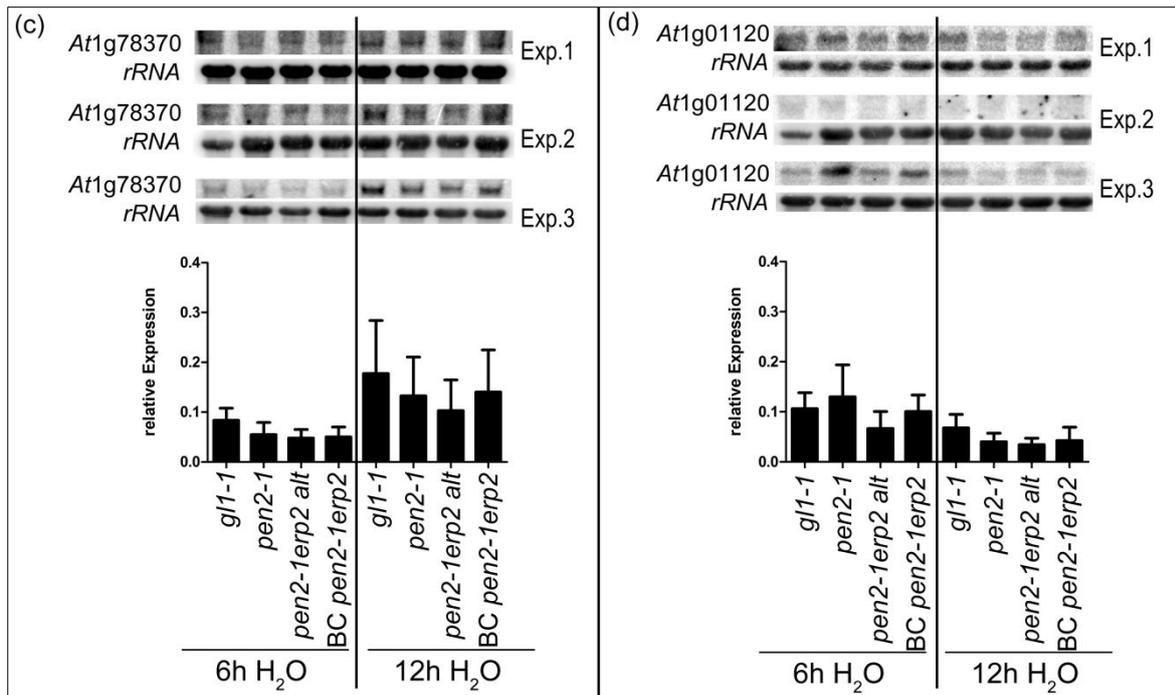


Abbildung 6.3: Überprüfung der Microarray-Auswertung mittels Northern Blot-Analyse. In drei unabhängigen Experimenten wurden fünf Wochen alte Pflanzen mit Wasser bis zur Tropfenbildung besprüht und nach 6 bzw. 12 h geerntet. Die Membranen für die Northern-Hybridisierungen wurden mit 10 µg Total-RNA je Genotyp hergestellt und mit einem radioaktiv markierten Fragment des jeweils zu untersuchenden Gens hybridisiert (oben). Nach erneuter Hybridisierung der Membran mit einer rRNA-Sonde wurden die Signalintensitäten gegen das rRNA-Signal normalisiert und quantitativ ausgewertet (unten). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler für die zusammengefassten Daten aus drei Experimenten (n = 3). Zur statistischen Analyse wurde eine 1-Wegs-ANOVA verwendet.

zu Kapitel 3.2.3.2: HR-Phänotyp und Morphologie verschiedener *edr1*-Mutanten

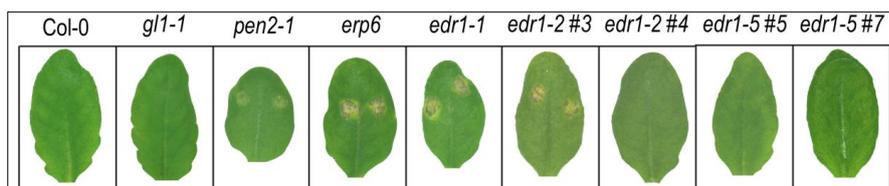


Abbildung 6.4: HR-Phänotyp der verschiedenen *edr1*-Mutanten sechs Tage nach *P. infestans*-Inokulation. Rosettenblätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ml) inokuliert und sechs Tage später fotografiert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Blatt aus einem Experiment mit insgesamt 15-20 Blättern von je 3 Pflanzen pro Genotyp. Das Experiment wurde zweimal wiederholt, mit ähnlichen Ergebnissen.

zu Kapitel 3.2.3.5: Erzeugung einer *pen2-1edr1-2*-Mutante

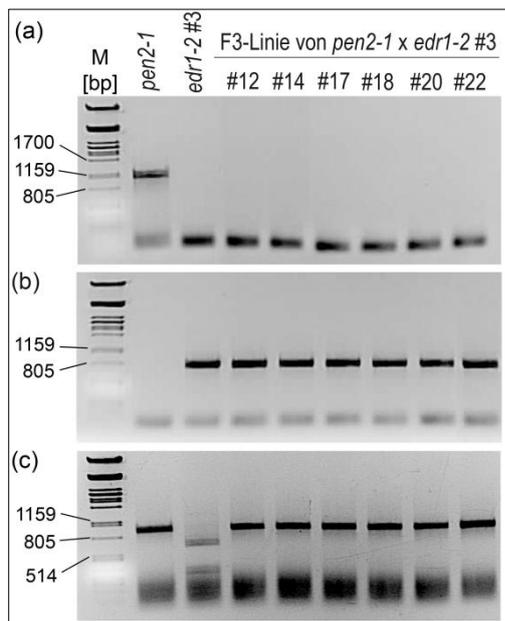


Abbildung 6.5: Genotypisierung von F3-Linien der Kreuzung *pen2-1* mit *edr1-2*

Für den Nachweis der T-DNA-Insertion wurden eine PCR mit zwei genspezifischen Primern für *EDR1* (a) sowie einem genspezifischen *EDR1*-Primer und dem Border-primern Lb1.3_SALK (b) durchgeführt und auf einem 2 %-Agarosegel analysiert. Für den Nachweis der *pen2*-Mutation wurde ein allelspezifischer CAPS-Marker eingesetzt. Durch eine Nukleotidsubstitution in *PEN2* entfällt eine Schnittstelle für *A/M*, so dass das 865bp-große PCR-Fragment nur im Wildtyp in ein 504bp- und 361 bp-großes Fragment geschnitten wird. Als Größenstandard (M) auf den 2 %-Agarosegelen diente mit *Pst*I verdauete DNA des Phagen Lambda.

zu Kapitel 3.2.4.3: Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in der EDR1-Kinasedomäne

Tabelle 6.7: Detektierte Phosphorylierungsstellen in der Kinasedomäne von EDR1

Die angegebene Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf das native Protein. Aus dem mittels der Scaffold PTM-Software ermittelten Ascore wurde eine Wahrscheinlichkeit für die Korrektheit der detektierten Phosphorylierungsstelle berechnet. Abgebildet sind die Resultate aus einem Experiment mit je zwei Proben der Kinasedomäne aus Wildtyp und der *erp6*-Mutante. In den vier rechten Spalten ist die Anzahl der erhaltenen Massenspektren aufgeführt. Zwei Wiederholungen lieferten ähnliche Ergebnisse.

Aminosäure	Wahrscheinlichkeit der Lokalisierung [%]	Probe 1 Mutante	Probe 2 Mutante	Probe 1 Wildtyp	Probe 2 Wildtyp
T691	99,990374	0	0	4	0
S704	100	0	0	3	0
S713	99,999154	0	0	1	0
S760	100	0	0	22	130
T795	100	0	0	10	0
S814	100	7	2	61	123
T820	99,999994	1	0	3	11
S823	97,92727	0	0	0	1
T830	99,25188	0	0	0	1
T931	100	0	0	2	1

zu Kapitel 3.2.5.1: Analyse potentieller EDR1-Substrate

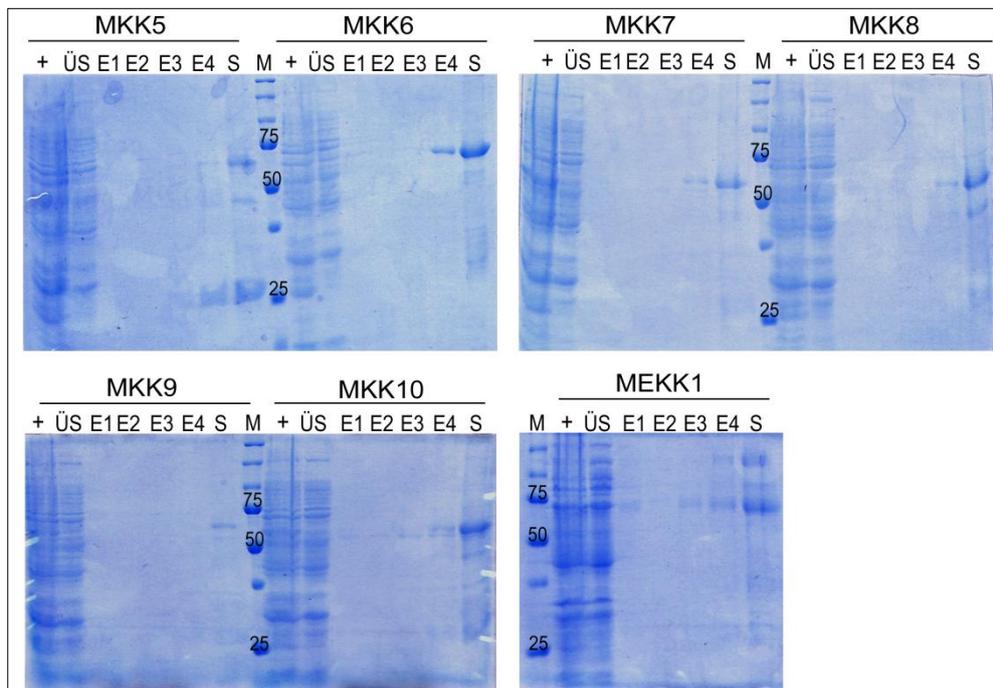


Abbildung 6.6: Aufreinigung von MKK5 bis MKK10 und MEKK1. Nach der rekombinanten Expression der MKKs in *E. coli* folgte die Proteinextraktion und -aufreinigung. Während dieser Prozesse wurden Proben entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE (12 %-Gel, M = Größenstandard [kDa]) und Coomassiefärbung analysiert. + = induziert; ÜS = Überstand; E1-E4 = Elutionsfraktionen; S = Sepharose).

zu Kapitel 4.3: Einfluss der Aminosäuresubstitution in *erp6* auf die Funktion von
EDR1

<i>A. thaliana</i>	-LVIAERIGL	GSYGEVYHAD	WHGTEVAVKK	FLDQDFS	CAA	LAEFRSEVRI
<i>A. lyrata</i>	DLVIGERIGL	GSYGEVYHAD	WHGTEVAVKK	FLDQDFS	CAA	LAEFRSEVRI
<i>G. max</i>	DLVLGERIGI	GSYGEVYHAD	WNGTEVAVKK	FLDQDFS	CAA	LSEFKREVRI
<i>O. sativa</i>	DLVIGERIGL	GSYGEVYRAD	WNGTEVAVKK	FLDQDFY	GDA	LDEFRSEVRI
<i>H. vulgare</i>	DLVIDERIGI	GSYGEVYHAD	WNGTEVAVKK	FLDQEFY	GDA	LEEFRCEVRI
<i>T. aestivum</i>	DLVIDERIGI	GSYGEVYHAD	WNGTEVAVKK	FLDQEFY	GDA	LEEFRCEVRI
<i>A. thaliana</i>	MRRLRHPNVV	FFLGAVTRPP	NLSIVTEFLP	RGSLYRILHR	PKSHID	ERRR
<i>A. lyrata</i>	MRRLRHPNVV	FFLGAVTRPP	NLSIVTEFLP	RGSLYRILHR	PKSHID	ERRR
<i>G. max</i>	MRRLRHPNIV	LFMGAVTRPP	NLSIISEYLP	RGSLYRILHR	PNCQIDEKRR	
<i>O. sativa</i>	MRRLRHPNIV	LFMGAVTRPP	NLSIVSEYLP	RGSLYKILHR	PNCQIDEKRR	
<i>H. vulgare</i>	MRRLRHPNIV	LFMGAVTRPP	HLSIVSEYLP	RGSLYKIIHR	PNCQIDEKRR	
<i>T. aestivum</i>	MRRLRHPNIV	LFMGAVTRPP	HLSIVSEYLP	RGSLYKIIHR	PNCQIDEKRR	
<i>A. thaliana</i>	IKMALDVAMG	MNCLHSTPT	IVHRDLKTPN	LLVDNNWNVK	VGDFGLSRLK	
<i>A. lyrata</i>	IKMALDVAMG	MNCLHSTPT	IVHRDLKTPN	LLVDNNWNVK	VGDFGLSRLK	
<i>G. max</i>	IKMALDVARG	MNCLHSTPT	IVHRDLKSPN	LLVDKNWNVK	VCDFGLSRLK	
<i>O. sativa</i>	IKMALDVAKG	MNCLHISVPT	IVHRDLKSPN	LLVDNNWNVK	VCDFGLSRLK	
<i>H. vulgare</i>	IKMALDVARG	MNCLHSTVPT	IVHRDLKSPN	LLVDDNWTVK	VCDFGLSRLK	
<i>T. aestivum</i>	IKMALDVARG	MNCLHSTVPT	IVHRDLKSPN	LLVDDNWTVK	VCDFGLSRLK	
<i>A. thaliana</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW	
<i>A. lyrata</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW	
<i>G. max</i>	HNTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEPSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRLPW	
<i>O. sativa</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDVYSFGVIL	WELATLRMPW	
<i>H. vulgare</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW	
<i>T. aestivum</i>	HSTFLSSKST	AGTPEWMAPE	VLRNEQSNEK	CDIYSFGVIL	WELATLRKPW	
<i>A. thaliana</i>	RGMNPMQVVG	AVGFQNRRLD	IPKELDPVVG	RIILECWQTD	PNLRPSFAQL	
<i>A. lyrata</i>	RGMNPMQVVG	AVGFQNRRLD	IPKELDPVVG	RIILECWQTD	PNLRPSFAQL	
<i>G. max</i>	SGMNPMPQVVG	AVGFQNRRLD	IPKEVDPIVA	RIIWECWQD	PNLRPSFAQL	
<i>O. sativa</i>	SGMNPMPQVVG	AVGFQDKRRLD	IPKEIDPLVA	RIIWECWQKD	PNLRPSFAQL	
<i>H. vulgare</i>	HGMNPMQVVG	AVGFQDRRLD	IPKEVDPIVA	SIIRDCWQKD	PNLRPSFIQL	
<i>T. aestivum</i>	HGMNPMQVVG	AVGFQDRRLD	IPKEVDPIVA	SIIRDCWQKD	PNLRPSFIQL	
<i>A. thaliana</i>	TEVLKPLNRL	VLPTPQ----	-----	----		
<i>A. lyrata</i>	TEVLKPLNRL	VLPSQP----	-----	----		
<i>G. max</i>	TVALKPLQRL	VIPSHHDQVA	PPMPQEISVN	-STP		
<i>O. sativa</i>	TSALKTVQRL	VTPSHQESQS	PPVPQEIWVN	SSTP		
<i>H. vulgare</i>	TSYLKTLQRL	VIPSHQETAS	NHVPYEISLY	R---		
<i>T. aestivum</i>	TSYLKTLQRL	VIPSHQETAS	NHVPYEISLY	R---		

α-Helix β-Faltblatt

Abbildung 6.7: Vorhergesagte Sekundärstruktur der EDR1-Kinasedomäne verschiedener Pflanzenspezies. Mit Hilfe der PRALINE-Software (Simossis und Heringa, 2005) wurde ein Abgleich der EDR1-KD aus verschiedenen Pflanzenspezies und eine *in silico* Vorhersage der Sekundärstruktur vorgenommen. Der schwarze Rahmen zeigt die durch die *erp6*-Mutation betroffene Aminosäure im Wildtyp-Protein.

zu Kapitel 4.1: Bedeutung von EDR1 in der Interaktion von *A. thaliana* mit dem nicht-adaptierten Pathogen *P. infestans*

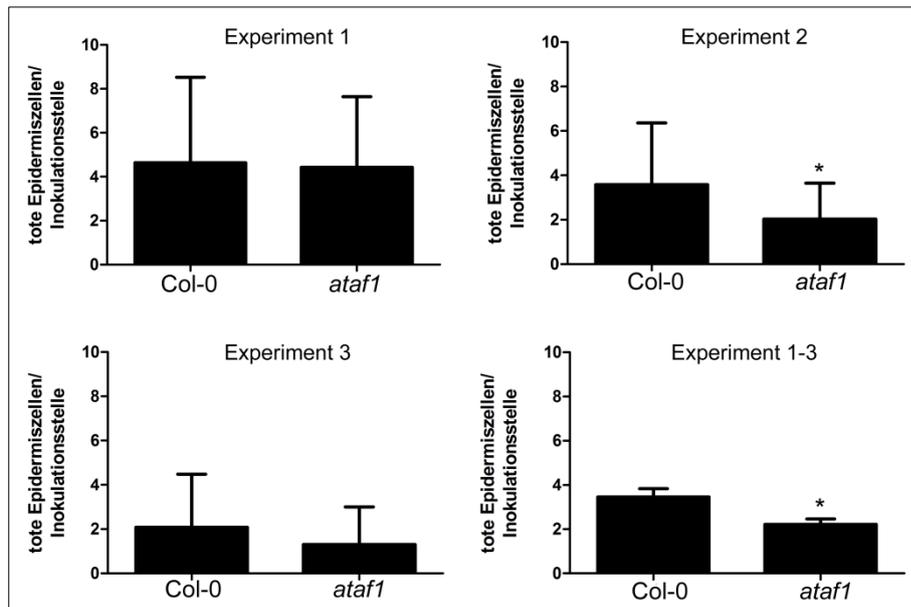


Abbildung 6.8: Anzahl toter Epidermiszellen in Blättern von *ataf1* nach *P. infestans*-Inokulation
 Blätter von fünf Wochen alten Pflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^4$ Sporen/ml) inokuliert und nach drei Tagen mit Trypanblau gefärbt. Die Auszählung toter Epidermiszellen erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei Einzelexperimenten sowie Mittelwerte und Standardfehler der zusammengefassten Daten ($n = 73$ [Col-0]; $n = 99$ [*ataf1*]). *zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle Col-0 (t-Test, $p < 0,05$).

7. Literaturverzeichnis

Die Abkürzungen der Zeitschriften wurden der Datenbank von ISI Web of Knowledge entnommen (http://images.webofknowledge.com/WOK46/help/WOS/A_abrvjt.html).

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J. und Ram, S.J.** (2004). "Image Processing with ImageJ." *J. Biophotonics* **11** (4): 36-42.
- Adam, L. und Somerville, S.C.** (1996). "Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J.* **9** (3): 341-356.
- Altmann, S.** (2009). "Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenase-abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L." *Dissertation, MLU Halle*.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, E., Schenk, P.M. et al.** (2004). "Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **16** (12): 3460-3479.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P. et al.** (2005). "The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses." *Embo J.* **24** (14): 2579-2589.
- Andreasson, E. und Ellis, B.** (2010). "Convergence and specificity in the *Arabidopsis* MAPK nexus." *Trends Plant Sci.* **15** (2): 106-113.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J. et al.** (2002). "MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity." *Nature* **415** (6875): 977-983.
- Assaad, F.F., Qiu, J.-L., Youngs, H. et al.** (2004). "The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae." *Mol. Biol. Cell* **15** (11): 5118-5129.
- Axtell, M.J. und Staskawicz, B.J.** (2003). "Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4." *Cell* **112** (3): 369-377.
- Bailey, K., Cevik, V., Holton, N. et al.** (2011). "Molecular cloning of ATR5 (Emoy2) from *Hyaloperonospora arabidopsidis*, an avirulence determinant that triggers RPP5-mediated defense in *Arabidopsis*." *MPMI* **24** (7): 827-838.
- Baldauf, S.L., Roger, A.J., Wenk-Siefert, I. und Doolittle, W.F.** (2000). "A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data." *Science* **290** (5493): 972-977.
- Beckers, G.J.M., Jaskiewicz, M., Liu, Y. et al.** (2009). "Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **21** (3): 944-953.
- Bergmann, D.C., Lukowitz, W. und Somerville, C.R.** (2004). "Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase." *Science* **304** (5676): 1494-1497.
- Bethke, G., Unthan, T., Uhrig, J.F. et al.** (2009). "Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling." *PNAS* **106** (19): 8067-8072.
- Bethke, G., Pecher, P., Eschen-Lippold, L. et al.** (2012). "Activation of the *Arabidopsis thaliana* Mitogen-Activated Protein Kinase MPK11 by the Flagellin-Derived Elicitor Peptide, flg22." *MPMI* **25** (4): 471-480.
- Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P. und Panstruga, R.** (2005). "Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain." *PNAS* **102** (8): 3135-3140.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K. et al.** (2006). "The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen." *Plos Pathog.* **2** (5): 453-465.
- Boller, T.** (1995). "Chemoperception of microbial signals in plant cells." *Annu. Rev. Plant Phys.* **46**: 189-214.
- Boller, T. und Felix, G.** (2009). "A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors". *Annu. Rev. Plant Biol.* **60**: 379-406.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M. et al.** (2010). "Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases." *Nature* **464** (7287): 418-423.

- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J. und Kamoun, S.** (2012). "Oomycetes, effectors, and all that jazz." Curr. Opin. Plant Biol. **15**: 1-10.
- Brocard, I.M., Lynch, T.J. und Finkelstein, R.R.** (2002). "Regulation and role of the *Arabidopsis Abscisic Acid-Insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response." Plant Physiol. **129** (4): 1533-1543.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J. et al.** (2002). "Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases." Embo J. **21** (24): 6681-6688.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M. et al.** (2003). "The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000." PNAS **100** (18): 10181-10186.
- Büttner, D. und He, S.Y.** (2009). "Type III protein secretion in plant pathogenic bacteria." Plant Physiol. **150** (4): 1656-1664.
- Chaiwongsar, S., Otegui, M.S., Jester, P.J., Monson, S.S. und Krysan, P.J.** (2006). "The protein kinase genes MAP3K ϵ 1 and MAP3K ϵ 2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*." Plant J. **48** (2): 193-205.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S. et al.** (2007). "A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence." Nature **448** (7152): 497-501.
- Christiansen, K.M.** (2008). "Characterization of defense responses in the *Arabidopsis thaliana* mutant *enhanced disease resistance1*". Dissertation, Indiana University.
- Cohen, Y. und Gisi, U.** (2007). "Differential activity of carboxylic acid amide fungicides against various developmental stages of *Phytophthora infestans*." Phytopathol. **97** (10): 1274-1283.
- Cohen, Y., Rubin, E., Hadad, T. et al.** (2007). "Sensitivity of *Phytophthora infestans* to mandipropamid and the effect of enforced selection pressure in the field." Plant Pathol. **56** (5): 836-842.
- Colcombet, J. und Hirt, H.** (2008). "Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes." Biochem. J. **413**: 217-226.
- Coll, N.S., Eppele, P. und Dangl, J.L.** (2011). "Programmed cell death in the plant immune system." Cell Death and Differ. **18** (8): 1247-1256.
- Collinge, M. und Boller, T.** (2001). "Differential induction of two potato genes, *Stprx2* and *StNAC*, in response to infection by *Phytophthora infestans* and to wounding." Plant Mol. Biol. **46** (5): 521-529.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V. et al.** (2003). "SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall." Nature **425** (6961): 973-977.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J. und Mauch-Mani, B.** (2002). "Priming in plant-pathogen interactions." Trends Plant Sci **7** (5): 210-216.
- Conrath, U., Beckers, G.J.M., Flors, V. et al.** (2006). "Priming: Getting ready for battle." MPMI **19** (10): 1062-1071.
- Dangl, J.L. und Jones, J.D.G.** (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411** (6839): 826-833.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. und Dangl, J.L.** (1991). "Identification and molecular mapping of a single *Arabidopsis thaliana* locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate." Plant J. **1** (3): 289-302.
- Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W. et al.** (2005). "The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in *Arabidopsis*." Plant J. **43** (5): 745-757.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N. et al.** (2003). "Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus." PNAS **100** (13): 8024-8029.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I. und Hirt, H.** (2007). "Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling." Science **318** (5849): 453-456.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M. et al.** (2006). "Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes." PNAS **103** (23): 8888-8893.

- Dodds, P.N. und Rathjen, J.P.** (2010). "Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions." Nat. Rev. Genet. **11** (8): 539-548.
- Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L. und McCafferty, J.** (2004). "Production of soluble mammalian proteins in *Escherichia coli*: identification of protein features that correlate with successful expression." BMC Biotechnol. **4**.
- Eichmann, R. und Hückelhoven, R.** (2008). "Accommodation of powdery mildew fungi in intact plant cells." J. Plant Physiol. **165** (1): 5-18.
- Ellis, J.G. und Dodds, P.N.** (2011). "Showdown at the RXLR motif: Serious differences of opinion in how effector proteins from filamentous eukaryotic pathogens enter plant cells." PNAS **108** (35): 14381-14382.
- Ernst, H.A., Olsen, A.N., Skriver, K., Larsen, S. und Lo Leggio, L.** (2004). "Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors." EMBO Rep. **5** (3): 297-303.
- Erwin, D.C. und Ribeiro, O.K.** (1996). "*Phytophthora* Diseases Worldwide". The American Phytopathology Society.
- Eschen-Lippold, L.** (2008). "Analyse der Funktion des 9-Oxylipin-Stoffwechsels und von SNARE-Homologen für die Pathogenabwehr der Kartoffel". Dissertation, MLU Halle.
- Eschen-Lippold, L., Draeger, T., Teichert, A. et al.** (2009). "Antioomycete activity of gamma-oxocrotonate fatty acids against *P. infestans*." J. Agr. Food Chem. **57** (20): 9607-9612.
- Estelle, M.A. und Somerville, C.** (1987). "Auxin resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology." Mol. Gen. Genet. **206** (2): 200-206.
- Eulgem, T.** (2005). "Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome." Trends Plant Sci **10** (2): 71-78.
- Fan, J. und Doerner, P.** (2012). "Genetic and molecular basis of NHR: complex, yes; silver bullet, no." Curr. Opin. Plant Biol. **15**: 1-7.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. und Boller, T.** (1999). "Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin." Plant J. **18** (3): 265-276.
- Flor, H.H.** (1947). "Inheritance of reaction to rust in flax." J. Agric. Res. **74**: 241-262.
- Fry, W.** (2008). "*Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer." Mol. Plant Pathol. **9** (5): 727-727.
- Frye, C.A. und Innes, R.W.** (1998). "An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew." Plant Cell **10** (6): 947-956.
- Frye, C.A., Tang, D.Z. und Innes, R.W.** (2001). "Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase." PNAS **98** (1): 373-378.
- Furumizu, C., Tsukaya, H. und Komeda, Y.** (2010). "Characterization of *EMU*, the Arabidopsis homolog of the yeast THO complex member *HPR1*." RNA **16** (9): 1809-1817.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D. et al.** (2008). "MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants." Cell Res. **18** (12): 1190-1198.
- Gaulin, E., Bottin, A. und Dumas, B.** (2010). "Sterol biosynthesis in oomycete pathogens." PSB **5** (3): 258-260.
- Gilbert, G.S. und Webb, C.O.** (2007). "Phylogenetic signal in plant pathogen-host range." PNAS **104** (12): 4979-4983.
- Glawischnig, E.** (2007). "Camalexin." Phytochemistry **68** (4): 401-406.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. und Boller, T.** (1999). "A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*." Plant J. **18** (3): 277-284.
- Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G. et al.** (2004). "Genome-wide ORFeome cloning and analysis of Arabidopsis transcription factor genes." Plant Physiol. **135** (2): 773-782.
- Goujon, M., McWilliam, H., Li, W. et al.** (2010). "A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI." Nucleic Acids Res. **38**: W695-W699.
- Gu, Y. und Innes, R.W.** (2011). "The KEEP ON GOING protein of Arabidopsis recruits the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 protein to trans-Golgi network/early endosome vesicles." Plant Physiol. **155** (4): 1827-1838.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C. et al.** (2009). "Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*." Nature **461** (7262): 393-398.

- Haldar, K., Kamoun, S., Hiller, N.L., Bhattacharje, S. und van Ooij, C.** (2006). "Common infection strategies of pathogenic eukaryotes." Nat. Rev. Microbiol. **4** (12): 922-931.
- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y. und Mackey, D.** (2007). "Layered basal defenses underlie non-host resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*." Plant J. **51** (4): 604-616.
- Hammond-Kosack, K.E. und Parker, J.E.** (2003). "Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding." Curr. Opin. Biotech. **14** (2): 177-193.
- Harrison, S.J., Mott, E.K., Parsley, K. et al.** (2006). "A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation." Plant Methods **2**: 19.
- Haverkort, A.J., Struik, P.C., Visser, R.G.F. und Jacobsen, E.** (2009). "Applied Biotechnology to combat the late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*." Potato Res. **52** (3): 249-264.
- Heath, M.C.** (1996). "Plant resistance to fungi." Can. J. Plant Pathol. **18** (4): 469-475.
- Heath, M.C.** (2000). "Nonhost resistance and nonspecific plant defenses." Curr. Opin. Plant Biol. **3** (4): 315-319.
- Hegedus, D., Yu, M., Baldwin, D. et al.** (2003). "Molecular characterization of *Brassica napus* NAC domain transcriptional activators induced in response to biotic and abiotic stress." Plant Mol. Biol. **53** (3): 383-397.
- Hiruma, K., Nishiuchi, T., Kato, T. et al.** (2011). "Arabidopsis ENHANCED DISEASE RESISTANCE 1 is required for pathogen-induced expression of plant defensins in nonhost resistance, and acts through interference of MYC2-mediated repressor function." Plant J. **67** (6): 980-992.
- Hou, S., Yang, Y. und Zhou, J.-M.** (2009). "The multilevel and dynamic interplay between plant and pathogen." PSB **4** (4): 283-293.
- Hou, S., Yang, Y., Wu, D. und Zhang, C.** (2011). "Plant immunity: evolutionary insights from PBS1, Pto, and RIN4." PSB **6** (6): 794-799.
- Huang, Y.F., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J. und Kieber, J.J.** (2003). "Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*." Plant J. **33** (2): 221-233.
- Huffaker, A., Pearce, G. und Ryan, C.A.** (2006). "An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response." PNAS **103** (26): 10098-10103.
- Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A., Francis, D.M. und Kamoun, S.** (2003). "Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*." Mol. Plant Pathol. **4** (6): 487-500.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K. et al.** (1998). "Isolation of AtMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase) - Interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*." Biochem. Biophys. Res. Co. **253** (2): 532-543.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G. et al.** (2002). "Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature." Trends Plant Sci. **7** (7): 301-308.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A. et al.** (2003). "An *Arabidopsis* callose synthase, GSL5, is required for wound and papillary callose formation." Plant Cell **15** (11): 2503-2513.
- Jarosch, B., Kogel, K.H. und Schaffrath, U.** (1999). "The ambivalence of the barley *Mlo* locus: Mutations conferring resistance against powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) enhance susceptibility to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*." MPMI **12** (6): 508-514.
- Jauvion, V., Elmayer, T. und Vaucheret, H.** (2010). "The conserved RNA trafficking proteins HPR1 and TEX1 are involved in the production of endogenous and exogenous small interfering RNA in *Arabidopsis*." Plant Cell **22** (8): 2697-2709.
- Jensen, M.K., Rung, J.H., Gregersen, P.L. et al.** (2007). "The *HvNAC6* transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*." Plant Mol. Biol. **65** (1-2): 137-150.
- Jensen, M.K., Hagedorn, P.H., de Torres-Zabala, M. et al.** (2008). "Transcriptional regulation by an NAC (NAM-ATAF1,2-CUC2) transcription factor attenuates ABA signalling

- for efficient basal defence towards *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in Arabidopsis." Plant J. **56** (6): 867-880.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W. et al.** (2005). "Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition." J. Bacteriol. **187** (18): 6488-6498.
- Jones, J.D.G. und Dangl, J.L.** (2006). "The plant immune system." Nature **444** (7117): 323-329.
- Jorgensen, J.H. und Mortensen, K.** (1977). "Primary infection by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* of barley mutants with resistance genes in ml-o locus." Phytopathol. **67** (5): 678-685.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G.S. et al.** (2010). "External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells." Cell **142** (6): 284-295.
- Kale, S.D.** (2012). "Oomycete and fungal effector entry, a microbial Trojan horse." New Phytol. **193** (4): 874-881.
- Kamoun, S.** (2001). "Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem." Curr. Opin. Plant Biol. **4** (4): 295-300.
- Kamoun, S.** (2006). "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." Annu. Rev. Phytopathol. **44** (1): 41-60.
- Kamoun, S.** (2007). "Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed." Curr. Opin. Plant Biol. **10** (4): 358-365.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. und Bonas, U.** (2007). "A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator." Science **318** (5850): 648-651.
- Keogh, R.C., Deverall, B.J. und McLeod, S.** (1980). "Comparison of histological and physiological responses to *Phakopsora pachyrhizi* in resistant and susceptible soybean." U. Brit. Mycol. Soc. **74** (2): 329-333.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A. und Ecker, J.R.** (1993). "CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the Raf family of protein-kinases." Cell **72** (3): 427-441.
- Kong, Q., Qu, N., Gao, M. et al.** (2012). "The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 Kinase Cascade Negatively Regulates Immunity Mediated by a Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in Arabidopsis." Plant Cell **24** (5): 2225-2236.
- Konieczny, A. und Ausubel, F.M.** (1993). "A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR-based markers." Plant J. **4** (2): 403-410.
- Kopischke, M.** (2012). "Isolierung und Charakterisierung des *ERP1*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* im Rahmen von Untersuchungen zur Nichtwirtsresistenz gegenüber *Phytophthora infestans*". Dissertation, MLU Halle.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D. et al.** (2010). "Perception of the Arabidopsis Danger Signal Peptide 1 Involves the Pattern Recognition Receptor AtPEPR1 and Its Close Homologue AtPEPR2." J. Biol. Chem. **285** (18): 13471-13479.
- Krysan, P.J., Jester, P.J., Gottwald, J.R. und Sussman, M.R.** (2002). "An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis." Plant Cell **14** (5): 1109-1120.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S. et al.** (2004). "The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants." Plant Cell **16** (12): 3496-3507.
- Landtag, J.** (2006). "Untersuchung des Pathosystems *Arabidopsis thaliana* (L.) – *Phytophthora infestans* und Charakterisierung von Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp". Dissertation, MLU Halle.
- Lay, F.T. und Anderson, M.A.** (2005). "Defensins - Components of the innate immune system in plants." Curr. Protein Pept. Sc. **6** (1): 85-101.
- Lee-Chen, S. und Steinitz-Sears, L.M.** (1967). "The location of linkage groups in *Arabidopsis thaliana*." Can J Genet Cytol **9** (2): 381-384.
- Lee, J.Y., Sherman, D.H. und Hwang, B.K.** (2008). "*In vitro* antimicrobial and *in vivo* antioomycete activities of the novel antibiotic thiobutacin." Pest Manag. Sci. **64** (2): 172-177.
- Lee, S.-W., Han, S.-W., Sriyanum, M. et al.** (2009). "A type I-secreted, sulfated peptide triggers XA21-mediated innate immunity." Science **326** (5954): 850-853.

- Lim, P.O., Kim, H.J. und Nam, H.G.** (2007). "Leaf senescence". Annu. Rev. Plant Biol. **58**: 115-136.
- Lipka, U., Fuchs, R. und Lipka, V.** (2008). "Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews." Curr. Opin. Plant Biol. **11** (4): 404-411.
- Lipka, U., Fuchs, R., Kuhns, C., Petutschnig, E. und Lipka, V.** (2010). "Live and let die - Arabidopsis nonhost resistance to powdery mildews." Eur. J. Cell Biol. **89** (2-3): 194-199.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P. et al.** (2005). "Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in Arabidopsis." Science **310** (5751): 1180-1183.
- Liu, Y.D. und Zhang, S.Q.** (2004). "Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis." Plant Cell **16** (12): 3386-3399.
- Löhner, M., Langenbach, C., Göllner, K., Conrath, U. und Schaffrath, U.** (2008). "Characterization of nonhost resistance of Arabidopsis to the asian soybean rust." MPMI **21** (11): 1421-1430.
- Lohse, M., Nunes-Nesi, A., Kruger, P. et al.** (2010). "Robin: an intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis." Plant Physiol. **153** (2): 642-651.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S. und Chua, N.H.** (2001). "A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the ABI5 transcription factor in Arabidopsis." PNAS **98** (8): 4782-4787.
- Lorenzo, O., Chico, J.M., Sanchez-Serrano, J.J. und Solano, R.** (2004). "*Jasmonate-insensitive1* encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis." Plant Cell **16** (7): 1938-1950.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X. et al.** (2010). "A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity." PNAS **107** (1): 496-501.
- Lu, H.** (2009). "Dissection of salicylic acid-mediated defense signaling networks." PSB **4** (8): 713-717.
- Lu, M., Tang, X.Y. und Zhou, J.M.** (2001). "Arabidopsis *NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria." Plant Cell **13** (2): 437-447.
- Lu, P.-L., Chen, N.-Z., An, R. et al.** (2007). "A novel drought-inducible gene, *ATAF1*, encodes a NAC family protein that negatively regulates the expression of stress-responsive genes in Arabidopsis." Plant Mol. Biol. **63** (2): 289-305.
- Lukowitz, W., Roeder, A., Parmenter, D. und Somerville, C.** (2004). "A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis." Cell **116** (1): 109-119.
- Lyngkjaer, M.F., Jensen, H.P. und Ostergard, H.** (1995). "A Japanese powdery mildew isolate with exceptionally large infection efficiency on Mlo-resistant barley." Plant Pathol. **44** (5): 786-790.
- Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A. und Dangl, J.L.** (2002). "RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis." Cell **108** (6): 743-754.
- Mackey, D., Belkadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. und Dangl, J.L.** (2003). "Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance." Cell **112** (3): 379-389.
- Maeda, K., Houjyou, Y., Komatsu, T. et al.** (2009). "AGB1 and PMR5 contribute to PEN2-mediated preinvasion resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis thaliana*." MPMI **22** (11): 1331-1340.
- Mauch-Mani, B. und Flors, V.** (2009). "The ATAF1 transcription factor: At the convergence point of ABA-dependent plant defense against biotic and abiotic stresses." Cell Research **19** (12): 1322-1323.
- Mayerhofer, H., Mueller-Dieckmann, C. und Mueller-Dieckmann, J.** (2011). "Cloning, expression, purification and preliminary X-ray analysis of the protein kinase domain of constitutive triple response 1 (CTR1) from *Arabidopsis thaliana*." Acta Crystallogr. F **67**: 117-120.
- Mayerhofer, H., Panneerselvam, S. und Mueller-Dieckmann, J.** (2012). "Protein kinase domain of CTR1 from *Arabidopsis thaliana* promotes ethylene receptor cross talk." J. Mol. Biol. **415** (4): 768-779.

- McDonald, B.A. und Linde, C.** (2002). "Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance." Annu. Rev. Phytopathol. **40**: 349-379.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. und He, S.Y.** (2006). "Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion." Cell **126** (5): 969-980.
- Miao, Y., Laun, T.M., Smykowski, A. und Zentgraf, U.** (2007). "Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter." Plant Mol. Biol. **65** (1-2): 63-76.
- Millet, Y.A., Danna, C.H., Clay, N.K. et al.** (2010). "Innate immune responses activated in Arabidopsis roots by microbe-associated molecular patterns." Plant Cell **22** (3): 973-990.
- Mizoguchi, T., Ichimura, K., Irie, K. et al.** (1998). "Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants." FEBS Letters **437** (1-2): 56-60.
- Murashige, T. und Skoog, F.** (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." Physiol. Plantarum **15** (3): 473-497.
- Mysore, K.S. und Ryu, C.-M.** (2004). "Nonhost resistance: how much do we know?" Trends Plant Sci. **9** (2): 97-104.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T. et al.** (2007). "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation." J. Biosci. Bioeng. **104** (1): 34-41.
- Nakao, M., Nakamura, R., Kita, K., Inukai, R. und Ishikawa, A.** (2011). "Non-host resistance to penetration and hyphal growth of *Magnaporthe oryzae* in Arabidopsis." Scientific Reports **1**: 1-9.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F. et al.** (2006). "A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling." Science **312** (5772): 436-439.
- Nawrath, C. und Metraux, J.P.** (1999). "Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation." Plant Cell **11** (8): 1393-1404.
- Nishida, E. und Gotoh, Y.** (1993). "The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways." Trends Biochem. Sci. **18** (4): 128-131.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H. et al.** (2003). "Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance." Science **301** (5635): 969-972.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T. et al.** (1994). "High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses." Cell **78** (3): 449-460.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L.** (2004). "Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences." Immunol. Rev. **198**: 249-266.
- Nürnberg, T. und Lipka, V.** (2005). "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon." Mol. Plant Pathol. **6** (3): 335-345.
- Ohnishi, T., Sugahara, S., Yamada, T. et al.** (2005). "OsNAC6, a member of the NAC gene family, is induced by various stresses in rice." Genes Genet. Syst. **80** (2): 135-139.
- Osborn, A.E.** (1996). "Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack." Plant Cell **8** (10): 1821-1831.
- Pan, H., Liu, S. und Tang, D.** (2012). "HPR1, a component of the THO/TREX complex, plays an important role in disease resistance and senescence in Arabidopsis." Plant J. **69** (5): 831-843.
- Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A. et al.** (2002). "Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants." PNAS **99** (16): 10865-10869.
- Petters, J.** (2001). "Isolierung und Charakterisierung pathogen- und streßinduzierter Gene von Kartoffel *Solanum tuberosum* L.". Dissertation, MLU Halle.
- Postel, S. und Kemmerling, B.** (2009). "Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns." Semin. Cell Dev. Biol. **20** (9): 1025-1031.
- Qiu, J.-L., Fiil, B.K., Petersen, K. et al.** (2008a). "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus." Embo J. **27** (16): 2214-2221.

- Qiu, J.-L., Zhou, L., Yun, B.-W. et al.** (2008b). "Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1." Plant Physiol. **148** (1): 212-222.
- Raffaele, S., Win, J., Cano, L.M. und Kamoun, S.** (2010). "Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*." BMC Genomics **11**: 637-655.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. und Scheel, D.** (2011). "Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns." Plant J. **68** (1): 100-113.
- Ranf, S., Grimmer, J., Poeschl, Y. et al.** (2012). "Defense-related calcium signaling mutants uncovered via a quantitative high-throughput screen in *Arabidopsis thaliana*." Molecular Plant **5** (1): 115-130.
- Reed, R. und Cheng, H.** (2005). "TREX, SR proteins and export of mRNA." Curr. Opin. Cell Biol. **17** (3): 269-273.
- Rietz, S., Stamm, A., Malonek, S. et al.** (2011). "Different roles of Enhanced Disease Susceptibility1 (EDS1) bound to and dissociated from Phytoalexin Deficient4 (PAD4) in Arabidopsis immunity." New Phytol. **191** (1): 107-119.
- Robatzek, S., Chinchilla, D. und Boller, T.** (2006). "Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis." Gene. Dev. **20** (5): 537-542.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. und Jones, J.D.G.** (2007). "Pathological hormone imbalances." Curr. Opin. Plant Biol. **10** (4): 372-379.
- Römer, P., Hahn, S., Jordan, T. et al.** (2007). "Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene." Science **318** (5850): 645-648.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C. et al.** (2011). "The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens." Plant Cell **23** (6): 2440-2455.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989). "Molecular Cloning - A laboratory manual". 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanabria, N., Huang, J. und Dubery, I.** (2010). "Self/nonself perception in plants in innate immunity and defense." Self Nonself **1** (1): 40-54.
- Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P. et al.** (2010). "Tryptophan-derived secondary metabolites in *Arabidopsis thaliana* confer non-host resistance to necrotrophic *Plectosphaerella cucumerina* fungi." Plant J. **63** (1): 115-127.
- Schulze-Lefert, P. und Panstruga, R.** (2011). "A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation." Trends Plant Sci. **16** (3): 117-125.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K. et al.** (2010). "Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1." J. Biol. Chem. **285** (13): 9444-9451.
- Schwessinger, B. und Zipfel, C.** (2008). "News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants." Curr. Opin. Plant Biol. **11** (4): 389-395.
- Segonzac, C. und Zipfel, C.** (2011). "Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria." Curr. Opin. Microbiol. **14** (1): 54-61.
- Selth, L.A., Dogra, S.C., Rasheed, M.S. et al.** (2005). "A NAC domain protein interacts with *Tomato leaf curl virus* replication accessory protein and enhances viral replication." Plant Cell **17** (1): 311-325.
- Shattock, R.C.** (2002). "*Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides." Pest Manag. Sci. **58** (9): 944-950.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A. und Lamb, C.** (1997). "Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms." Plant Cell **9** (2): 261-270.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. und Mauch, F.** (2003). "Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection." Mol. Plant Pathol. **4** (4): 237-248.

- Sigrist, C.J.A., Cerutti, L., de Castro, E. et al.** (2010). "PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation." Nucleic Acids Res. **38**: D161-D166.
- Simossis, V.A. und Heringa, J.** (2005). "PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information." Nucleic Acids Res. **33**: W289-W294.
- Sogin, M.L. und Silberman, J.D.** (1998). "Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics." Int. J. Parasitol. **28** (1): 11-20.
- Son, S.W., Kim, H.Y., Choi, G.J. et al.** (2008). "Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*." J. Appl. Microbiol. **104** (3): 692-698.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C. et al.** (2006). "Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration." Plant Cell **18** (3): 731-746.
- Stone, S.L., Williams, L.A., Farmer, L.M., Vierstra, R.D. und Callis, J.** (2006). "KEEP ON GOING, a RING E3 ligase essential for Arabidopsis growth and development, is involved in abscisic acid signaling." Plant Cell **18** (12): 3415-3428.
- Stotz, H.U., Thomson, J.G. und Wang, Y.** (2009). "Plant defensins: defense, development and application." PSB **4** (11): 1010-1012.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y. et al.** (2007). "MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants." Plant Physiol. **143** (2): 661-669.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Petersen, M. und Mundy, J.** (2010). "Mitogen-Activated Protein Kinase signaling in plants." Annu. Rev. Plant Biol. **61**: 621-649.
- Sumit, R., Sahu, B., Xu, M., Sandhu, D. und Bhattacharyya, M.** (2012). "Arabidopsis nonhost resistance gene *PSS1* confers immunity against an oomycete and a fungal pathogen but not a bacterial pathogen that cause diseases in soybean." BMC Plant Biology **12** (1): 87.
- Tang, D.Z., Frye, C.A. und Innes, R.W.** (2000). Identification of a MAP3 kinase that negatively regulates defense responses in Arabidopsis 11th International Conference on Arabidopsis Research.
- Tang, D.Z. und Innes, R.W.** (2002). "Overexpression of a kinase-deficient form of the *EDR1* gene enhances powdery mildew resistance and ethylene-induced senescence in Arabidopsis." Plant J. **32** (6): 975-983.
- Tang, D.Z., Christiansen, K.M. und Innes, R.W.** (2005). "Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in Arabidopsis by the EDR1 protein kinase." Plant Physiol. **138** (2): 1018-1026.
- Thomma, B., Nelissen, I., Eggermont, K. und Broekaert, W.F.** (1999). "Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*." Plant J. **19** (2): 163-171.
- Thomma, B., Cammue, B.P.A. und Thevissen, K.** (2002). "Plant defensins." Planta **216** (2): 193-202.
- Tian, M.Y., Huitema, E., da Cunha, L., Torto-Alalibo, T. und Kamoun, S.** (2004). "A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B." J. Biol. Chem. **279** (25): 26370-26377.
- Tian, M.Y., Benedetti, B. und Kamoun, S.** (2005). "A second kazal-like protease inhibitor from *Phytophthora infestans* inhibits and interacts with the apoplastic pathogenesis-related protease P69B of tomato." Plant Physiol. **138** (3): 1785-1793.
- Ton, J., Flors, V. und Mauch-Mani, B.** (2009). "The multifaceted role of ABA in disease resistance." Trends Plant Sci. **14** (6): 310-317.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. und Jones, J.D.G.** (2002). "Arabidopsis gp91^{phox} homologues *AtrbohD* and *AtrbohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response." PNAS **99** (1): 517-522.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R. und Somerville, S.C.** (1992). "Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*." Plant Physiol. **98** (4): 1304-1309.

- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X. et al.** (2006). "Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis." Science **313** (5791): 1261-1266.
- Uchida, M., Roberson, R.W., Chun, S.J. und Kim, D.S.** (2005). "In vivo effects of the fungicide ethaboxam on microtubule integrity in *Phytophthora infestans*." Pest Manage. Sci. **61** (8): 787-792.
- van der Biezen, E.A. und Jones, J.D.G.** (1998). "Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept." Trends Biochem. Sci. **23** (12): 454-456.
- van der Hoorn, R.A.L. und Kamoun, S.** (2008). "From Guard to Decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors." Plant Cell **20** (8): 2009-2017.
- van Hulst, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M.J. und Ton, J.** (2006). "Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis." PNAS **103** (14): 5602-5607.
- van Loon, L.C., Rep, M. und Pieterse, C.M.J.** (2006). "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." Annu. Rev. Phytopathol. **44**: 135-162.
- Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L. et al.** (1999). "Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes." BBA-Biomembranes **1419** (2): 335-342.
- Vogel, J. und Somerville, S.** (2000). "Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants." PNAS **97** (4): 1897-1902.
- Voges, D., Zwickl, P. und Baumeister, W.** (1999). "The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis." Annu. Rev. Biochem. **68**: 1015-1068.
- Vorwerk, S., Somerville, S. und Somerville, C.** (2004). "The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance." Trends Plant Sci. **9** (4): 203-209.
- Wang, X., Basnayake, B.M.V.S., Zhang, H. et al.** (2009). "The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens." MPMI **22** (10): 1227-1238.
- Wawrzynska, A., Christiansen, K.M., Lan, Y., Rodibaugh, N.L. und Innes, R.W.** (2008). "Powdery mildew resistance conferred by loss of the ENHANCED DISEASE RESISTANCE1 protein kinase is suppressed by a missense mutation in *KEEP ON GOING*, a regulator of abscisic acid signaling." Plant Physiol. **148** (3): 1510-1522.
- Wawrzynska, A., Rodibaugh, N.L. und Innes, R.W.** (2010). "Synergistic activation of defense responses in Arabidopsis by simultaneous loss of the GSL5 callose synthase and the EDR1 protein kinase." MPMI **23** (5): 578-584.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.** (2002). "Arabidopsis - A laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F. und Staskawicz, B.J.** (1991). "Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean." Plant Cell **3** (1): 49-59.
- Wiermer, M., Feys, B.J. und Parker, J.E.** (2005). "Plant immunity: the EDS1 regulatory node." Curr. Opin. Plant Biol. **8** (4): 383-389.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G. und Ausubel, F.M.** (2002). "Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence." Nature **417** (6888): 571-571.
- Wong, J.H., Xia, L. und Ng, T.B.** (2007). "A review of defensins of diverse origins." Curr. Protein Pept. Sc. **8** (5): 446-459.
- Wu, Y., Deng, Z., Lai, J. et al.** (2009). "Dual function of Arabidopsis ATAF1 in abiotic and biotic stress responses." Cell Research **19** (11): 1279-1290.
- Xiao, S.Y., Calis, O., Patrick, E. et al.** (2005). "The atypical resistance gene, *RPW8*, recruits components of basal defence for powdery mildew resistance in Arabidopsis." Plant J. **42** (1): 95-110.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A. et al.** (2011). "Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity." PNAS **108** (35): 14682-14687.
- Yao, C., Wu, Y., Nie, H. und Tang, D.** (2012). "RPN1a, a 26S proteasome subunit, is required for innate immunity in Arabidopsis." Plant J. in press.
- Ye, S., Dhillon, S., Ke, X.Y., Collins, A.R. und Day, I.N.M.** (2001). "An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms." Nucleic Acids Res. **29** (17).

- Yelina, N.E., Smith, L.M., Jones, A.M.E. et al.** (2010). "Putative Arabidopsis THO/TREX mRNA export complex is involved in transgene and endogenous siRNA biosynthesis." PNAS **107** (31): 13948-13953.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., Tena, G., Xiong, Y. und Sheen, J.** (2008). "Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling." Nature **451** (7180): 789-795.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y. et al.** (2009). "Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis." Plant Cell **21** (9): 2914-2927.
- Yoshimoto, K.** (2010). "Plant autophagy puts the brakes on cell death by controlling salicylic acid signaling." Autophagy **6** (1): 192-193.
- Zhang, J., Li, W., Xiang, T. et al.** (2010). "Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector." Cell Host Microbe **7** (4): 290-301.
- Zhou, J.-M. und Chai, J.** (2008). "Plant pathogenic bacterial type III effectors subdue host responses." Curr. Opin. Microbiol. **11** (2): 179-185.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. und Somerville, S.** (2004). "Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in Arabidopsis." Plant J. **40** (5): 633-646.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L. et al.** (2004). "Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception." Nature **428** (6984): 764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D. et al.** (2006). "Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation." Cell **125** (4): 749-760.
- Zipfel, C.** (2008). "Pattern-recognition receptors in plant innate immunity." Curr. Opin. Immunol. **20** (1): 10-16.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Scheel und Frau Dr. Rosahl für die Überlassung des interessanten Themas, der Arbeitsstätte und die stete Betreuung und Diskussionsbereitschaft in den vergangenen Jahren. Auch den Gutachtern und der Prüfungskommission gilt mein Dank für ihren Anteil am Verfahren.

In besonderer Form möchte ich mich bei Frau Dr. Rosahl und Frau Dr. Westphal für die kritische Betrachtung und das Korrekturlesen der Arbeit sowie zahllose und immer sehr aufschlussreiche Diskussionen, Hilfestellungen und Unterstützung jeglicher Art bedanken.

Weiterhin bedanke ich mich bei der gesamten Abteilung „Stress- und Entwicklungsbiologie“ einschließlich der AG „Induzierte Pathogenabwehr“ am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre, die besonders durch gemeinsam verbrachte Kaffeepausen entstanden ist. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Doktoranden- und Labor-Weggefährten Lennart, Claudia, Michaela, Ramona, Pascal, Martin, Mieder, Ulrike und Steffi, die immer wieder für gute Stimmung und Optimismus gesorgt haben und zeitgleich immer Anlaufstelle für Problemlösungen oder das Erlangen neuer Techniken waren.

Dr. Kai Naumann und Petra Majovsky gilt ein großes Dankeschön für die Anfertigung der massenspektrometrischen Analysen. Für die technische Unterstützung bei zahlreichen Laborarbeiten danke ich besonders Frau Marina Häußler, Frau Verona Wilde und den sehr produktiven Hiwis Sandra, Peter, Antje, Katharina, Torsten und Ulrike (ich hoffe ich habe niemanden vergessen). Ebenso bedanke ich mich bei all den Gärtnern, Handwerkern und Computer-Spezialisten für die Hilfe im Arbeitsalltag.

Nicht zuletzt bedanke ich mich herzlichst bei meiner Familie, meinen Freunden und besonders meinem Mann Torsten dafür, dass es sie gibt, sie mich auf meinem Weg bis hierher begleitet und an mich geglaubt haben, auch wenn ich es mal nicht tat. Vielen Dank!

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich diese Dissertation selbstständig ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst habe. Alle den benutzten Quellen wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Weiterhin bestätige ich, mich mit der vorliegenden Arbeit erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades zu bewerben.

Ort, Datum, Unterschrift

Lebenslauf

Name: Katrin Geißler, geb. Czamperla
Geburtsdatum: 08.05.1984
Geburtsort: Halle/Saale
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Tiedexer Tor 2, 37574 Einbeck
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

Sept 1990 - Mai 1995 Martin-Luther-Grundschule in Halle/Saale

Sept 1995 - Mai 2003 Latina August-Hermann-Francke-Gymnasium in Halle/Saale

Mai 2003 Abitur an der Latina AHF in Halle/Saale

Okt 2003 - März 2008 Studium der Biotechnologie an der Hochschule Anhalt Köthen
Schwerpunkt: Molekulare Biotechnologie

April 2007 - März 2008 Anfertigung der Diplomarbeit zum Thema „Untersuchungen zur Bildung von Sekundärmetaboliten bei der *in vitro*-Kultivierung von *Hypericum perforatum* L.“ am SIAB e.V., Leipzig

März 2008 Abschluss des Studiums als Diplom-Ingenieur (FH)

April 2008 - Juni 2012 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle zum Thema „Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-Mutanten *pen2erp2* und *pen2erp6*“ unter Betreuung von Prof. Dr. Scheel und Dr. Rosahl