

Reaktive Sauerstoffspezies in der pflanzlichen Pathogenabwehr -

Isolierung und Charakterisierung von Genen *aus Petroselinum  
crispum* L., die für putative NADPH-Oxidasen kodieren

Dissertation

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

vorlegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Fachbereich Biochemie /Biotechnologie

von Heidi Zinecker  
geboren am 12. Dezember 1967 in Bahrendorf

Gutachter:

- 1: Prof. Dr. Dierk Scheel
- 2: Prof. Dr. Claus Wasternak
- 3: Dr. Christian Langebartels

Halle (Saale), den 27.6.2001

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Pflanzliche Resistenzmechanismen und Abwehrreaktionen .....	1
1.2 Pathogenerkennung und Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	3
1.2.1 Signalperzeption .....	3
1.2.2 Signaltransduktion .....	3
1.3 Der <i>oxidative burst</i> .....	5
1.3.1 Reaktionen zur Entstehung der ROS .....	5
1.3.2 Der <i>oxidative burst</i> in der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	6
1.3.3 Herkunft des <i>oxidative burst</i> .....	8
1.3.4 Die NADPH-Oxidase aus Phagozyten .....	9
1.4 Das Modellsystem aus einer Petersiliezellensuspensionskultur und Peptidelicitoren .....	10
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 Material und Methoden.....	14
2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide.....	14
2.2 Kultivierung und Behandlung der Petersiliezellen .....	14
2.2.1 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen .....	14
2.2.2 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium .....	15
2.2.3 Präparation von Proteinextrakten aus Petersilie.....	15
2.2.3.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten .....	15
2.2.3.2 Präparation von mikrosomaler Zellfraktion (nach Tschöpe, 1999) .....	15
2.2.4 Stabile Transformation von Petersiliezellen (nach Feiner <i>et al.</i> , 1992) .....	15
2.3 Bestimmung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies .....	16
2.3.1 Luminol-Lumineszenz-Methode zur Bestimmung der H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration (nach Warm und Laties, 1982) .....	16
2.3.2 Lucigenin-Lumineszenz-Methode zur Bestimmung der O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Konzentration (nach Corbisier <i>et al.</i> , 1987) .....	17
2.3.3 Eine Methode zur Bestimmung der O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Konzentration basierend auf der Reduktion des Tetrazoliumfarbstoffes XTT .....	17
2.4 Molekularbiologische Arbeiten .....	17
2.4.1 Bakterien- und Hefestämme, Phagen, Plasmide.....	18
2.4.2 PCR-Amplifikation von DNA.....	19
2.4.3 RT-PCR.....	19
2.4.4 5'RACE.....	20
2.4.5 Klonierung von PCR-Produkten .....	20
2.4.6 Reinigung von Plasmid-DNA.....	20
2.4.7 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten .....	20
2.4.8 Markierung von DNA-Fragmenten .....	20
2.4.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	20
2.4.8.2 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin .....	20
2.4.9 DNA-Sequenzierung .....	20
2.4.10 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten .....	21
2.4.11 Southernblots mit genomischer DNA .....	21
2.4.12 Screening einer Petersilie-λ-ZAP <sup>TM</sup> -II-cDNA-Bank .....	21

2.4.13 RNA-Isolierung .....	22
2.4.13.1 Präparation von Gesamt-RNA.....	22
2.4.13.2 Präparation von Poly (A) <sup>+</sup> -RNA .....	22
2.4.14 Northern-Blot-Analysen.....	22
2.4.15 Bakterielle Expression von RBOH1.1 und RBOH2.1.....	23
2.5. Proteinanalytische Methoden.....	23
2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration .....	23
2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	23
2.5.3 Western-Blot-Analyse .....	24
2.6 Hefe-Methoden.....	24
2.6.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	24
2.6.1.1 Hefestämme und Plasmide .....	24
2.6.1.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen.....	25
2.6.1.3 Herstellung der Plasmide pBD-HA51, pBD-HA52 und pBD-HA42.....	26
2.6.1.4 Hefetransformation .....	26
2.6.1.5 Screening mit pBD-HA51, pBD-HA52 und pBD-HA42.....	27
2.6.1.6 Plasmidpräparation aus Hefe .....	27
2.6.1.7 Proteinextraktion aus Hefe.....	27
2.6.2 Heterologe Expression in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	28
2.6.2.1 Hefetransformation .....	28
2.6.2.2 Induktion der Proteinbiosynthese .....	28
2.6.2.3 Analyse der heterologen Proteinexpression .....	28
2.6.2.4 Mikrosomenpräparation ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) .....	28
2.7 Heterologe Expression in NIH-3T3 Zellen.....	29
2.7.1 Transfektion der NIH-3T3 Zellen.....	29
2.7.2 Proteinextraktion aus NIH-3T3 Zellen und Analyse der heterologen Proteinexpression .....	29
3 Ergebnisse .....	30
3.1 Klonierung und Charakterisierung von zwei cDNA-Klonen mit Homologien zur katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, gp91 <sup>phox</sup> .....	30
3.1.1 Screening einer Petersilie-cDNA Bank mit einer heterologen Sonde aus Reis...30	
3.1.2 Southern Blot-Analyse .....	31
3.1.3 Weitere Analyse der Nukleinsäuresequenzen.....	32
3.1.3.1 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) .....	32
3.1.3.2 Analyse genomischer Klone.....	33
3.1.4 Analyse der erhaltenen Daten und Sequenzvergleiche.....	34
3.1.5 Expressionsanalyse von <i>rboh1</i> und <i>rboh2</i> .....	37
3.2 Funktionelle Charakterisierung .....	39
3.2.1 Expression von RBOH1 und RBOH2 in <i>E.coli</i> .....	39
3.2.2 Versuche zum Nachweis der korrespondierenden Proteine in Petersiliezellen ..40	
3.2.3 Heterologe Expression von RBOH1 und RBOH2 in NIH-3T3 Zellen .....	41
3.2.4 Heterologe Expression in der Hefe <i>S. cerevisiae</i> .....	42
3.2.5 Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme RBOH1.10 und RBOH2.5.....	43
3.2.5.1 Enzymaktivitäten.....	43
3.2.5.2 K <sub>M</sub> -Werte für die Substrate NADPH und NADH.....	44
3.2.5.3 Hemmung der O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion durch DPI / IDP .....	45
3.2.5.4 Ca <sup>2+</sup> -Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidaseaktivität von RBOH1 .....	46
3.2.6 Stabile Transformation von Petersiliezellen mit <i>rboh2</i> -Sense- und <i>rboh2</i> - Antisense-Konstrukten.....	48
3.2.6.1 Konstrukte für die stabile Transformation der Petersiliezellen .....	49
3.2.6.2. Analyse und Charakterisierung der <i>rboh2</i> -Sense-Linien .....	49

3.2.6.3 Analyse und Charakterisierung der <i>rboh2</i> -Antisense-Linien.....	50
3.2.7 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	51
3.2.7.1 Bedingungen.....	51
3.2.7.2 Testverfahren zur Eignung der Konstrukte .....	52
3.2.7.3 Resultate der Zwei-Hybrid-Screens.....	53
3.3. Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen nach partieller Reinigung einer putativen NAD(P)H-Oxidase.....	54
3.3.1. Isolierung der korrespondierenden cDNA-Klone <i>aoh1</i> und <i>aoh2</i> .....	54
3.3.2 Analyse der <i>aoh</i> -cDNAs und Sequenzvergleiche.....	56
3.3.3 Expressionsanalyse der <i>aoh1</i> -und <i>aoh2</i> -Transkripte .....	58
3.3.4 Gewebespezifische Expressionsanalyse der AOH-Proteine .....	59
3.3.5 Heterologe Expression von AOH1 in NIH-3T3 Zellen und in Zellen der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	60
3.3.6 Stabile Transformation von Petersiliezellen mit <i>aoh1</i> -Antisense-Konstrukten ....	61
4. Diskussion.....	63
4.1. Isolierung und Charakterisierung von <i>rboh1</i> und <i>rboh2</i> .....	63
4.1.1. Sequenzvergleiche .....	63
4.1.2 Ähnlichkeiten und Unterschiede zum NADPH-Oxidase-Komplex aus Phagozyten .....	64
4.1.3 Neue humane GP91 <sup>phox</sup> -Homologe .....	65
4.2 Heterologe Expression von RBOH1 und RBOH2 in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	67
4.2.1 Nachweis der NAD(P)H-Oxidaseaktivität der rekombinanten Proteine RBOH1 und RBOH2 .....	67
4.2.2 NAD(P)H-Oxidaseaktivität des rekombinanten RBOH1.10-Proteins ist Ca <sup>2+</sup> -abhängig.....	68
4.2.3 Enzymkinetische Eigenschaften .....	69
4.3 Expressionsanalyse von <i>rboh2</i> .....	70
4.3.1 <i>Rboh2</i> – Unterschiede zu anderen pflanzlichen <i>gp91</i> <sup>phox</sup> -Homologen .....	70
4.3.2 Induktion der Transkriptakkumulation von <i>rboh2</i> – einem elicitorresponsiven Gen .....	71
4.3.3 Strukturelle Ähnlichkeiten mit Fe-Reduktasen.....	72
4.4 Untersuchungen zur Funktion der RBOH-Proteine .....	73
4.4.1 Detektion der Proteine RBOH1 und RBOH2 in Petersilie.....	73
4.4.2 Identifizierung von cytosolischen Untereinheiten oder anderen Regulatoren durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System .....	73
4.4.3 Analyse von <i>rboh2</i> -Sense- und -Antisense-Linien.....	74
4.5 Ascorbat-Oxidase-Homologe (AOH) – neue Enzyme mit putativer NAD(P)H-Oxidaseaktivität.....	76
4.5.1 Sequenzanalyse von AOH1 und AOH2 .....	76
4.5.2 Funktionelle Charakterisierung der AOH-Proteine .....	77
4.5.2.1 Expressionsanalyse .....	77
4.5.2.2 Versuche zum Nachweis der Enzymaktivität des rekombinanten AOH1 .....	78
4.5.2.3 Analyse von stabil transformierten <i>aoh1</i> -Antisense-Kulturen.....	78
4.6 Ausblick.....	79
5 Zusammenfassung.....	81
6 Literatur .....	83
7 Anhang .....	

## Abkürzungen

% v. Max.	Prozent vom Maximalwert
4-CL	4-Cumarat-CoA-Ligase
Abb.	Abbildung
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
AOH	<i>Ascorbate oxidase homolog</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
avr-Gen	Avirulenzgen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
b-ZIP	basischer "Leucin-Zipper"
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenikolresistenz
CaMV	"cauliflower mosaik virus"
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DDC	Diethyldithiocarbamat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiotreithol
ECL-	<i>enhanced chemiluminescence</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
Fe	Eisen (Fe <sup>2+</sup> -Ionen)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
HPLC	<i>high-performance-liquid-chromatography</i>
HR	hypersensitive Reaktion
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Inhibierung
IDP	Diphenyliodonium
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkase
MAPKK	MAPKK-Kinase
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
NADH	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NADP+	β-Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (oxidierte Form)

NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduzierte Form)
nkatal	Nanokatal
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
<i>P.c.</i>	<i>Petroselinum crispum</i> L.
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pfu	Plaque-bildende Einheiten
PMSF	Polyvinylpyrrolidon
PR-Protein	“pathogenesis-related“-Protein
pv.	Pathovar
RBOH	<i>respiratory burst oxidase homolog</i>
R-Gen	Resistenzgen
RLE	relative Lichteinheiten
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SA	Salicylsäure
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMV	Tabak-Mosaikvirus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

**Tabelle 1: Abkürzungen für Aminosäuren**

Abkürzungen	Aminosäure	Abkürzungen	Aminosäure
A Ala	Alanin	M Met	Methionin
C Cys	Cystein	N Asn	Asparagin
D Asp	Asparaginsäure	P Pro	Prolin
E Glu	Glutaminsäure	Q Glu	Glutamat
F Phe	Phenylalanin	R Arg	Arginin
G Gly	Glycin	S Ser	Serin
H His	Histidin	T Thr	Threonin
I Ile	Isoleucin	V Val	Valin
K Lys	Lysin	W Trp	Tryptophan
L Leu	Leucin	Y Tyr	Tyrosin



# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzliche Resistenzmechanismen und Abwehrreaktionen

Pflanzen müssen permanent auf die Herausforderungen der Umwelt reagieren und sind unter natürlichen Bedingungen gegenüber den meisten potentiellen Pathogenen resistent. Phytopathogenen Pilzen, Bakterien, Viren und Viroiden gelingt es nur selten, die natürlichen Schutzbarrieren der Pflanze zu überwinden. Dieses Phänomen wird als Basis- oder Nichtwirtsresistenz bezeichnet (Prell, 1996; Buchanan *et al.*, 2000; Heath, 2000). In wenigen Fällen wird die Basisresistenz der Pflanzen durch Pathogene mit speziellen Pathogenizitätsgenen überwunden und bestimmte Pflanzenspezies werden in Folge des Pathogenbefalls parasitiert (Basiskompatibilität). Dabei führt epidemieartiger Schädlingsbefall weltweit zu enormen Ernteverlusten mit teilweise katastrophalen Folgen für die Nahrungsmittelerzeugung, speziell in den Entwicklungsländern (Baker *et al.*, 1997).

Als Folge der Koevolution zwischen Pflanzen und Phytopathogenen haben einzelne Sorten susceptibler Pflanzenarten gegen bestimmte Rassen des entsprechenden Pathogens eine Resistenz entwickelt, die als Wirts- bzw. rassenspezifische Resistenz bezeichnet wird. Die genetischen Grundlagen dieser inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Interaktion wurden erstmals in den Arbeiten von Flor in der Gen-für-Gen-Hypothese formuliert (Flor, 1947; Flor, 1971). Demnach wird das Auftreten der Wirtsresistenz durch dominante pflanzliche Resistenzgene (R-Gene) und komplementäre, dominante Avirulenzgene (*avr*-Gene) des Pathogens determiniert. Die dabei initiierten Abwehrmechanismen werden durch direkte oder indirekte Interaktion von *avr*-Genprodukten mit den Produkten der korrespondierenden R-Gene vermittelt (Baker *et al.*, 1997). Innerhalb von inkompatiblen Pflanzen-Pathogen-Interaktionen werden die gleichen Abwehrantworten induziert, wie sie auch für die Nichtwirtsresistenz beschrieben werden (Scheel, 1998; Heath, 2000).

Der Parasitierung von Pflanzen durch Phytopathogene wirken konstitutive und induzierbare, von der Pflanze determinierte, Abwehrmechanismen entgegen (Prell, 1996; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998). Dem Eindringen von potentiellen Erregern wird durch präformierte, physikalische Barrieren wie die pflanzliche Zellwand oder Wachsschichten der Kutikula entgegengewirkt (Ride, 1983). Außerdem werden chemische Abwehrstoffe mit toxischer Wirkung wie Phenole, Saponine, Peptide und Glukosinolate (Filippone *et al.*, 1999; Osbourn, 1996) synthetisiert, die das Wachstum der eingedrungenen Phytopathogene inhibieren. Während phenolische Verbindungen in die Zellwand eingelagert werden, erfolgt die Speicherung von Glukosinolaten und Saponinen in den Vakuolen. Glukosinolate werden nach Verwundung von Pflanzengewebe, durch Myrosinasen katalysiert, in biologisch aktive, toxische Verbindungen umgesetzt. Saponine entfalten ihre antibiotische Wirksamkeit über die Wechselwirkung mit Membransterolen, die eine Permeabilisierung der Pilzmembranen bewirkt (Osbourn, 1996).

Der Auslösung der schnellen, induzierbaren Abwehrantworten geht eine Erkennung zwischen Pflanze und Pathogen voran (siehe 1.2.1). Die oftmals direkt an der



Penetrationsstelle des Pathogens beobachtete Auflagerung von Kallose in Form einer Papillenbildung dient der mechanischen Verstärkung der pflanzlichen Zellwand (Kauss *et al.*, 1989). Eine weitere effiziente Abwehrreaktion ist das schnelle Absterben der Pflanzenzellen (hypersensitive Reaktion, HR) in der unmittelbar angrenzenden Umgebung. Die Nekrotisierung des befallenen Gewebes verhindert die Ausbreitung der eingedrungenen Erreger durch die Limitierung von Nährstoffen oder durch die Freisetzung von in den Pflanzenzellen gespeicherten, toxischen Substanzen. Die hypersensitive Reaktion ist ein aktiver Prozeß, der Proteinneusynthese erfordert (He *et al.*, 1993; Dangl, 1996; Solomon *et al.*, 1999), und wird in Analogie zum tierischen System als programmierter Zelltod (PCD) beschrieben (Richberg *et al.*, 1998; Greenberg, 1997; Jacobson *et al.*, 1997; Greenberg, *et al.*, 1994). Einige Arbeiten deuten auf mögliche konservierte molekulare Mechanismen innerhalb des Pflanzen- und Tierreiches hin. So führt die heterologe Expression des humanen Bax-Proteins in Tabak zur Ausbildung von Nekrosen in den Pflanzen (Lacomme und Santa Cruz, 1999) und Cystein-Proteasen scheinen ubiquitäre Komponenten bei der Regulation des PCD in Eukaryoten zu sein (Jacobson *et al.*, 1997; Del Pozo und Lam, 1998; Avrova *et al.*, 1999; Solomon *et al.*, 1999).

Weiterhin wird in den benachbarten Zellen des Angriffsortes durch ein Pathogen eine Vielzahl von Genen transkriptionell aktiviert oder reprimiert (Bowles, 1990; Hammond-Kosack und Jones, 1996). Ein Teil der neugebildeten Genprodukte ist an der Synthese und Einlagerung von Zellwandpolymeren wie Lignin und Suberin, sowie der Vernetzung von extrazellulären, hydroxyprolinreichen und prolinreichen Glykoproteinen oder glycinreichen Proteinen beteiligt (Bradley, 1992; Brisson, 1994; Otte und Barz, 1996). Weitere pathogenresponsive Gene kodieren für Enzyme des Sekundärstoffwechsels, z.B. wird bei vielen Abwehrreaktionen die Aktivierung der Schlüsselenzyme des Phenylpropanstoffwechsels wie der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und der 4-Cumarat-CoA-Ligase (4CL) beobachtet (Hahlbrock und Scheel, 1989). Als Folge akkumulieren in vielen Pflanzen niedermolekulare Substanzen, sogenannte Phytoalexine, mit antimikrobieller Wirkung (Bowles, 1990; Dixon und Paiva, 1995). Neben Produkten des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels wie Cumarine, Stilbene und Flavonoide gehören dazu Alkaloide, Saponine und Terpene. Eine andere Gruppe von Proteinen, die nach einer Pathogeninfektion differentiell exprimiert wird, sind die sogenannten PR-Proteine (*pathogenesis-related proteins*). Für einige PR-Proteine wie z.B. Chitinasen,  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Defensine und Thionine konnte eine direkte Abwehrfunktion gezeigt werden (Bowles, 1990; Epple *et al.*, 1997), für andere konnte eine Rolle bei Abwehrreaktionen noch nicht hinreichend geklärt werden. Die Aktivierung der lokalen Abwehrreaktionen führt in vielen Pflanzen zur Ausbildung einer systemischen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR), welche der gesamten Pflanze erhöhte Resistenz gegenüber nachfolgenden Infektionen mit verschiedenen Mikroorganismen verleiht (Ryals *et al.*, 1994; Ryals *et al.*, 1996; Delaney, 1997; Alvarez *et al.*, 1998; Pieterse und Van Loon, 1999).

Das Spektrum der durch die Pathogenerkennung induzierten Abwehrreaktionen ist innerhalb der verschiedenen Pflanzenarten vergleichbar und durch ihre Aktivierung in einem definierten räumlichen und zeitlichen Muster charakterisiert (Ebel und Scheel, 1992).

Dabei hat sich in den letzten Jahren die Erkenntnis herauskristallisiert, daß die Wirksamkeit und Effizienz der Abwehrmechanismen durch ein hoch integriertes und reguliertes Netzwerk von Signaltransduktionswegen kontrolliert wird.

## **1.2 Pathogenerkennung und Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr**

### **1.2.1 Signalperzeption**

Die Basis für die Aktivierung von induzierbaren Abwehrreaktionen innerhalb von Pflanze-Pathogen-Interaktionen ist die Wahrnehmung der eingedrungenen Mikroorganismen durch die Pflanze. Dabei dienen Signalmoleküle, die als Elicitoren bezeichnet werden, schon in sehr niedrigen Konzentrationen (1-10 nM) als Auslöser der Resistenzreaktionen. Außer endogenen Elicitoren, die durch die Wirkung mikrobieller, hydrolytischer Enzyme aus der pflanzlichen Zellwand herausgelöst werden, wurden vor allem exogene Elicitoren wie pathogenspezifische Polysaccharide, Lipide, Glykoproteine und Peptide identifiziert und gereinigt (Boller, 1995). Neben Harpin, einem Zelltod-induzierenden Protein aus *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Wei *et al.*, 1992; He *et al.*, 1993), und Flagellin (Felix *et al.*, 1999), der Hauptkomponente des bakteriellen Geißelapparates, wurden bisher Elicitoren aus Pilzen und Oomyceten charakterisiert.

Die Pathogenerkennung ist generell rezeptorvermittelt und erfolgt entweder im Cytosol (Bonas und van den Ackerveken, 1997) oder in den Plasmamembranen der Pflanzenzellen (Hahn, 1996). Für einige Pflanzenspezies wurden spezifische, hochaffine Elicitor-Bindungsstellen nachgewiesen und charakterisiert (Nürnberg, 1999). Die biochemische Reinigung eines Heptaglucan-bindenden Proteins war Voraussetzung für die Klonierung des korrespondierenden Gens aus Soja (Ito *et al.*, 1997; Umemoto, 1997). Die Analyse der abgeleiteten Aminosäuresequenz und die heterologe Expression der cDNA in *E.coli* lieferten jedoch keinen Aufschluß über die Rezeptorfunktion des Proteins. Als wahrscheinlicher Rezeptor für den bakteriellen Elicitor Flagellin wurde ein Gen in Arabidopsis identifiziert, das für eine putative Rezeptor-Kinase kodiert, welche Homologien zu R-Genprodukten aufweist (Felix *et al.*, 1999; Gómez-Gómez und Boller, 2000). Möglicherweise beruht die Wirkungsweise von einigen unspezifischen Elicitoren wie z.B. Harpin auf der Induktion von transmembranen Ionenflüssen, die durch porenbildende Aktivität initiiert werden (Klüsener und Weiler, 1999; Lee *et al.*, 2001).

### **1.2.2 Signaltransduktion**

Durch die Bindung des Liganden an den Rezeptor werden intrazelluläre und systemische Signaltransduktionsprozesse initiiert, welche die pflanzliche Pathogenabwehr aktivieren. Die Induktion der Transkriptakkumulation von Abwehrgenen wird durch Prozesse wie die Aktivierung von Ionenkanälen der Plasmamembran, Proteinphosphorylierungen und

–dephosphorylierungen, die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und durch die Beteiligung von kleinen Molekülen, die als *second messenger* fungieren, vermittelt (Yang, 1997; Blumwald *et al.*, 1998; Ebel und Mithöfer, 1998; Scheel, 1998). Insgesamt sind die Kenntnisse über pflanzliche Signaltransduktionskaskaden, im Gegensatz zu tierischen Systemen, noch immer sehr lückenhaft.

Untersuchungen in Zellsuspensionskulturen zeigten, daß eine der schnellsten Reaktionen nach Elicitorbehandlung die Depolarisation von Plasmamembranen ist, die eine Änderung der Membranpermeabilität für einige Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, Protonen, Kalium- und Chlorid-Ionen bewirkt (Tavernier *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997; Ebel und Scheel, 1997). Inhibitorenstudien und der Einsatz von Ionophoren demonstrierten, daß ein transients Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration hinreichend und notwendig für die Induktion von nachfolgenden Abwehrreaktionen ist (Levine *et al.*, 1996; Piedras *et al.*, 1998; Chandra *et al.*, 1997, Blume *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2000). Elicitorresponsive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran können für den Influx der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen verantwortlich sein (Gelli *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997). Potentielle Interaktionspartner für die cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sind  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinasen und -phosphatasen (Romeis *et al.*, 2000) und Calmodulin oder Calmodulin-abhängige NAD-Kinasen, die den letzten Schritt der Synthese von NADPH katalysieren (Heo *et al.*, 1999; Harding *et al.*, 1997).

Eine Verbindung zwischen Rezeptor und nachgeschalteten sehr schnellen Reaktionen, wie z.B. der Aktivierung von Ionenkanälen, könnten heterotrimere G-Proteine herstellen. Pharmakologische Untersuchungen unter Verwendung von Effektoren (Mastoparan,  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ ) und Inhibitoren (Suramin) oder Experimente mit transgenen Tabakpflanzen, die die katalytische A1-Untereinheit des G-Proteinaktivators Choleratoxin exprimierten, lieferten erste Hinweise auf die Beteiligung von G-Proteinen (Rajasekhar *et al.*, 1999; Xing *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 1998; Legendre *et al.*, 1992; Beffa *et al.*, 1995).

Neben direkter antimikrobieller Effekte dient die massive und transiente Produktion von ROS (*oxidative burst*) als Signaltransduktionskomponente innerhalb der zur Aktivierung von Abwehrreaktionen führenden Signalketten. Analog zum unspezifischen Immunsystem von Säugetieren scheinen die ROS dabei oft synergistisch mit dem *second messenger* Stickstoffmonoxid (NO) zu fungieren (Van Camp und Van Montagu, 1998; Durner *et al.*, 1999). In Arabidopsis und in Soja-Zellsuspensionskulturen wurde gezeigt, daß NO ein wichtiges Signalelement bei der Auslösung der Pathogenantwort ist und die Applikation NO-generierender Substanzen eine Potenzierung des ROS-abhängigen Zelltodes bewirkt (Delledone *et al.*, 1998). Die Ausbildung von nekrotischen Läsionen auf Arabidopsis-Blättern nach Pathogeninfektion wird durch NO-Synthaseinhibitoren unterdrückt (Delledonne *et al.*, 1998). In Tabak wurde nach Infektion mit avirulenten Pathogenen erhöhte NO-Synthaseaktivität detektiert und durch exogene Applikation von NO die Expression von PR-Genen induziert. Die Transkriptakkumulation dieser PR-Gene wird auch durch die cyclischen Nukleotide cGMP und cADP-Ribose induziert (Durner *et al.*, 1998). Beide Moleküle sind prominente *second messenger* des Stickstoffmonoxids in Säugern.

Die Wirkung dieser für den *oxidative burst* und NO beschriebenen synergistischen Mechanismen wird durch Salicylsäure (SA) amplifiziert (Shirasu *et al.*, 1997; Delledonne *et al.*, 1998, Klessig *et al.*, 2000). SA stellt ebenfalls eine Schlüsselkomponente der pflanzlichen Pathogenabwehr dar, insbesondere bei der Ausprägung der SAR (Delaney, 1997). Die exogene Applikation von SA ist hinreichend für die Aktivierung von pflanzlichen Abwehrgenen und die Induktion der SAR. In transgenen Pflanzen, die das SA-degradierende Enzym Salicylathydroxylase exprimierten, wurden nach bakterieller Infektion weder lokale noch systemische Abwehrantworten aktiviert (Ryals *et al.*, 1996).

Die Phytohormone Jasmonsäure/Methyljasmonat und Ethylen regulieren in synergistischer Weise einen SA-unabhängigen Signalweg innerhalb der pflanzlichen Pathogenabwehr von perthotrophen Pilzen (Dong, 1998; Thomma, *et al.*, 1998; McDowell and Dangl, 2000). So wies die jasmonatinsensitive Arabidopsis-Mutante *coi1* verstärkte Suszeptibilität gegenüber verschiedenen perthotrophen Pilzpathogenen auf, während die Resistenzausbildung nach Infektionen mit biotrophen Pilzen jasmonatunabhängig war (Thomma, 1998).

### 1.3 Der *oxidative burst*

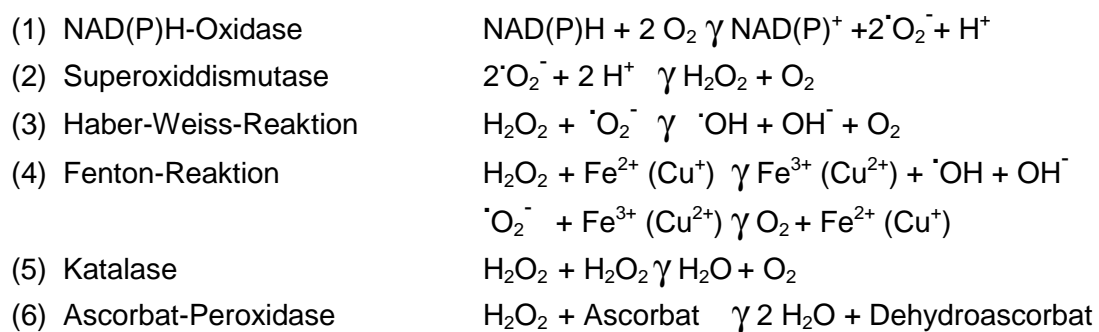
Die schnelle, transiente Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurde bei der Reaktion von Pflanzen auf biotischen und abiotischen Stress detektiert (Baker und Orlandi, 1995; Yahraus *et al.*, 1995; Lamb und Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997; Schraudner *et al.*, 1998; Scheel, 2000) und scheint auch als Komponente von Signaltransduktionsprozessen von Phytohormonen und bei der Regulation von vegetativen Entwicklungsprozessen zu fungieren (Pei *et al.*, 2000; Potikha *et al.*, 1999).

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung der ROS in Pflanzen führen, sind bisher noch unverstanden. Weiterhin sind die Kenntnisse hinsichtlich der chemischen Natur, der subzellulären Lokalisation und der physiologischen Funktionen der ROS größtenteils noch unvollständig.

#### 1.3.1 Reaktionen zur Entstehung der ROS

Die unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zusammengefaßten Moleküle entstehen durch sukzessive Einelektronenreduktionen von molekularem Sauerstoff. Dabei entsteht als erstes Reaktionsprodukt das Superoxidanionenradikal  $\cdot\text{O}_2^-$ , das im Gleichgewicht mit seiner protonierten Form, dem Hydroperoxidradikal  $\text{HO}_2^\cdot$ , vorliegt und im folgenden zur Vereinfachung als Superoxidanion  $\text{O}_2^-$  bezeichnet wird. Als einziger Schritt der aufgeführten Reduktionen erfordert diese Reaktion die Zufuhr von Energie, die in biologischen Systemen oft von NAD(P)H bereitgestellt wird [Abb.1 (1)] (Sutherland, 1991; Baker und Orlandi, 1995). Die spontane oder durch Superoxiddismutasen katalysierte Dismutation des Superoxidanions [Abb.1 (2)] führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist membranpermeabel, hat eine bedeutend längere Halbwertszeit als die anderen ROS und wirkt cytotoxisch. Die intrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration wird deshalb von

verschiedenen Enzymen kontrolliert. Katalasen katalysieren die Dismutierung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff [Abb.1 (5)]. Peroxidasen katalysieren eine analoge Reaktion, bei der  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch ein Reduktionsmittel (z.B. Ascorbat) zu Wasser reduziert wird [Abb.1 (6)] (Baker und Orlandi, 1995). Das am meisten reaktive Reaktionsprodukt und eines der stärksten Oxidationsmittel überhaupt ist das Hydroxylradikal  $\text{OH}^\cdot$ , welches durch eine durch Übergangsmetallionen katalysierte weitere Einelektronenreduktion des Peroxidations entsteht [Abb.1 (3),(4)] (Fenton-Reaktion). Wie das Superoxidanion hat es eine extrem kurze Halbwertszeit ( $<1\text{s}$ ), kann nicht in Membranen eindringen und entfaltet seine biologische Wirkung in dem unmittelbaren Bereich seiner Entstehung (Sutherland, 1991). Seine hohe, unspezifische Reaktivität gegenüber biologischen Makromolekülen führt zu Schädigungen von Desoxyribonukleinsäuren, Proteinen und der Integrität von Membranen (Halliwell und Gutteridge, 1990).



**Abb.1: Entstehung und mögliche Reaktionen reaktiver Sauerstoffspezies in Pflanzen (nach Baker und Orlandi, 1995).**

### 1.3.2 Der *oxidative burst* in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die Bedeutung des *oxidative burst* für die pflanzliche Pathogenabwehr ist wegen seiner zentralen Stellung und vielfältigen Wechselwirkungen mit anderen Signalelementen unumstritten, jedoch werden seine Herkunft und seine biologischen Funktionen innerhalb der pflanzlichen Pathogenabwehr teilweise kontrovers diskutiert (Sutherland, 1991; Medhy, 1994; Baker und Orlandi, 1995; Low und Merida, 1996; Lamb und Dixon, 1997; Wojtaszek, 1997; Bolwell, 1999; Scheel, 2000).

Da die Detektion, Unterscheidung und Quantifizierung der einzelnen ROS in Pflanzen nicht trivial ist, wird in vielen Fällen die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies unspezifisch, als extrazellulär gebildetes  $\text{H}_2\text{O}_2$ , gemessen (Baker und Orlandi, 1995). Mit der Etablierung von Methoden zur selektiven Detektion von  $\text{O}_2^\cdot$ -Ionen und dem Einsatz von Superoxiddismutase-Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß Superoxidanionen in einigen Systemen die primäre Komponente des *oxidative burst* darstellen (Auh und Murphy, 1995; Lamb und Dixon, 1997; Jabs *et al.*, 1997) und, durch extrazelluläre Superoxiddismutasen katalysiert, zu Wasserstoffperoxid und Wasser umgesetzt werden.

Die massive, transiente Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies in Pflanzen nach Pathogeninfektion wurde zum ersten Mal von Doke *et al.* (1983a) beschrieben, wobei die Bildung von  $O_2^-$ -Ionen in Kartoffelknollen nach Infektion mit einer avirulenten Rasse von *Phytophthora infestans*, nicht aber mit einer virulenten, detektiert wurde (Doke, 1983a; Doke, 1983b; Doke, 1985). Die Induktion eines *oxidative burst* wurde in der Folge bei einer Reihe von Pflanze/Pathogen-Interaktionen beobachtet, einschließlich phytopathogener Pilze (Vera-Estrella *et al.*, 1992), Bakterien (Mur *et al.*, 2000), Viren (Doke und Ohashi, 1988) oder durch den Einsatz von Elicitorpräparationen (Apostol *et al.*, 1989; Baker *et al.*, 1993; Legendre *et al.*, 1993; Nürnberger *et al.*, 1994; May *et al.*, 1996; Piedras *et al.*, 1998). Dabei wird meist die Produktion eines biphasigen *burst* beobachtet, wobei die zweite, länger andauernde Phase mit der Etablierung von Resistenzantworten innerhalb der Ausbildung der Wirts-, als auch Nichtwirtsresistenz, korreliert (Baker und Orlandi, 1995). Die erste Phase scheint eine Antwort auf verschiedene Stimuli wie z.B. Verwundung zu sein und wird auch bei kompatiblen Interaktionen beobachtet (Grant und Loake, 2000).

Neben einer direkten antimikrobiellen Wirkung der ROS gegenüber pilzlichen als auch bakteriellen Pathogenen (Peng und Kuc, 1992; Wu *et al.*, 1995) ist ihre katalytische Wirkung bei der sehr schnell (2-5 min) einsetzenden Vernetzung von Strukturproteinen der Zellwand oder von zellwandgebundenen phenolischen Verbindungen von essentieller Bedeutung (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994). Die Verstärkung der Zellwand in Folge der Vernetzungsreaktionen führt zu einer erhöhten Resistenz der Zellwand gegenüber den von Pathogenen generierten zellwandabbauenden Enzymen (Brisson *et al.*, 1994). Die Induktion dieser Reaktionen ist durch den NADPH-Oxidase-Hemmstoff Diphenyliodonium (DPI) und Katalase hemmbar, ebenso wie durch den Peroxidase-Inhibitor Salicylhydroxamsäure (Otte und Barz, 1996). Im Zusammenhang mit der daraus abgeleiteten Hypothese, daß die oxidative Vernetzung der Zellwand durch Peroxidasen katalysiert wird, ist der histochemische Nachweis einer Peroxidaseaktivität an der Infektionsstelle von Bedeutung (McLusky *et al.*, 1999).

Die zentrale Rolle des *oxidative burst* als Signalelement bei der Auslösung von Resistenzantworten wurde u.a. durch den Einsatz von Inhibitoren und Effektoren und durch die Generierung transgener Pflanzen gezeigt. Die Applikation von DPI und Diphenyliodonium (IDP) inhibierte in vielen Pflanze/Pathogen-Systemen die Produktion der ROS und nachfolgende Abwehrantworten wie die Phytoalexinbiosynthese (Murphy and Auh, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Mithoefer *et al.*, 1997; Grant *et al.*, 2000). In transgenen Kartoffelpflanzen, in denen eine  $H_2O_2$ -generierende Glucose-Oxidase exprimiert wurde, führte die erhöhte Konzentration an  $H_2O_2$  zur konstitutiven Expression von einigen Abwehrmechanismen und gesteigerter Resistenz gegenüber verschiedenen Phytopathogenen (Wu *et al.*, 1995; Wu *et al.*, 1997). Untersuchungen mit transgenen Tabakpflanzen, in denen die Expression  $H_2O_2$ -degradierender Enzyme wie Katalase und Ascorbat-Peroxidase suprimiert war, sprechen für die Beteiligung von ROS bei der transkriptionellen Aktivierung von PR-Genen oder der Ausbildung der HR (Chamnopol *et al.*, 1998; Mittler *et al.*, 1999). Hingegen ist in anderen Systemen die Induktion der Transkriptakkumulation von Abwehrgenen oder der Phytoalexinbiosynthese nach

Pathogeninfektion unabhängig von der Produktion der ROS (Davis *et al.*, 1993; Levine *et al.*, 1994; Piedras *et al.*, 1998; Dorey, 1999). Die essentielle Rolle, die  $H_2O_2$  bei der Etablierung der SAR in Arabidopsis nach Inokulation mit einer avirulenten Rasse des Pathogens *Pseudomonas syringae* zukommt, wurde von Alvarez *et al.*, (1998) demonstriert. Sowohl die an der Infektionsstelle detektierten ROS, als auch die von *micro-bursts* abhängigen, nichtsichtbaren Mikroläsionen in nichtinfizierten Blättern sind für die Etablierung der SAR in Arabidopsis essentiell (Alvarez *et al.*, 1998).

Auf genetischer Ebene stellt die rezessive *lsd1*-Mutante (*lesions simulating disease resistance*) aus Arabidopsis einen Beweis für die Beteiligung von ROS an der Ausbildung der HR dar (Jabs *et al.*, 1996). Die Mutante war nicht in der Lage, die Expression von Abwehrgenen und den Zelltod in Abwesenheit von Pathogenen zu kontrollieren. Die lokale, exogene Applikation von  $O_2^-$  war in konzentrationsabhängiger Weise hinreichend für spontane Entstehung von Läsionen. Dieser Effekt wurde durch DPI, wiederum konzentrationsabhängig, inhibiert. LSD1 kodiert für einen Zinkfinger-Transkriptionsfaktor und fungiert als negativer Regulator innerhalb der zum Zelltod führenden Signaltransduktionskaskade (Dietrich *et al.*, 1997). Andererseits existieren eine Reihe von Pflanze/Pathogen-Systemen und Arabidopsis-Mutanten, in denen gezeigt wurde, daß die Produktion von ROS notwendig, aber nicht hinreichend für Auslösung der HR ist (Glazener *et al.*, 1996; Dorey *et al.*, 1999; Grant *et al.*, 2000).

### 1.3.3 Herkunft des *oxidative burst*

Durch Vergleiche der unspezifischen Immunabwehr bei Tieren mit Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr lassen sich funktionelle Parallelen ableiten. So produzieren Tiere und Pflanzen ähnliche, kationische Peptide mit antimikrobieller Wirkung (Hancock und Scott, 2000) und auf der anderen Seite verfügen bakterielle Pathogene über konservierte Mechanismen, um virulente Determinanten über das TypIII-Sekretionssystem in den pflanzlichen oder tierischen Wirt einzuschleusen (Collmer *et al.*, 2000). So wird auch diskutiert, daß die induzierbare, transiente Bildung von ROS wie in Säugetieren durch eine NADPH-Oxidase katalysiert wird (Doke *et al.*, 1985; Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997; Jabs *et al.*, 1997). Einige pflanzliche Homologe der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, *gp91<sup>phox</sup>*, wurden bisher aus Mono- und Dikotyledonen kloniert (Groom *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 1999). Für die korrespondierenden Proteine konnte bisher weder NADPH-Oxidase-Aktivität, noch eine Funktion innerhalb des *oxidative burst* gezeigt werden. Pflanzliche Homologe des Rac2-Proteins, das als Aktivator der NADPH-Oxidase aus Phagozyten fungiert (siehe 1.3.4.), wurden identifiziert und eine analoge Regulatorfunktion in Pflanzen postuliert (Kieffer *et al.*, 1997; Xing *et al.*, 1997; Potikha *et al.*, 1999; Kawasaki *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2000).

Es werden auch alternative Mechanismen für die Produktion der ROS in Pflanzen diskutiert (Allan und Fluhr, 1997; Bolwell *et al.*, 1998; Bolwell, 1999). So werden im Apoplasten lokalisierte Peroxidasen (Bestwick *et al.*, 1997; Bestwick *et al.*, 1998), Amin-Oxidasen

(Allan und Fluhr, 1997) und Oxalat-Oxidasen (Zhang *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 1998) als mögliche ROS-Bildner in Pflanzen vermutet. Da sowohl die in Gerste beschriebene Oxalat-Oxidaseaktivität, als auch die in Bohne charakterisierte Peroxidaseaktivität nicht durch DPI hemmbar waren, müßten verschiedene Wege, die entweder kooperativ oder parallel nebeneinander bestehen, an der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sein.

#### 1.3.4 Die NADPH-Oxidase aus Neutrophilen

In den Makrophagen und Leukozyten dient die massive Freisetzung von Superoxidanionen (*respiratory burst*) der direkten Infektionsabwehr. Eindringene Pathogene werden durch Phagozytose aufgenommen und durch die synergistische Wirkung von ROS und NO abgetötet (Babior, 1999, Nathan und Shiloh, 2000). Die Produktion der ROS in den Phagozyten wird durch einen multimeren NADPH-Oxidase-Komplex katalysiert, der pharmakologisch, biochemisch und genetisch detailliert charakterisiert wurde (Babior, 1992; Babior, 1999). Mutationen in den kodierenden Genen können zu einer Immunschwäche führen, die eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber bakteriellen und pilzlichen Infektionen bewirkt (*chronic granulomatous disease*, CGD) (Henderson und Chappell, 1996).

Die humane NADPH-Oxidase aus Phagozyten besteht aus einem heterodimeren Flavocytochrom  $b_{558}$  und drei cytosolischen regulatorischen Untereinheiten  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  und  $p40^{phox}$  (Leto *et al.*, 1990; Rotrosen *et al.*, 1992; Henderson und Chappell, 1996; Sathymoorthy *et al.*, 1997). Dabei enthält das Flavocytochrom die glycosylierte, katalytische Untereinheit  $gp91^{phox}$  und  $p22^{phox}$ , die in der Plasmamembran von sekretorischen Vesikeln und spezifischen Granula lokalisiert sind. Nach Perzeption unterschiedlicher Stimuli wird durch die Beteiligung von G-Proteinen und mehrfacher Phosphorylierung der  $p47^{phox}$ -Untereinheit die Rekrutierung der cytosolischen Untereinheiten an die Plasmamembran initiiert, wo die Assoziation mit dem Flavocytochrom erfolgt und der aktive NADPH-Oxidase-Komplex gebildet wird (De Leo *et al.*, 1996; Wientjes *et al.*, 1997; Reeves *et al.*, 1999). An der Assemblierung des aktiven Komplexes sind außerdem die kleinen GTP-bindenden Proteine Rac1, Rac2 und Rap1A beteiligt (Knaus *et al.*, 1991; Diekmann *et al.*, 1994; El Benna *et al.*, 1994; Bokoch, 1995; Dusi *et al.*, 1996; Gorzalczyk *et al.*, 2000).

Außerhalb des Immunsystems wird der, durch die Perzeption von Wachstumsfaktoren oder Cytokinen stimulierten, transienten Produktion von ROS eine Rolle bei der Signaltransduktionsübertragung innerhalb der Mitogenese und Apoptose zugeschrieben (Irani *et al.*, 1997; Ebert und Bunn, 1999; Finkel, 2000; Lambeth *et al.*, 2000). Bemerkenswert war somit die Identifizierung und teilweise Charakterisierung der physiologischen Funktionen von humanen  $GP91^{phox}$ -Homologen, die möglicherweise in die oben aufgeführten Signaltransduktionsprozesse involviert sind. Dabei zeigte sich, daß die katalytische Untereinheiten allein funktionell sind. (Suh *et al.*, 1999; Dupuy *et al.*, 1999; Geiszt *et al.*, 2000; de Deken *et al.*, 2000).



## 1.4 Das Modellsystem aus einer Petersiliezell suspensionskultur und Peptidelicitoren

Die Infektion von Petersilieblättern (*Petroselinum crispum* L.) mit auskeimenden Zoosporen des Oomyceten *Phytophthora sojae* führt zur Ausbildung einer Nichtwirtsresistenz, die eine Kolonisierung durch den Pilz wirkungsvoll verhindert. Vergleichbar reagieren auch Petersiliezell suspensionskulturen und Protoplasten nach Behandlung mit dem Kulturfiltrat oder mit Präparationen der Mycelwand mit den charakteristischen Abwehrreaktionen wie der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen und nachfolgenden Biosynthese und Sekretion von Furanocumarin-Phytoalexinen (Abb. 2) (Hauffe *et al.*, 1986, Hahlbrock und Scheel, 1989; Hahlbrock *et al.*, 1995). Mit Ausnahme der Kalloseauflagerung auf die Zellwand und dem Auftreten einer HR gleicht somit das komplexe Abwehrprogramm in den Zellsuspensionskulturen oder Protoplasten dem in der Ganzpflanze. Als elicitoraktive Komponente wurde ein 42-kDa-Protein aus dem Kulturfiltrat des Oomyceten gereinigt (Parker *et al.*, 1991). Innerhalb dieses Proteins wurde eine 13 Aminosäuren lange Peptidsequenz (Pep13) identifiziert, welche hinreichend und notwendig für die Auslösung der Abwehrreaktionen in der Petersilie ist (Nürnberg *et al.*, 1994).

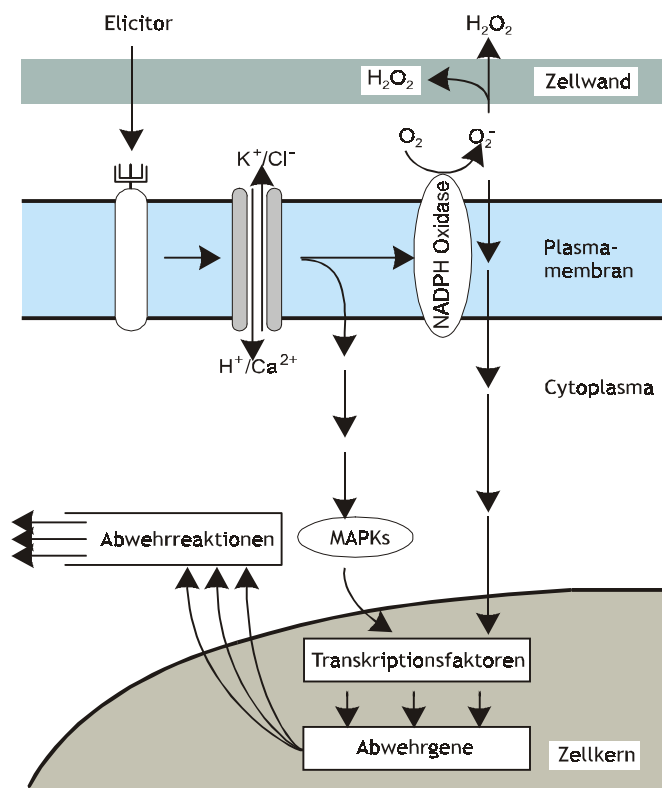


Abb. 2: Hypothetisches Modell der Signaltransduktion der elicitorinduzierten Abwehrreaktionen in Petersilie (nach Jabs *et al.*, 1997)

In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Pep13 wurde eine spezifische, hochaffine Bindungsstelle in der Plasmamembran identifiziert, die rezeptortypische Eigenschaften wie Saturierbarkeit und Reversibilität der Ligandenbindung aufwies. Unter Verwendung von proteinvernetzenden Substanzen wurde ein 100-kDa-Protein identifiziert, das nach Solubilisierung durch Affinitätschromatographie 5000fach angereichert wurde (Nürnberger *et al.*, 1995; Nennstiel *et al.*, 1998). Die Reinigung und Klonierung des korrespondierenden Gens wurde bisher durch die äußerst geringe Abundanz des putativen Rezeptors erschwert.

Wie die Signale zwischen Rezeptor, Ionenströmen und nachfolgenden Reaktionen vermittelt werden, ist nicht bekannt. Heterotrimere G-Proteine könnten an der Aktivierung der frühesten Abwehrreaktionen beteiligt sein. Die Behandlung von Petersiliezellen mit Mastoparan, nicht aber mit dem inaktiven Analogon mas17, induzierte Ionenflüsse, den *oxidative burst*, und die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen wie PAL, 4-CL, Eli11 und Eli12 (Heidi Zinecker, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die detaillierte Analyse des Eingangssignals Pep13 (vgl. 3.1.5) stellte, neben der Etablierung von Petersiliezellensuspensionskulturen, eine herausragende Voraussetzung dar, um die biochemischen und molekularbiologischen Mechanismen, die zu einer rezeptorvermittelten Erkennung des Pathogens und zur Ausbildung der Resistenz führen, zu analysieren (Nürnberger *et al.*, 1994; Ligterink *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000). Sehr schnell induzierbare Abwehrreaktionen (2-5 min) konnten in diesem Modellsystem untersucht werden. Dazu zählen der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und Protonen, sowie ein Ausstrom von  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$ -Ionen (Nürnberger *et al.*, 1994). In transgenen, Apoäquorin-exprimierenden Petersiliezellkulturen wurde von Blume *et al.* (2000) gezeigt, daß der elicitorinduzierte Anstieg der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration rezeptorvermittelt ist, extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle einströmen und ein kausaler Zusammenhang zur Aktivierung von Abwehrreaktionen besteht. Die Änderung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration erfolgte dabei in einem biphasigen Verlauf, der durch einen kurzen, steilen Anstieg auf etwa 1  $\mu\text{M}$  und das darauffolgende Absinken auf 300 nM, charakterisiert war. Es wurde gezeigt, daß die langanhaltende Erhöhung der cytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf etwa 300 nM, ebenso wie die Ionenströme hinreichend und notwendig für die Aktivierung der nachfolgenden Abwehrantworten erforderlich war (Jabs *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000). In der Plasmamembran von Petersilieprotoplasten konnte bisher mittels der Patch-Clamp-Technik ein elicitorresponsiver  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal identifiziert werden (Zimmermann *et al.*, 1997).

Innerhalb von wenigen Minuten nach Elicitorbehandlung erfolgt die Aktivierung von drei Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) mit einem Aktivitätsmaximum nach 5-10 Minuten (Kroj, 1999). So konnte in Petersilie zum ersten Mal der Nachweis über die rezeptorvermittelte Aktivierung von pflanzlichen, elicitorresponsiven MAPKs geführt werden (Ligterink *et al.*, 1997; Kroj, 1999). Immunlokalisationsstudien mit elicitorbehandelten und unbehandelten Petersiliezellen zeigten, daß mindestens eine der elicitorresponsiven MAPKs in den Kern wandert. Dabei ist die Kernlokalisation ebenso wie die Aktivierung

durch zweifache Phosphorylierung ein transients Vorgang (Ligterink *et al.*, 1997). Den Eingriff von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen in verschiedene Ebenen der Signalketten belegen zahlreiche Untersuchungen mit Proteinkinase- und Proteinphosphataseinhibitoren (Dietrich *et al.*, 1990; Conrath *et al.*, 1991; Renelt *et al.*, 1993; Blume *et al.*, 2000).

Ebenfalls wenige Minuten nach Elicitorzugabe wird die Akkumulation von ROS im Kulturmedium beobachtet (Nürnberg *et al.*, 1994). Die Zugabe von  $O_2^-$ -Ionen zum Kulturmedium in Gegenwart des SOD-Inhibitors Diethyldithiocarbamat (DDC) bewirkte die Induktion der Furanocumarin-Biosynthese (Jabs, *et al.*, 1997). Durch den Einsatz von DPI wurde gezeigt, daß spätere Antworten wie die Akkumulation von Furanocumarinen stromabwärts des *oxidative burst* liegen und die Aktivierung der MAPKs möglicherweise einen parallelen Signalweg darstellt, der zur Aktivierung von Petersilie-PR-Genen führt (Jabs *et al.*, 1997; Ligterink *et al.*, 1997; Kroj, 1999).

## 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die molekularen Mechanismen, die zur Entstehung des *oxidative burst* in Pflanzen führen, sind trotz der wichtigen Rolle der ROS bei der pflanzlichen Pathogenabwehr nicht bekannt und stehen im Mittelpunkt des Interesses dieser Arbeit. Das Ziel bestand somit in der Isolierung und molekularbiologischen Charakterisierung von Genen, deren Genprodukte die primäre Bildung von  $O_2^-$ -Ionen katalysieren. Vorausgegangene Arbeiten haben in *gain-of-function*- und *loss-of-function*-Experimenten gezeigt, daß in Petersilie die transiente Produktion von  $O_2^-$ -Ionen hinreichend und notwendig für die Induktion von Abwehrmechanismen wie die Phytoalexinbiosynthese ist (Jabs *et al.*, 1997). Die Kenntnis von Enzymen, die  $O_2^-$ -Ionen freisetzen, würde einen wichtigen Schritt zur Aufklärung der zur Aktivierung von Abwehrreaktionen führenden Signaltransduktionskaskaden darstellen. Das Hauptaugenmerk lag zuerst bei der Identifizierung von Gene(n), deren abgeleitete Aminosäuresequenzen Homologien zur katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, GP91<sup>phox</sup>, aufwiesen. Durch heterologe Expression der zu untersuchenden Proteine sollte eine mögliche enzymatische Aktivität bestimmt werden. Experimente mit transgenen Zellkulturen könnten Hinweise auf eine mögliche physiologische Funktion liefern.

Im Verlaufe der Arbeiten ergab sich eine weitere Fragestellung, nachdem in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen der Dissertation von M. Tschöpe (1999) auf biochemischem Weg eine NADPH-Oxidaseaktivität aufgereinigt wurde. Die Identifizierung einer 98-kDa-Bande, deren Auftreten mit der Enzymaktivität korrelierte, führte nach Elution des Proteins aus dem Gel zur Isolierung von Peptidfragmenten. Einige der analysierten Peptidsequenzen wiesen signifikante Homologien zu pflanzlicher Oxidasen auf, jedoch nicht zu GP91<sup>phox</sup>-Homologen oder zu den Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus Säuger-Phagozyten. Die Klonierung der korrespondierenden cDNA-Klone aus Petersilie sollte die weitere funktionelle Charakterisierung der neuen, putativen NADPH-Oxidase ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), C.Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferten die Firmen Riedel-de Haen (Hannover) und Merck. Substanzen für Kulturmedien wurden von den Firmen Bio 101, Clontech, Difco Lab. (Detroit, USA) und Sigma bezogen. Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Boehringer (Mannheim), Clontech, Eurogentech (Seraing, Belgien), Promega (Madison, USA) und Quiagen geliefert. Es wurden Röntgenfilme der Firmen Fuji und Kodak (Rochester, USA) benutzt. Die Antikörperproduktion in Kaninchen wurde von der Firma Eurogentech durchgeführt. Den monoklonalen V5-Antikörper lieferte die Firma Invitrogen. Oligonucleotide wurden von der Firma MWG Biotech (München) synthetisiert. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 1 aufgeführt.

### 2.2 Kultivierung und Behandlung der Petersiliezellen

Zellsuspensionskulturen der Petersilie (*Petroselinum crispum*) wurden in modifiziertem Gamborgs B5-Medium (HA-Medium) mit  $1 \text{ mg l}^{-1}$  2,4-D im Dunkeln bei 26°C geschüttelt und alle 7 Tage in frisches Medium überführt.

#### 2.2.1 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen

Für Elicitierungsexperimente wurden 6 Tage alte Zellen durch Filtration geerntet, mit I-Medium (4% modifiziertes B5-Medium, 3% Saccharose, 10 mM Mes pH 5,7) gewaschen und in frischem I-Medium resuspendiert. Nach mindestens 45 min Äquilibrieren im Dunkeln bei 26°C unter konstantem Schütteln (120U/min) wurde die Suspensionskultur mit wässriger Elicitorstammlösung versetzt. Für Pep25 (Sequenz: DVTAGAEVWNQPVRGFKVYEQTEMT) wurde eine 20  $\mu\text{M}$  Stammlösung und für das Pep13 Analogon A2 (Sequenz: VANQPVRGFKVYE) eine 10  $\mu\text{M}$  Lösung verwendet (Nürnberger *et al.*, 1994). Zur Messung der  $\text{O}_2^-$ -Konzentration im Kulturmedium wurde die Suspensionskultur mit 500  $\mu\text{M}$  SOD-Inhibitor Diethyldithiocarbamat (DDC) und mit 50 nM Pep 25 versetzt.

Zur Untersuchung der Inhibitorwirkung von DPI wurde die Zellsuspension mit 0,1-0,01% einer 50 mM Stammlösung (in DMSO) versetzt und vor Zugabe des Elicitors für 15 min vorinkubiert. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Elicitorbehandlung durch Filtration geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In gleich behandelten Proben wurde nach 24 h die Akkumulation der Furanocumarin-Phytoalexine gemessen.

### 2.2.2 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium

Die Akkumulation der autofluoreszierenden Furanocumarinphytoalexine wurde nach 24 h Behandlung der Petersiliezellen mit Elicitor oder anderen Effektoren mittels eines Mikrotiterplatten-Fluorometers (Cytoflor II, Biosearch, Bedford, USA) bestimmt. Ihre Detektion erfolgte durch Fluoreszenzmessung bei 440 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm (Parker *et al.*, 1991).

### 2.2.3 Präparation von Proteinextrakten aus Petersilie

#### 2.2.3.1 Gewinnung von Gesamtproteinextrakten

Gefrorene Petersiliezellen (0,2 mg) oder zu untersuchende Pflanzenteile wurden im 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemörsernt. Nach Zugabe von 100 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris, pH 7,4; 1 mM EDTA; 200 µM Pefabloc; 10 µM Leupeptin; 0,05% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol) erfolgte die Zentrifugation (4°C, 10 min, 15.000 rpm) und der Überstand wurde analysiert.

#### 2.2.3.2 Präparation von mikrosomaler Zellfraktion (nach Tschöpe, 1999)

Petersiliezellen wurden nach 6 Tagen Kultivierung durch Filtration geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. 50g gefrorene Zellen wurden mit 50ml Extraktionspuffer (25mM Mes/Tris, pH 7,5, 10 mM EDTA, 200 µM Pefabloc, 10µM Leupeptin, 250 mM Saccharose, 3,3 g Dowex1x2-400 ) versetzt und für 5x3 min mit einem Polytron (PT-MR 6000, Kinematica, Littau, Schweiz) aufgeschlossen und homogenisiert. Nach 25 min Zentrifugation (15.000 rpm, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und durch die anschließende Ultrazentrifugation (60 min, 40.000 rpm, 4°C) wurde die mikrosomale Fraktion pelletiert. Das Sediment wurde 3x mit je 5 ml Resuspensionspuffer (0,34 M Saccharose; 10 mM Tris, pH 7.5) überspült und anschließend in 1,5 ml dieser Lösung resuspendiert. Die Mikrosomensuspension wurde in einem Glaspotter homogenisiert und bei -80°C eingefroren und gelagert. Alternativ wurden 3g gefrorene Zellen gemörsernt und mit 1,5 ml Extraktionspuffer gemischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (4°C, 10 min, 15.000 rpm) und der Überstand wurde einer Ultrazentrifugation (60 min, 40.000 rpm, 4°C) unterworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Puffer (vgl. oben) resuspendiert.

### 2.2.4 Stabile Transformation von Petersiliezellen (nach Feiner *et al.*, 1992)

Für die Herstellung der Konstrukte wurde der binäre, pflanzliche Expressionsvektor pBIB-PFF19 verwendet (Becker, 1990; Timmermanns *et al.*, 1990). Der Vektor wurde uns freundlicherweise von Dr. Jacek Hennig, Warschau, zur Verfügung gestellt.

Die stabile Transformation von Petersiliezellen erfolgte mittels Beschießen durch eine Partikelkanone. Besonders wichtig für den Erfolg dieser Experimente war die Gewährleistung steriler Bedingungen. Drei Tage alte Zellkulturen wurden durch Filtration geerntet, anschließend gewaschen und nach Bestimmung des Frischgewichtes auf 35-50 mg Frischgewicht /ml verdünnt. Je 3 ml der Zellsuspension wurden kurz mittels einer Vakuumpumpe auf sterile, mit HA-Medium befeuchtete Filter (4,5 cm) in einem

Büchnertrichter gesaugt. Die Zellen bildeten dabei eine dünne Schicht auf dem Filter. Die Filter wurden auf Petrischalen (6cm, HA-Medium, 0,3 M Mannitol, 0,6% Agarose) übertragen und für zwei Stunden bei 26°C im Dunkeln inkubiert. In dieser Zeit wurden die DNA-Goldpartikel-Suspensionen vorbereitet. Dafür wurden folgende sterile Stammlösungen benötigt:

1. 2,5 M  $\text{CaCl}_2$
2. 0,1 M Spermidin
3. Goldpartikel (Aldrich, 1.5 – 3  $\mu\text{m}$  Durchmesser): 50 mg wurden abgewogen und mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol sterilisiert. Nach Zentrifugation (2 min, 14.000 rpm) wurde der Überstand entfernt, das Pellet getrocknet und es erfolgte die Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  sterilen Wassers.

Für zehn Schüsse (10  $\mu\text{l}$  je Schuss) wurde die Suspension folgendermaßen vorbereitet: Die DNA-Präparation wurde auf 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  verdünnt. In ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß wurden 100  $\mu\text{l}$  gut resuspendierter Goldpartikel gegeben. Die folgenden Schritte 1–6 wurden ohne Unterbrechung der intensiven Durchmischung (Vortex) durchgeführt.

1. Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  2,5 M  $\text{CaCl}_2$
2. Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  0,1 M Spermidin
3. 3 min intensives Mischen
4. Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Ethanol (-20°C)
5. intensives Mischen
6. Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Ethanol
7. Durchmischen der Suspension durch Invertieren des geschlossenen Reaktionsgefäßes
8. Fällung der DNA-Goldpartikel bei -20°C für 30 min
9. Nach 30 s Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Partikel unter der Sterilbank getrocknet.
10. Nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  sterilem Wasser wurde das Präzipitat zu einer sehr feinen Suspension resuspendiert.

Das Beschießen der Petersiliezellen erfolgte wie folgt: Zuerst wurde der Druck der Heliumflasche auf 9 bar eingestellt. Anschließend wurden 10  $\mu\text{l}$  der DNA/Goldpartikelsuspension auf einen Schraubfilter (13mm Durchmesser) aufgetragen. Nachdem das angelegte Vakuum -0,8 bar erreicht hatte, wurde der Schuss ausgelöst. Die Petrischalen wurden für einen Tag bei 26°C im Dunkeln inkubiert und anschließend auf Petrischalen mit Selektionsmedium übertragen (6cm Durchmesser; HA-Medium mit 0,6% Agarose und 30 mg/l Hygromycin B). Nach 5-7 Wochen können hygromycinresistente Kalli isoliert und analysiert werden.

## 2.3 Bestimmung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies

### 2.3.1 Luminol-Lumineszenz-Methode zur Bestimmung der $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration (nach Warm und Laties, 1982)

Die Methode basiert auf der Ferricyanid-katalysierten Peroxidation von Luminol durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ , die zur Bildung von Stickstoff, Wasser und eines Aminophalimid führt. Die dabei auftretende Chemilumineszenz wurde quantitativ in einem Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold, Bad

Wildbach) erfaßt und ermöglichte die Bestimmung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration. Für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messung im Kulturmedium wurden 750  $\mu\text{l}$  Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,9) und 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in ein 5-ml-Meßröhrchen gegeben. Anschließend erfolgte die automatische Injektion von 200  $\mu\text{l}$  Luminol (0,3 mM in Kaliumphosphat-Puffer) und 100  $\mu\text{l}$  Kaliumhexacyanoferrat-(III) (14 mM in Kaliumphosphat-Puffer) im Luminometer. Drei Sekunden nach der letzten Injektion wurde die Chemilumineszenz (in relativen Lichtenheiten, RLE) über einen Zeitraum von 5 s gemessen. Zur Kalibrierung diente eine 30%ige  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung, die mit entsprechenden Medium der Proben zu Konzentrationen von 0,2 – 100 mM (0,01-5 nmol/50  $\mu\text{l}$  Probevolumen) verdünnt wurde.

### **2.3.2 Lucigenin-Lumineszenz-Methode zur Bestimmung der $\text{O}_2^-$ -Konzentration (nach Corbisier et al., 1987)**

Die Methode beruht auf der Reaktion des Lucigenin-Kationenradikals mit dem Superoxidanionenradikal unter Bildung eines instabilen Dioxetan-Intermediats. Dieses zerfällt in zwei Moleküle N-Methylacridon, wobei eines der entstandenen Moleküle in einem elektronisch angeregten Zustand war und unter Emission eines Photons in seinen Grundzustand überging (Allen, 1986; Li *et al.*, 1998). Die Messung der emittierten Lichtmenge ermöglichte die Quantifizierung der Superoxidanionen. Für die  $\text{O}_2^-$ -Messung im Kulturmedium wurden 750  $\mu\text{l}$  Glycin/NaOH-Puffer (100 mM Glycin, 1 mM EDTA, pH 9,0) und 50  $\mu\text{l}$  Zellsuspension in ein 5-ml-Meßröhrchen gegeben. Im Luminometer erfolgte dann die Injektion von 200  $\mu\text{l}$  Lucigenin (0,55 mM in Glycin/NaOH-Puffer) und 100  $\mu\text{l}$  Glycin/NaOH-Puffer. Bei der  $\text{O}_2^-$ -Messung in Proteinextrakten wurde neben der Menge der Probe (z.B. 5  $\mu\text{l}$ ), SOD-Inhibitor DDC (0,5 mM Endkonzentration) und Kosubstrat NAD(P)H (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) zum Reaktionsansatz gegeben, so daß ein Endvolumen von 800  $\mu\text{l}$  entstand. Die Kalibrierung erfolgte mittels des  $\text{O}_2^-$ -generierenden Systems Xanthin/Xanthin-Oxidase. Durch die Zugabe von 0,025 - 25 mE Xanthin-Oxidase war eine lineare Abhängigkeit des Lucigeninsignals meßbar.

### **2.3.3 Eine Methode zur Bestimmung der $\text{O}_2^-$ -Konzentration basierend auf der Reduktion des Tetrazoliumfarbstoffes XTT**

Die Methode basiert auf der Reduktion des Tetrazoliumfarbstoffes XTT [Natrium 3-(1-(Phenylaminocarbonyl)-3,4-Tetrazolium)-bis(4-Methoxy-6-Nitro) Benzensulfonsäure-hydrat] zum löslichen XTT-Formazan (Sutherland und Learmonth, 1997; Able *et al.*, 1998). Die Reduktion des Farbstoffes wird durch SOD gehemmt. Die Durchführung der Enzymaktivitätsmessungen in NIH-3T3 Zellen erfolgte nach Suh *et al.* (1999).

## **2.4 Molekularbiologische Arbeiten**

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

### 2.4.1 Bakterien- und Hefestämme, Phagen, Plasmide

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

**Tabelle 2: Verwendete Phagen, Plasmidvektoren und Bakterienstämme**

Plasmide	Charakteristika	Wirt	Referenz
PUC18/19	<i>ColEI</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	DH5α	Invitrogen
pBluescript SK <sup>-</sup>	f1 ori, <i>ColEI</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup>	DH5α•	Stratagene
pGEM-T	f1 ori, <i>ColEI</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , T7- und SP6-Promotor	DH5• α, 109	JM Promega
pCR <sup>TM</sup> II	f1 ori, <i>ColEI</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , T7- und SP6-Promotor	INVαF <sup>+</sup>	Invitrogen
pGEX-5X-2	<i>ColEI</i> ori, MCS, Amp <sup>r</sup> , <i>lacI<sup>q</sup></i> , <i>tac</i> -Promotor, RBS, <i>GST</i>	DH5• , BL21	Amersham Pharmacia
pBIB-PFF19	oriV, ori T, MCS, Kan <sup>r</sup> , CaMV-35S-Promotor, NOS-Promotor, Ag <sub>7</sub> pA, HPT <sup>r</sup> , CaMV-35S-pA	TOP10F <sup>+</sup>	Timmermanns <i>et al.</i> , (1990), Becker (1990)
pBK-CMV	f1 ori, <i>ColEI</i> ori, SV40 ori, <i>lacZ</i> , MCS, Neo <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup> , T3- und T7-Promotor, CMV- und <i>lac</i> -Promotor, SV40 pA	XL0LR DH5α	Stratagene
pYES2.1/V5-His-TOPO	<i>GAL1</i> -Promotor, T7-Promotor, V5, His-Tag, <i>CYC1</i> , pUC ori, <i>URA3</i> , Amp <sup>r</sup> , 2μ ori, f1 ori	TOP10F <sup>+</sup>	Invitrogen
pYES2	f1 ori, 2μ ori, <i>GAL1</i> -Promotor, <i>CYC1</i> , MCS, <i>URA3</i> , Amp <sup>r</sup>	DH5α	Invitrogen
pEF6/V5-His TOPO	EF-1α-Promotor, T7-Promotor, V5, His-Tag, BGH pA, f1 ori, SV40 ori, EM-7-Promotor, <i>bsd</i> , SV40 pA, pMB1 ori, <i>bla</i> -Promotor, Amp <sup>r</sup>	TOP10F <sup>+</sup>	Invitrogen
Phage/Phagen-Vektoren			
λZAP Express <sup>TM</sup>	Excision von pBK-CMV	XL1-Blue MRF <sup>+</sup>	Stratagene
ExAssist	M13-Derivat, <i>amber</i> Mutation	XL1-Blue MRF <sup>+</sup> , XL1-Blue	Stratagene
LambdaFIXII	T3- und T7-Promotor	XL1-Blue MRA	Stratagene



**Tabelle 3: Verwendete *E. coli*-Stämme**

<i>E. coli</i> -Stämme	Referenz
DH5 $\alpha$	Invitrogen (San Diego, USA)
JM109	Promega (Madison; USA)
BL21	Pharmacia (Uppsala, Schweden)
XL1-Blue-MRF'	Stratagene (La Jolla, USA)
XL0LR	Stratagene
SOLR	Stratagene
XL1-Blue-MRA	Stratagene
XL1-Blue	Stratagene

### 2.4.2 PCR-Amplifikation von DNA

Zur PCR-Amplifikation wurden 1–10 ng DNA-*Template*, 5  $\mu$ M Primer (0,5  $\mu$ M), 20 nM dNTPs (20  $\mu$ M), 15 mM MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 5 U/ $\mu$ l Taq-Polymerase (0,5–1U) und 10x PCR-Puffer nach Herstellerangaben in einem Volumen von 25 oder 50  $\mu$ l eingesetzt. Nach 1 min Denaturierung bei 94°C wurden 28 bis 39 Zyklen von 20 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Annealing bei 45–68°C und 30 s bis 4 min Polymerisation bei 72°C durchlaufen. Anschließend wurde die Polymerisation 5 min bei 72°C fortgesetzt und danach wurden die Ansätze auf 4°C gekühlt. 10  $\mu$ l des PCR-Reaktionsansatzes wurde in einem 0,8–2%igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Das gereinigte PCR-Fragment wurde in den entsprechenden Vektor kloniert.

Für die Amplifizierung jener PCR-Fragmente, die in den Hefeexpressionvektor pYES2.1/V5-His-TOPO, den Expressionsvektor pEF6/V5-His TOPO und den binären Vektor pBIB-PFF19 kloniert wurden, fand die DNA Polymerase HOTGoldstar (Eurogentec) Verwendung. Der Vorteil bestand vor allem in der höheren Effizienz der PCR-Reaktionen, denn bei Verwendung anderer Taq-Polymerasen mit *Proofreading*-Funktion, wie der *Pfu*-Polymerase, erschweren geringe Ausbeuten die Klonierung der PCR-Fragmente. In diesen Experimenten erfolgte in einem ersten Schritt die Aktivierung des Enzyms bei 95°C für 10 min.

### 2.4.3 RT-PCR

Die RT-PCR-Experimente zur Expressionsanalyse wurden unter Verwendung von „Ready-to-go™ You-prime First-Strand Beads“ (Amersham Pharmacia Biotech) den Angaben des Herstellers folgend, durchgeführt. 2  $\mu$ g Gesamt-RNA (vgl. 2.3.12.1) wurde für 10 min bei 65°C inkubiert und anschließend 2 min bei 4°C gekühlt. Als Primer für die reverse Transkriptionsreaktion wurden 0,2  $\mu$ g Hexamer-Primer pd(N)<sub>6</sub> (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Volumen von 33  $\mu$ l bei 37°C für 60 min. 2  $\mu$ l des RT-Ansatzes wurden als *template* in einer PCR-Reaktion eingesetzt (vgl. 2.3.2).

#### 2.4.4 5'RACE

Für die 5'RACE wurde der „Marathon™ cDNA Amplifikation Kit“ von der Firma Stratagene verwendet. Als Template für die Erststrangsynthese wurde ein Gemisch aus Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von elicierten und unbehandelten Petersiliezellen verwendet. Im Anschluß erfolgte die Synthese der Zweitstrang-cDNA und die Ligation einer Adapter-Sequenz. Für die darauffolgende PCR wurden der *rboh2*-genspezifische Antisense-Primer Race2as und ein an die Adapter- Sequenz bindender Primer benutzt. Das amplifizierte, mit einer *rboh2*-Sonde hybridisierende Fragment wurde kloniert und sequenziert.

#### 2.4.5 Klonierung von PCR-Produkten

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

#### 2.4.6 Reinigung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde unter Verwendung von QIAprep™-Säulen der Firma Qiagen nach Herstellerprotokollen aus Bakterien-Übernachtskulturen aufgereinigt.

#### 2.4.7 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

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

#### 2.4.8 Markierung von DNA-Fragmenten

##### 2.4.8.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden unter Verwendung des „Megaprime DNA-labelling Kit“ (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) mit [<sup>32</sup>P]-dATP nach der „random prime“-Methode hergestellt. Nicht inkorporierte Radioaktivität wurde durch „Probe QuantTMG-50“-Säulen (Amersham Pharmacia) entfernt.

##### 2.4.8.2 Markierung von DNA-Fragmenten mit Digoxigenin

Die Markierung der DIG-Sonden erfolgte unter Verwendung von genspezifischen Primern und des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ (Boehringer Ingelheim) nach den Angaben des Herstellers.

#### 2.4.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit einem automatischen „DNA-Sequencer“ (LICOR 4000L bzw. LONGREADER 4200, MWG-Biotech). Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem „SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing kit“ (Epicentre Technologies; bezogen über BIOzym Diagnostik GmbH, Oldendorf) oder dem „ThermiSequase

fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ (Amersham-Pharmacia Biotech) durchgeführt. Für die Detektion der DNA-Fragmente besaßen die verwendeten Primer 5'-Fluoreszenzmarkierungen (‘‘IRD800’’ bzw. ‘‘IRD700’’, MWG-Biotech). Außerdem wurde der Sequenzierservice der Firma MWG-Biotech genutzt.

#### 2.4.10 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten

Sequenzdaten wurden mit dem Programm ‘‘DNASIS 2.1’’ (Hitachi, Tokyo, Japan) analysiert. Sequenzvergleiche mit Datenbanken wurden mit Hilfe von Programmen durchgeführt, die den BLAST-Algorithmus verwenden (Altschul *et al.*, 1990; Altschul *et al.*, 1997). Dazu wurde der vom ‘‘National Centre for Biotechnological Information’’ ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und von der ‘‘Stanford Arabidopsis Database’’ (<http://genome-www.stanford.edu>) angebotene Service genutzt.

Weitere Datenbanken und Adressen:

DGPI:<http://members.nbci.com/jkronegg/unige/GPI-anchor/index.html>

Big-PI Prediktor:[http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/gpi\\_server.html](http://mendel.imp.univie.ac.at/gpi/gpi_server.html)

PSORT:<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>

<http://genome-www.stanford.edu/Arabidopsis/splice-site.html>

TM-pred:[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

#### 2.4.11 Southernblots mit genomischer DNA

Genomische DNA wurde nach der Methode von Dellaporte *et al.* (1983) aus Petersiliezellen isoliert und nach Restriktionsverdau in einem 0,7%igen Agarosegel (20µg/Spur) aufgetrennt. Das Gel wurde 15 min in 0,25 M HCl, 30 min in Denaturierungslösung und 2mal 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Anschließend wurde die DNA unter Verwendung nach der Kapillar-Transfer-Methode (Sambrook *et al.*, 1989) auf eine Hybond-N-Membran (Amersham-Pharmacia Biotech) überführt und durch ‘‘UV-Crosslinking’’ (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Nach einstündiger Prähybridisierung mit ‘‘DIG Easy Hyb’’-Lösung (Boehringer) bei 42°C wurde die Membran in Hybridisierungslösung, die zusätzlich zur Prähybridisierungslösung eine Hitze-denaturierte DNA-Sonde enthielt, überführt und 16 h bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 2mal mit Waschlösung 1 (2xSSC, 0,1% SDS) (15 min, 42°C) und 2mal mit Waschlösung 2 (0,5xSSC, 0,1% SDS; 15 min; 68°C) gewaschen und schließlich mittels Chemilumineszenz analysiert.

#### 2.4.12 Screening einer Petersilie-λ-ZAP<sup>TM</sup>II-cDNA-Bank

Für das Screening wurde eine gerichtete cDNA-Bank benutzt, die unter Verwendung des λ-ZAP<sup>TM</sup>II-Vectors und Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von elicitorbehandelten Petersiliezellen hergestellt worden war (W. Wirtz, 1993). Entsprechend einem Standardprotokoll wurden die Phagen mit 0,6 ml Übernachtskultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue MRF' ausplattiert und nach 16stündiger Inkubation der Platten bei 37°C auf Nylonfilter (Porablot NYamp, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Nach Denaturierung der DNA mit Denaturierungslösung wurden die Filter mit Neutralisierungslösung neutralisiert, mit 2xSSC gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde durch ‘‘UV-Crosslinking’’ (Stratalinker, Stratagene) immobilisiert. Daraufhin

wurden die Filter 1 h bei 42°C mit "DIG Easy Hyb" (Boehringer) behandelt und für 16 h bei 42°C mit Hybridisierungslösung geschüttelt, die eine denaturierte, DIG-markierte DNA-Sonde enthielt. Anschließend wurden die Filter 2mal mit Waschlösung A (2xSSC, 0,1% SDS; 5 min, RT) und 2mal mit Waschlösung B 15 min bei 58°C (2xSSC, 0,1% SDS) gewaschen und mittels Chemilumineszenz oder kolorimetrischer Detektion analysiert. Phagen im Bereich eines positiven Signals wurden in ein Gemisch aus 500 µl SM-Puffer und 20 µl Chloroform überführt. Nach einer dritten Screening-Runde wurde das in den rekombinanten Phagen enthaltene pBluescript-SK-Plasmid durch *In-Vivo*-Excision ausgeschnitten. Dazu wurden je 250 µl Phageneluat (ca. 10<sup>5</sup> pfu) mit 200 µl einer frischen XL1-Blue MRF'-Übernachtskultur und 1 µl des Helferphagen ExAssist (1x10<sup>6</sup> pfu) für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Medium zugesetzt und für weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Durch 15-minütiges Erhitzen auf 70 °C wurden nicht-lysierte Bakterien und Phagen abgetötet und durch nachfolgende Zentrifugation (5000 rpm, 15 min, RT) präzipitiert. 10 und 100µl des Überstandes wurden mit 200 µl einer frischen *E. coli* XL0LR-Übernachtskultur für 15 min bei 37°C präinkubiert und anschließend auf LB-Platten (mit Selektionsmarker) ausplattiert.

## 2.4.13 RNA-Isolierung

### 2.4.13.1 Präparation von Gesamt-RNA

Zur Präparation von Gesamt-RNA aus Petersiliezellen oder Pflanzenteilen wurden 0,1 g des Zellmaterials in einem vorgekühltem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemörsert und sofort mit 1 ml Trizol-Reagenz versetzt (Gibco). Die Suspension wurde für 1 min intensiv durchmischt (Vortex), 5 min bei RT inkubiert und anschließend nochmals durchmischt (Vortex). Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform wurde das Reaktionsgefäß für 20 s stark geschüttelt (Vortex) und nach 5 min Inkubation bei RT erfolgte ein Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 15 min, 4°C). Die obere, wässrige Phase (ca. 0,55 ml) wurde vorsichtig abgenommen und die RNA mit einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Nach anschließender Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min, 4°C) wurde das erhaltene Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, für 5–10 min an der Luft getrocknet und dann in 40 µl DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

### 2.4.13.2 Präparation von Poly (A)<sup>+</sup>-RNA

Um Poly(A)<sup>+</sup>-RNA anzureichern, wurden je 600µg Gesamt-RNA durch Affinitätschromatographie über Oligo(dT)-Cellulosesäulen (Amersham Pharmacia Biotech) gereinigt. Hierbei wurden die Puffer entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet.

## 2.4.14 Northern-Blot-Analysen

Zur elektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden denaturierende Agarosegele verwendet. Die Agarose (1%) wurde im Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Na-Acetat, 1mM EDTA, pH 7,0) geschmolzen und nach dem Abkühlen auf 50°C mit Formaldehyd (2% Endkonzentration) gemischt. 10-20 µg der RNA-Proben wurden in 20µl RNA-Probenpuffer (50% Formamid, 6% Formaldehyd, 6% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 1xMOPS) 10 min bei 65°C erhitzt, 2 min auf Eis abgekühlt, mit 0,8% Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) versetzt

und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit MOPS-Laufpuffer bei 60 Volt für 2-4 Stunden durchgeführt. Nach der gelektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA auf Nylon-Membranen (Amersham Pharmacia Biotech, Boehringer-Mannheim) überführt und durch „UV-Crosslinking“ kovalent an die Membran gebunden.

Die RNA-Hybridisierungsexperimente wurden wie unter 2.3.10 beschrieben durchgeführt.

#### **2.4.15 Bakterielle Expression von RBOH1.1 und RBOH2.1**

Zur bakteriellen Expression von RBOH1.1 und RBOH2.1 wurden Vektoren der pGEX-Serie der Firma Pharmacia gewählt, die stromaufwärts des Polylinkers die Sequenz der Glutathion-S-Transferase (GST) besitzen. Die offenen Leserahmen von RBOH1.1 und RBOH2.1 wurden zur Einführung geeigneter Schnittstellen mittels PCR amplifiziert (Anhang 1) und in den pGEM-T-Vektor subkloniert. Aus Einzelkolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Inserts mit korrekter DNA-Sequenz wurden in den Vektor pGEX-5X-2 kloniert. Positive Kolonien wurden durch Koloniehybridisierung identifiziert und zur Gewinnung von Plasmid-DNA genutzt, die in der Folge durch Restriktionsanalyse untersucht wurde. Mit den so erhaltenen Plasmiden wurden *E. coli* BL21-Zellen transformiert. Zur Proteinexpression wurden Übernachtskulturen der Bakterien 200fach in frischem LB-Medium verdünnt und unter starkem Schütteln (200 rpm) bei 30°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5-1 vermehrt. Zur Induktion der Proteinsynthese wurde 100 µM IPTG zugegeben und anschließend weitere 2 h bei 30°C und starkem Schütteln inkubiert. Daraufhin wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4°C, 5000 rpm) und durch Resuspendieren in B-PER™-Reagenz (Pierce, Rockford USA) und anschließender Inkubation für 15 min bei RT aufgeschlossen. Die Reinigung der *inclusion bodies* erfolgte nach einem Protokoll des Herstellers (Pierce).

## **2.5. Proteinanalytische Methoden**

### **2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Konzentration von Proteinproben wurde in einem Volumen von 100 µl nach der Methode von Bradford (1976) mit einem Fertigreagenz (Bio-Rad, München) bestimmt. In Proben, die Detergens enthielten, wurde die Proteinkonzentration unter Verwendung des BCA-Reagens (Pierce) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Als Standardsubstanz für die Erstellung von Kalibrierungsgeraden diente Rinderserumalbumin (Pierce).

### **2.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

In Minigelapparaturen „Mighty Small“ der Firma Hoefer (San Francisco, USA) wurden 10- bis 15%ige Polyacrylamidgele benutzt, die nach dem Protokoll von Laemmli (1970) hergestellt wurden. Die verwendeten Proteinextrakte wurden mit einem Volumen 2xProbenpuffer (200 mM Tris/HCl pH 6,8, 8% Glycerin, 8% SDS, 0,02% Bromphenolblau) versetzt und 3 min auf 95°C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine bei

40 mA wurden die Gele mit "Coomassie Blue G-250"-Lösung gefärbt, für Westernblots verwendet oder autoradiographisch untersucht.

### 2.5.3 Western-Blot-Analyse

Nach SDS-PAGE wurden Proteine durch "Semi-Dry"-Transfer mit einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen) auf Nitrocellulosemembranen (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Der Transfer erfolgte unter Verwendung von Transferpuffer (Tab. 4) bei einer Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membran über 2 h. Nach Trocknen der Membran wurden die Proteine durch Inkubation in "Fast Green"-Lösung (Pierce) und anschließendes Spülen in Wasser gefärbt. Nach Entfärben in 0,2 M NaOH wurde die Membran 14 h bei 4°C in "Blocking"-Puffer (Tab. 4) geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 2 h bei RT mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in "Blocking"-Puffer inkubiert. Daraufhin wurde die Membran 5mal 20 min mit TBST-Puffer (Tab. 4) gewaschen und eine Stunde mit Peroxidase-gekoppeltem sekundärem Antikörper (Sigma) (5000fach verdünnt in "Blocking"-Puffer) inkubiert. Im Anschluß daran wurde 4mal 20 min mit TBST-Puffer und einmal 10 min mit TBS-Puffer (Tab. 4) gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL<sup>+</sup>-System von Amersham entsprechend den Herstellerangaben.

**Tabelle 4: Puffer für Western-Blots**

Transferpuffer:	48 mM Tris, pH 39 mM Glycin 0,037% SDS 20% Methanol
TBS-Puffer:	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl
TBST-Puffer:	TBS-Puffer mit 0,05% Tween 20
„Blocking“-Puffer:	TBST-Puffer mit 5% fettfreier Trockenmilch (BioRad, München)

## 2.6 Hefe-Methoden

Alle nicht aufgeführten Methoden und Lösungen wurden wie in Ausübel *et al.* (1994) oder Guthrie und Fink (1991) beschrieben, ausgeführt bzw. hergestellt.

### 2.6.1 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

#### 2.6.1.1 Hefestämme und Plasmide

Für die Arbeiten mit dem Hefe-Zwei-Hybrid-System wurden der Hefestamm PJ69-4A (Tab. 5) und die aufgelisteten Plasmidvektoren (Tab. 6) verwendet.

**Tabelle 5: Eigenschaften des Hefestamms PJ69-4A**

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

**Tabelle 6: Für das Hefe-Zwei-Hybrid-System verwendete Plasmidvektoren**

Plasmid <sup>1</sup>	Marker <sup>2</sup>	Insert	Vektor
pBD-HA51	TRP1, Cam <sup>r</sup>	RBOH2 aus Petersilie (aa 1-66) + HA-Epitop	pBD-Gal4cam
pBD-HA52	TRP1, Cam <sup>r</sup>	RBOH2 aus Petersilie (aa 473-657) + HA-Epitop	pBD-Gal4cam
pBD-HA42	TRP1, Cam <sup>r</sup>	RBOH1 aus Petersilie (aa 720-885) + HA-Epitop	pBD-Gal4cam
p53	TRP1, Amp <sup>r</sup>	p53 aus Maus	pBD-Gal4
pLaminC	TRP1, Amp <sup>r</sup>	humanes LaminC (aa 67-230)	pBD-Gal4
PSV40	LEU2, Amp <sup>r</sup>	SV40 großes T-Antigen	pAD-Gal4

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

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

### 2.6.1.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen

Hefen wurden nach Standardvorschriften auf Platten oder in Flüssigkultur bei 30°C angezogen (Guthrie und Fink, 1991). Um Hefen unter selektierenden Bedingungen anzuziehen, wurden synthetische SD-Minimalmedien (Tab. 7) verwendet, ansonsten wurden die Hefen in YPAD-Medium (Tab. 7) vermehrt. Selektive SD-Medien für die Erhaltung von Plasmiden oder den Nachweis von Interaktionen der Hybridproteine wurden durch Weglassen der entsprechenden Aminosäuren (Tryptophan, Leucin oder Histidin) bzw. Adenin aus der "Dropout"-Mischung hergestellt und nach Sterilisation bei 4°C gelagert.

**Tabelle 7: Hefemedien**

YPAD-Medium: (pH 5,7)	2% Pepton 1% Hefeextrakt 2% Glucose 40 mg/l Adeninsulphat
SD-Medium: (pH 5,7)	2% Glucose 0,5% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,17% "Yeast Nitrogen Base" 0,15% entsprechende "dropout"-Mischung

“dropout“-Mischung: 40 mg/l Adeninsulphat  
20 mg/l L-Arginin-HCl  
100 mg/l L-Asparginsäure  
100 mg/l L-Glutaminsäure  
20 mg/l L-Histidin-HCl<sup>a</sup>  
30 mg/l L-Isoleucin  
60 mg/l L-Leucin<sup>b</sup>  
30 mg/l L-Lysin-HCl  
20 mg/l L-Methionin  
50 mg/l L-Phenylalanin  
375 mg/l L-Serin  
200 mg/l L-Threonin  
40 mg/l L-Tryptophan<sup>c</sup>  
30 mg/l L-Tyrosin  
20 mg/l Uracil  
150 mg/l L-Valin

<sup>a</sup>Adeninsulphat oder L-Histidin-HCl wurde weggelassen, um auf Interaktion der Hybridproteine zu selektieren.

<sup>b</sup>L-Leucin wurde weggelassen, um auf pAD-Vektoren und den Kontrollvektor pSV40 zu selektieren.

<sup>c</sup>L-Tryptophan wurde weggelassen, um auf pBD-Vektoren und die Kontrollvektoren p53 und pLaminC zu selektieren.

### 2.6.1.3 Herstellung der Plasmide pBD-HA51, pBD-HA52 und pBD-HA42

Das HA-Epitop wurde als *SalI/PstI* Fragment in den Vektor pBD-GAL4cam eingeführt (Kroj, 1999) und das entstandene Plasmid als pBD-HA bezeichnet. Die entsprechenden Sequenzen von *rboh1* und *rboh2* wurden durch PCR amplifiziert (Anhang 1), in pGEM-T subkloniert und anschließend als *EcoRI/SalI*-Fragment in pBD-HA kloniert. Die entstandenen Plasmide pBD-HA51, pBD-HA52 und pBD-HA42 wurden durch Sequenzierung überprüft.

### 2.6.1.4 Hefetransformation

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



15000 rpm), in 1 ml Wasser resuspendiert und auf dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert (2-200 µl). Mit dieser Methode konnten Hefen auch mit 2 Plasmiden gleichzeitig transformiert werden.

#### 2.6.1.5 Screening mit pBD-HA51, pBD-HA52 und pBD-HA42

Für das Screening wurden Hefen, die bereits eines der pBD-HA-Plasmide enthielten, nach einem leicht abgeänderten Protokoll transformiert. Die Zellen aus 50 ml Kultur, die wie oben behandelt worden waren, wurden in einem 15 ml Röhrchen (Falcon) mit der 10fachen Menge der oben angegebenen Lösungen und 5 µg Plasmid transformiert. Der Hitzeschock wurde auf 40 min ausgedehnt und die transformierten Zellen am Ende in 10 ml Wasser aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf eine Platte (Durchmesser 13,5 cm) mit SD-His-Medium (-His; -Leu; -Trp) ausplattiert und 3-7 Tage bei 30°C inkubiert. Kolonien, die in dieser Zeit wuchsen, wurden auf SD-His- und SD-Ade- (-Ade; -Leu; -Trp) ausplattiert. Aus Kolonien, die auf den beiden Selektionsmedien wuchsen, wurde Plasmid-DNA isoliert, die zur Vermehrung in *E. coli*-DH5α transformiert wurde. Diese Plasmide wurden in PJ69-4A-Hefen retransformiert, die bereits das entsprechende pBD-HA-, das pLamin C- (Bartel *et al.*, 1993b) oder das p53-Plasmid (Iwabuchi *et al.*, 1993) enthielten. Die Transformanten wurden mit Hilfe des SD-His- und SD-Ade- Mediums auf Reportergenexpression untersucht. Lediglich diejenigen cDNA-Klone wurden als positiv betrachtet, die in dieser Selektionsrunde in Kombination mit pBD-HA51 bzw. pBD-HA42 Reportergenexpression induzierten, nicht aber in Kombination mit p53 oder pLamin C.

#### 2.6.1.6 Plasmidpräparation aus Hefe

SD-Flüssigmedium (3 ml) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und 2 Tage bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (30 s; 15000 rpm), in 0,2 ml Hefe-Lysispuffer (10 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 1% SDS) resuspendiert und mit 0,2 ml Phenol/Chloroform/Iso-amylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) und 0,3 g Glaskugeln (0,5 mm Durchmesser; Sigma) versetzt. Daraufhin wurde die Suspension 2 min geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 15000 rpm). Der Überstand wurde abgenommen, mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen Ethanol vermischt und zentrifugiert (10 min, 15000 rpm). Der entstandene Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, nach erneuter Zentrifugation in 50 µl TE-Puffer (2.2.5) aufgenommen und für die Transformation kompetenter *E. coli*-DH5• verwendet.

#### 2.6.1.7 Proteinextraktion aus Hefe

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

## 2.6.2 Heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

### 2.6.2.1 Hefetransformation

Die Transformation der Hefen erfolgte unter Verwendung des S.c. Easy Comp™ Transformation Kit (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers.

### 2.6.2.2 Induktion der Proteinbiosynthese

In Minimalmedium mit 2% (w/v) Glucose gewachsene Hefe-Übernachtskultur wurde durch Zentrifugation geerntet, mit 10 ml sterilem Wasser gewaschen und in 200 ml Minimalmedium auf eine  $OD_{600} = 0,1$  ( $2 \times 10^6$  Hefezellen) eingestellt. Das Minimalmedium enthielt zur Induktion der Proteinbiosynthese 2% (w/v) Galactose und 1% (w/v) Raffinose. Das Minimalmedium, indem zur Kontrolle die Synthese des rekombinanten Proteins reprimiert wird, enthielt 2% (w/v) Glucose als Kohlenstoffquelle. Die 20%igen Zucker-Stammlösungen wurden durch Sterilfiltration hergestellt. Nach etwa 14 Stunden wurden die Hefezellkulturen bei einer  $OD_{600} = 0,8-1,0$  geerntet und die mikrosomalen Fraktionen wurden isoliert.

### 2.6.2.3 Analyse der heterologen Proteinexpression

2ml der zu untersuchenden Hefezellkulturen wurden durch Zentrifugation geerntet und das Pellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Durch Zugabe von 100µl Lysispuffer Y-Per (Pierce) und leichtem Schütteln für 20 min bei RT wurden die Zellen aufgeschlossen. Durch nachfolgende Zentrifugation (12.000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde die Zellwandtrümmer pelletiert und 10µl (20 µg) des erhaltenen Proteinextraktes in Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Anti-V5-Antiserums (Invitrogen) nach Vorschriften des Herstellers untersucht.

### 2.6.2.4 Mikrosomenpräparation (*Saccharomyces cerevisiae*)

Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) geerntet. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit sterilem Wasser gewaschen und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Die Hefezellen wurden durch Mösern mit Seesand (mit HCl gewaschen) und Zugabe einer möglichst minimalen Menge an Extraktionspuffer (1,6 ml) aufgeschlossen. Der Seesand wurde in einem vorgekühlten Falcon-Tube sedimentiert. Anschließend wurde der Überstand in ein vorgekühltes 2ml-Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (15.000 rpm, 10 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und durch Ultrazentrifugation (60 min, 40.000 rpm,  $4^{\circ}\text{C}$ ) wurde die mikrosomale Fraktion pelletiert. Das Pellet wurde in Resuspensionspuffer resuspendiert.

#### Extraktionspuffer I (ohne $\text{Ca}^{2+}$ )

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

1mM DTT

10 mM EDTA

Protease-Inhibitor-Mix (SIGMA) 100µl/10ml<sup>-1</sup> Extraktionspuffer I

Resuspensionspuffer I (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ ): 0,34 M Saccharose  
10 mM Tris-HCl, pH 8.0

Extraktionspuffer II (+ $\text{Ca}^{2+}$ ):  
50 mM Tris-HCl, pH 8,0  
1mM DTT  
2 mM EDTA  
5 mM  $\text{CaCl}_2$   
Protesase-Inhibitor-Mix (SIGMA) 100 $\mu\text{l}$ /10ml<sup>-1</sup> Extraktionspuffer II

Resuspensionspuffer II (+  $\text{Ca}^{2+}$ ): 0,34 M Saccharose  
10 mM Tris-HCl, pH 8.0  
1 mM  $\text{CaCl}_2$

## 2.7 Heterologe Expression in NIH-3T3 Zellen

### 2.7.1 Transfektion der NIH-3T3 Zellen

Die NIH-3T3 Zellen wurden nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (Loyter *et al.*, 1982). Als Transfektionsreagenz wurde das *ProFection Mammalian Transfection System* (Promega; Madison) verwendet. Die Vorbereitung der Zellen, die Präparation der DNA, die Durchführung der Transfektionsprozedur und die Erhaltung der transgenen, stabilen Mischkulturen erfolgte nach Protokollen des Herstellers (*Transfection Guide*, Promega). Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurden NIH-3T3 Zellen mit einem GFP-kodierenden Plasmid transfiziert.

### 2.7.2 Proteinextraktion aus NIH-3T3 Zellen und Analyse der heterologen Proteinexpression

Die Zellen wurden nach Entfernen des Medium zweimal mit 10 ml PBS-Puffer (Gibco) gewaschen. Anschließend wurden sie durch Abschaben geerntet und in 200 $\mu\text{l}$  PBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und SDS (2% Endkonzentration) und PMSF (0,5 mM Endkonzentration) wurden dazugegeben. Nach starkem Durchmischen wurde die Suspension sofort für 5 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die erhaltenen Proteinextraktes in Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Anti-V5-Antiserums (Invitrogen) nach Vorschriften des Herstellers untersucht.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Klonierung und Charakterisierung von zwei cDNA-Klonen mit Homologien zur katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, *gp91<sup>phox</sup>*

##### 3.1.1 Screening einer Petersilie-cDNA Bank mit einer heterologen Sonde aus Reis

Die Methode der Wahl zur Isolierung von *gp91*-Homologen aus Petersilie war das Screenen einer cDNA-Bank unter Verwendung einer heterologen Sonde. Durch Sequenzvergleiche von GP91<sup>phox</sup> mit Pflanzen-EST-Datenbanken wurde ein EST (*Oryza sativa*, Acc.-Nr.:D39082) gefunden, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz über einen Bereich von 40 Aminosäuren 54% Identität zu GP91<sup>phox</sup> aufwies. Die Eignung des 1,2 kb großen Fragmentes als Sonde wurde durch Southern-Blot-Analysen getestet. Genomische Petersilie-DNA wurde unter verschiedenen Stringenzbedingungen mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, dabei schien die Anwendung wenig stringenter Bedingungen (Hybridisierungstemperatur 60°C; Waschbedingungen: 2xSSC, 0.1 %SDS, 58°C) günstig, da definierte Banden sichtbar wurden (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung der heterologen Sonde wurde eine  $\lambda$ ZAP<sup>TM</sup>II-Petersilie-cDNA Bank durchsucht. Es wurden  $1,8 \times 10^6$  Phagen analysiert und nach drei Plattierungsrunden wurden fünf mit der Sonde hybridisierende Phagen isoliert. Nach *In-Vivo*-Excision konnten die Plasmide pRBOH1-5 (RBOH, *respiratory burst oxidase homolog*) erhalten werden. Diese Plasmide wurden mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung der Inserts vom 3'- und 5'-Ende untersucht und ließen sich in zwei Klassen einteilen. Die Plasmide pRBOH3-5 waren untereinander identisch und wiesen 100% Homologie zum C-Terminus des Plasmides pRBOH2 auf. Das Plasmid pRBOH2 enthielt ein 2,8 kb langes Insert mit einem offenen Leserahmen von 1974 bp (vgl. Tab. 8). Der 3'-nichttranslatierte Bereich war 612 bp lang, das 5'-nichttranslatierte Ende 240 bp. Das Plasmid pRBOH1 enthält einen offenen Leserahmen von 2655 bp, da kein Startkodon enthalten war, kodierte dieser nicht für den N-Terminus des Proteins RBOH1 (vgl. Tab. 8). Die Inserts der Plasmide pRBOH1 und pRBOH2 wurden vollständig bidirektional sequenziert (vgl. Anhang 2 und 3).

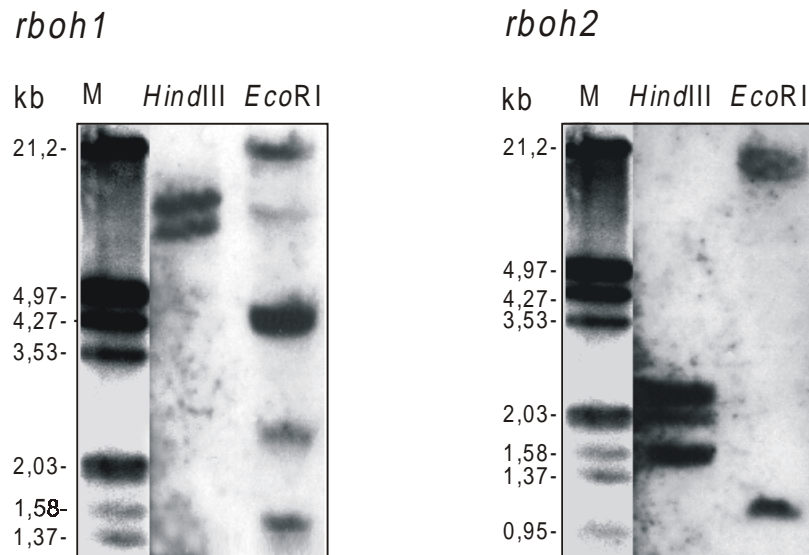
**Tabelle 8: Charakterisierung der analysierten cDNA-Klone**

Bezeichnung des Plasmids	Länge der cDNA	abgeleitete Aminosäuresequenz
pRBOH1	2923 bp	ORF RBOH1: 885 Aminosäuren, N-Terminus unvollständig
pRBOH2	2826 bp	ORF RBOH2: 657 Aminosäuren

### 3.1.2 Southern Blot-Analyse

Um die Organisation der *rboh*-Gene im Petersiliegenom zu charakterisieren, wurden Southern-Blot-Analysen durchgeführt. Für *rboh1* wurden in der Spur, in der mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaute genomische DNA aufgetragen wurde, zwei stark hybridisierende Banden und zwei schwächer hybridisierende Banden detektiert. Die *rboh1*-cDNA-Sequenz enthielt eine *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle. In jener Spur, in der mit *HindIII* verdaute genomische DNA aufgetragen worden war, wurden zwei Banden detektiert (Abb. 3). Während der später durchgeführten Analyse von genomischen Klonen (vgl. 3.1.3.2) wurde zusätzlich eine *HindIII*-Schnittstelle gefunden, somit ist für *rboh1* nur eine Kopie vorhanden. Eine analoge Schlußfolgerung konnte für *rboh2* gezogen werden, da bei der Charakterisierung eines genomischen Klonen ein 1,1 kb *EcoRI*-Fragment identifiziert wurde (vgl. 3.1.3.2). Weiterhin enthielt die *rboh2*-cDNA-Sequenz eine *HindIII*-Schnittstelle, während in der Spur, in der mit dem Restriktionsenzym *HindIII* verdaute DNA aufgetragen wurde, zwei stark hybridisierende Banden gefunden wurden.

Das Vorhandensein weiterer Gene, die für GP91<sup>phox</sup>-homologe Proteine kodieren, läßt sich jedoch nicht ausschließen. So wurden in *Arabidopsis thaliana* zehn genomische Sequenzen identifiziert, die der Genfamilie von pflanzlichen *gp91*<sup>phox</sup>-Homologen zugeordnet werden (Torres *et al.*, 1998).



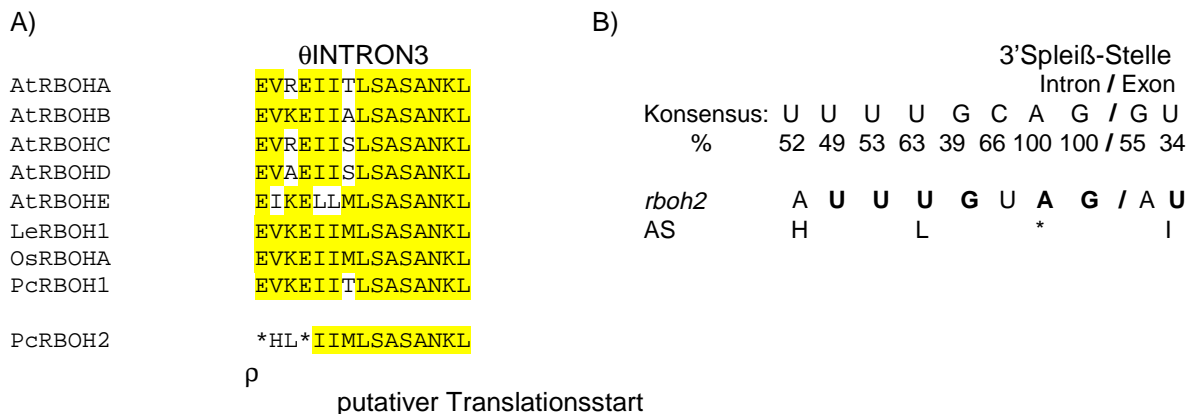
**Abb.3: Southernblot-Analyse mit A) *rboh1*-, und B) *rboh2*-Sonden.**

20 µg genomischer DNA wurden mit den Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf Nylonmembran mit *rboh1*- oder *rboh2*-Sonden hybridisiert. In der mit M bezeichneten Spur wurde DIG-Marker (Boehringer, Ingelheim) als Größenstandard aufgetragen.

### 3.1.3 Weitere Analyse der Nukleinsäuresequenzen

#### 3.1.3.1 5'RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Sowohl für *rboh1* als auch für *rboh2* war es von Interesse 5'RACE-Experimente durchzuführen. Da die isolierte *rboh1*-cDNA nicht für den N-Terminus von RBOH1 kodierte, sollte der Translationsstart gefunden werden. Die *rboh2*-cDNA enthielt einen offenen Leserahmen von 1974 bp und das abgeleitete Polypeptid mit einer Größe von 657 Aminosäuren unterscheidet sich so hinsichtlich der Größe von allen anderen bisher klonierten pflanzlichen *gp91<sup>phox</sup>*-Homologen, welche erhebliche N-terminale Extensionen aufweisen (Tab. 8). Homologievergleiche auf Aminosäure- und Nukleotidebene zeigen, daß die hohe Übereinstimmung der pflanzlichen GP91<sup>phox</sup>-Homologen im Bereich des RBOH2-Translationsstartpunktes [Abb.4 A)] an einem konservierten Exon/Intron-Übergang abbricht [Abb.4 B)]. Da das Phänomen des alternativen Splicing zunehmend auch in Pflanzen beobachtet wird (Mano *et al.*, 1999; Dinesh-Kumar und Baker, 2000), ergibt sich die Frage, ob es sich im Fall von RBOH2 um ein alternatives Spleißprodukt handelt. Mittels der 5'RACE-Methode sollte untersucht werden, ob in einer Petersilie-mRNA Population *rboh2*-homologe Transkripte vorhanden sind, die für Proteine kodieren, welche die für pflanzliche GP91<sup>phox</sup>-Homologe bekannten N-terminalen Extensionen aufweisen. Die erhaltene Sequenz stimmte mit der korrespondierenden Sequenz der *rboh2*-cDNA, einschließlich des 5'-nichttranslatierten Bereiches, überein.



**Abb. 4: N-Terminus von RBOH2 im Vergleich mit korrespondierenden Sequenzen von pflanzlichen GP91-Homologen (A) und entsprechende *rboh2*-Sequenz im Vergleich mit Konsensus-Sequenzen für Exon-Intron-Übergänge (B).**

A) Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen einiger pflanzlicher homologer Proteine mit dem N-Terminus von RBOH2 stellt den hohen Grad der Ähnlichkeit in diesem Bereich dar. Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Ein schwarzes Dreieck symbolisiert die Spleiß-Stellen für das Intron 3. Das weiße Dreieck zeigt den putativen Translationsstart an.

B) Die Konsensus-Sequenz sowie die prozentuale Häufigkeit des Auftretens der angegebenen Nukleotide wurde von Brown *et al.* (1986) entnommen. In dieser Arbeit wurden 998 Intron/Exon Übergänge von Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* analysiert. Die Nukleotide, die mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen, sind fett hervorgehoben.

In PCR-Experimenten wurde unter Verwendung eines *rboh1*-genspezifischen Primers Race1as und eines vektorspezifischen Primers aus einer Petersilie-cDNA-Bank ein PCR-Fragment isoliert. Obwohl sehr spezifische Primer mit einer Länge von 27 bp und einem hohen GC-Gehalt ausgewählt wurden, zeigte die Sequenzanalyse, daß ein falsch positives Fragment amplifiziert wurde. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wies signifikante Homologie zu 40S ribosomalem Protein aus Arabidopsis auf. RT-PCR- und 5'RACE-Versuche führten trotz Variierung verschiedener Komponenten (Primer, Taq-Polymerase) und PCR-Bedingungen (*touch down*-PCR, *nested*-PCR) nicht zum angestrebten Ziel. Ursache dafür ist vermutlich die geringe Abundanz des Transkriptes. Die Isolierung und Analyse von genomischen Klonen sollte deshalb die Ermittlung des putativen Translationsstartpunktes ermöglichen.

### 3.1.3.2 Analyse genomischer Klone

Eine genomische Bank ( Lambda FIX<sup>RII</sup> ) wurde freundlicherweise von Elke Logemann und Klaus Hahlbrock (MPI für Züchtungsforschung, Köln) zur Verfügung gestellt. Als Sonde wurde ein 450 bp langes Fragment des 5'-Endes von '*rboh1*' mit Digoxigenin markiert. Aus  $3 \times 10^5$  pfu wurden nach drei Reinigungsrunden vier mit der Probe hybridisierende Klone isoliert. Die Phagen-DNA wurde mittels Restriktionsanalyse untersucht. Aus drei identischen Lambda-Klonen wurde ein stark hybridisierendes 2,4 kb *NotI/HindIII*-Fragment isoliert, subkloniert und sequenziert. Nach Analyse der Sequenzdaten liegt der Translationsstartpunkt wahrscheinlich 18 bp stromaufwärts vom 5'-Ende der bekannten cDNA-Sequenz. Die angrenzenden Sequenzen des putativen *rboh1*-Translationskodons (AAAAAUGG) entsprechen der Konsensussequenz für die Translationsinitiation pflanzlicher mRNAs (AACAAUGG; Lütcke *et al.*, 1987). Eine putative TATA-Box-Sequenz (Bucher *et al.*, 1990) befindet sich 198 bp stromaufwärts zum Translationsstartkodon (<sub>795</sub>CTTATAAAGAT<sub>806</sub>). Etwa 25 bp stromabwärts dieser TATA-Box-Sequenz befindet sich der vermutliche Transkriptionsstart (vgl. Abb. 5) Dieses Ergebnis wurde durch ein RT-PCR Experiment bestätigt. Dafür wurden zwei verschiedene Sense-Primer (Abb. 5) verwendet. Während mit dem Primer g4dTS ein hybridisierendes Fragment der erwarteten Größe von 600 bp amplifiziert wurde, konnte mit dem Primer g4uTS kein entsprechendes Fragment detektiert werden (nicht gezeigt).

```

TTCATATTTTTCACCTGTCTTTTTTCTCTTTTGGTAGGGAGTTTACTTATTCATCTTGT      782
    g4uTS          ⇐ Transkriptionsstart
ATTGGGGGCTCACTTATAAAGATTTTTGGGTTTATAATCTCTTTGTCAACCCTCTTGATC      842
TTATACCTCATCTACACTTTCACTCTCTTAGCTTATATATCAAACCTGAACCCAACCTTTAC      902
    g4dTS
TTTAAGACTCCCTAGAAAACTAGGAAGCCAATAGTAAAGCCATTATTCATCAACATAAA      962
                                                ⇐Start der 'rboh1-cDNA
ATAGATCAAATTCAAGATCAGCTCAAAAAAATGGAGAATCAAGAGTCTCAAGTGAAAGAT      1022

```

**Abb. 5: Ausschnitt der genomischen Sequenz von *rboh1* im Bereich des vermutlichen Transkriptionsstartpunktes.** Die Primer-Sequenzen sind einfach unterstrichen, das putative Translationsstartkodon zweifach. Die mögliche TATA-Box-Sequenz sowie der Transkriptionsstart sind fett gedruckt hervorgehoben.

Genauere Informationen über die genomische Sequenz von *rboh2* sollten einen Hinweis geben, ob der gefundene offene Leserahmen von *rboh2* durch alternatives Splicing gebildet wurde. In diesem Fall sollten abgeleitete Polypeptide von Exon-Sequenzen, die stromaufwärts der *rboh2*-cDNA gefunden wurden, Ähnlichkeiten zu den bekannten pflanzlichen *gp91*-Homologen zeigen, z.B. sollte ein EF-Hand-Bindemotif vorhanden sein. Als Sonde wurde ein 420 bp langes Fragment des 5'-Endes von *rboh2* mit Digoxigenin markiert. Etwa  $5 \times 10^5$  pfu der genomischen Bank wurden durchsucht, dabei wurde ein Klon isoliert und charakterisiert. Ein 3,2 kb *Xba*I-Fragment, ein 1,1 kb *Eco*RI-Fragment und ein 1,8 kb *Xba*I/*Not*I Fragment dieses Klonen wurden subkloniert und teilweise sequenziert. Während das 3,2 kb Fragment und das 1,1 kb Fragment schon bekannte Bereiche der *rboh2*-cDNA überspannten, enthielt das 1,8 kb Fragment den gesuchten 5'-Bereich. Die Sequenzanalyse ergab, daß 2 Basen stromaufwärts vom 5'-Ende der *rboh2*-cDNA die abgeleitete Aminosäuresequenz der gesamten Basenfolge 62% Identität zu einem putativen Retrotransposon-Polypeptid (Acc.Nr.: AC002391) aus *Arabidopsis thaliana* aufwies (nicht gezeigt).

### 3.1.4 Analyse der erhaltenen Daten und Sequenzvergleiche

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen RBOH1 und RBOH2 weisen 57% Identität untereinander, sowie etwa 30% Identität zu GP91<sup>phox</sup> auf (Abb. 6). Homologe Regionen befinden sich vor allem in Bereichen der putativen Substrat- oder Kofaktorbindestellen. Einige für die katalytische Funktion des humanen Enzyms notwendige Aminosäuren, wie z.B. Histidinreste, die für die Bindung des Hämoglobins verantwortlich sind, sind ebenfalls konserviert (Finegold *et al.*, 1996). Bemerkenswert ist außerdem die Ähnlichkeit der Anordnung von putativen transmembranen Domänen, die aus Hydrophobizitätsanalysen abgeleitet werden. Zusammenfassend deuten die strukturellen Ähnlichkeiten zwischen RBOH1, RBOH2 und der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase, GP91<sup>phox</sup>, auf die Zuordnung in eine gemeinsame Multi-Enzymfamilie hin.

Die kalkulierten apparenten Molekulargewichte der unprozessierten RBOH-Proteine betragen 102,2 kDa für RBOH1 und 75,4 kDa für RBOH2. Die in GP91<sup>phox</sup> glycolysierten Aspartatreste D132, D149 und D240 (Wallach und Segal, 1997) sind in den RBOH-Proteinen nicht konserviert. Die Proteine weisen in definierten Bereichen stark hydrophoben Charakter auf. So werden durch das TMPred-Programm sechs transmembrane Domänen vorhergesagt (Abb. 6). Der siebente stark hydrophobe Bereich überspannt die putative NAD(P)H-Ribose-Bindestelle und könnte an der Membran assoziiert sein. Eine Analyse mit dem pSORTII-Programm bestimmt RBOH2 mit 43,5% Wahrscheinlichkeit als integrales Plasmamembranprotein. RBOH1 würde nach einer Analyse mit dem pSORTII-Programm mit 55% Wahrscheinlichkeit im Endoplasmatischen Retikulum oder ebenfalls in der Plasmamembran (44% Wahrscheinlichkeit) lokalisiert sein. Die putative Kalzium-Bindedomäne von RBOH1 wurde mit Hilfe des PROSITE-Programmes zugeordnet. Ein zweites EF-Hand Bindemotif, wie für andere pflanzliche Homologe postuliert (Keller *et al.*, 1998), konnte in RBOH1 nicht identifiziert werden. Ausgehend von der Topologie des



humanen Enzyms sind wahrscheinlich sowohl die N-Termini, als auch die C-Termini der RBOH-Proteine im Cytosol lokalisiert (Wallach und Segal, 1997).

HsGP91	-----	-----	-----	-----	-----	
PcRBOH2	-----	-----	--MLSASANK	LSRLKEQAE	YAALIMEELD	31
PcRBOH1	FFDMV	DKDAD	GRITQDEVKE	IITLSASANK	LTKIVECADE	277
HsGP91	-----	-----	-----	-----	-----	
PcRBOH2	PERLGYIELW	QLETLLLQKD	TYLNYSQALS	-YTSQALSQN	LAGLRKKSSI	77
PcRBOH1	PSNLGYVEMY	NVEMLLLRAP	HEAAFSGTES	RMLSNLISDK	LVPKDESLI	324
HsGP91	-MGNWAVNEG	L-SIFVILVW	LGLNVFLFW	YYRVYDIPPK	FFYTRKLLG-	47
PcRBOH2	QKISTKPVVY	LEENWKRLWV	LCFWILIMAG	LCTWKFFQYK	EKNAYKVMGY	127
PcRBOH1	KRGYRRIGYF	IHDNWKRLWI	LCLWLLICVG	LFTWKFHQYK	DRAVYHVMGY	374
HsGP91	SALALARAPA	ACLFNCMLIL	LPVCRNLLSF	LRGSSACCST	RVRRL--DR	95
PcRBOH2	CLLTAKGAAE	TLKFNMALIL	LPVCRNIITW	LRS-----T	KLGYVVPFDD	171
PcRBOH1	CVCVAKGAAE	TLKFNMALIL	LPVCRNTITW	LRSR-----T	RLGRIPFDD	419
HsGP91	NLTFHKMVAW	MIALHSAIHT	IAHLFNVEWC	VNARVNNS--	DPYSVALSEL	143
PcRBOH2	NINFHKTIAA	AIVIGVILHA	GNHLA---C	DFPRLINETD	DQYSNYLVND	217
PcRBOH1	NVNFHKVIAT	GIAIGVCLHV	IPHLT---C	DFPRLHSTD	EEYVP-MKRF	464
HsGP91	GDRQNESYLN	FARKRIKNPE	GGLYLAVTLL	AGITGVVITL	CLILIITSST	193
PcRBOH2	FGQYKPKYID	LVRG-----	-----V	EGVTGVIMVI	LMATAFVLAT	252
PcRBOH1	FGHQPSEYWW	FLRG-----	-----TEGW	TGIT--MLV	LMTIAFILAN	499
HsGP91	KTIRRSY---	-----F	EVFWYTHHLE	VIFFIGLAIH	G-----AERI	226
PcRBOH2	KWFRRSLVKL	PKPWDKLTGF	NAFYYSHHLE	VIVYVLLVIH	GLFLYLHKW	302
PcRBOH1	PWFRQNRQL	PKMIKRLTGY	NAFWYSHHLE	IIVYVLLIIH	GTFVYLSKEW	549
HsGP91	VRGQTAESLA	VHNITVCEQK	ISEWGIKEC	PIPQFAGNPP	MTWKWIVGPM	276
PcRBOH2	YY-----	-----	-----	-----K	TTWMYLAIPV	315
PcRBOH1	YH-----	-----	-----	-----K	TTWMYVAIPM	562
HsGP91	FLYLCERLVR	FWRSSQKVVE	ITKVVTHPFK	TIELQMKKKG	-FKMEVGQYI	325
PcRBOH2	LLYAGERTLR	FFRSGFSTVH	LLKVAIYPGN	VLALQMSKPP	QFRYRSGQYM	365
PcRBOH1	ILYGIERLVR	AFRSGHRTVE	ILKVAVYPGN	VMSLQFTKPR	KFKYTSQGYI	612
HsGP91	FVKCPKVS KL	EWHPFSLTSA	PEEDFFSIHI	RIVGDWTEGL	---FN-ACG--	370
PcRBOH2	FVQCPVVS PF	EWHPFSLTSA	PGDDYLSIHI	RQLGDWTQEL	KRVFSEACEP	415
PcRBOH1	FVNCSKVSPV	EWHPFSLTSA	PPDDLHLSHI	RTAGDWTSQL	KTVFSRACQP	662
HsGP91	-----	CDKQEFQDAW	KLPKIAVDGP	FGTASEDVFS	YEVVMLVGAG	410
PcRBOH2	PMGGKSGLLR	ADETTKKS--	-LPKLLIDGP	YGAPAQDYRK	YDVLLLVGLG	462
PcRBOH1	SGSDQSGLLR	ADITQQNQNI	RLPKLLIDGP	YGAPAQDYKE	YDILFISLG	712
HsGP91	IGVTPPFASIL	KSVWYKY---	-----	-----	-----	427
PcRBOH2	IGATPFISIL	KDLLNSTVKM	EEQAESSDA	SRYSDQSLGT	SDSGSLNRF	512
PcRBOH1	IGATPLISIV	KDVLVYHI---	KQKKDEESGM	IESGTKN---	-----	746
HsGP91	CNNATNLK LK	KIIFYWLCDR	THAFEFADL	LQLLESQMQE	RNNAGFLSYN	477
PcRBOH2	PKQRKPLKTT	NAYFYWV TRE	QGSFDWFKGV	MNEVSELDQR	GVIEMHN-YL	561
PcRBOH1	HKKKKPFNTT	NAYFYWV TRE	EGSFEWFKNV	MNEVAEKDTE	HVIELHN-YC	795
HsGP91	--IYLTGWDE	SQANH---FA	VHDEEKDVI	TGLKQKTLYG	RPNWDNEFKT	522
PcRBOH2	TSVYEEGDAR	SALITMVQAL	NHAKNGVDV	SGTRVTRTHFA	RPNWKKVFSR	611
PcRBOH1	TSVYEEGDAR	SALIAMLQSF	QHAKNGVDIV	SGTRVTRTHFA	RPNWRNEFKH	845
HsGP91	IASQHPNTRI	GVFLCGPEAL	AETLSKQSIS	NSESGPRGVH	FIFNKENF.	570
PcRBOH2	ICTKHANKRI	GVFYCGAPVL	AKELSNLCYD	--YNQKGATK	FEFHKEHF.	657
PcRBOH1	VAVKHPPDKRV	GVFYCGAAAF	IPELRHLSHD	--FSRKTTTK	FDPFKENF	891

**Abb. 6: Vergleich der abgeleiteten offenen Leserahmen der cDNA-Klone *rboh1* (unvollständig) und *rboh2* mit der katalytischen Untereinheit der humanen NADPH-Oxidase aus Phagozyten, GP91<sup>phox</sup>.**

Das Alignment wurde mit dem ClustalW-Programm erstellt. Die rot unterlegten Bereiche repräsentieren NAD(P)H- [II,III] und FAD-Bindestellen [I]. Identische Aminosäuren in mindestens zwei Sequenzen sind gelb unterlegt. Die an der Bildung der Bis-Häm-Struktur beteiligten Histidinreste sind fett hervorgehoben. Die grün markierte Sequenz zeigt ein putatives EF-Hand-Motif (Kretsinger, 1996) mit einer Kalzium-Bindedomäne an. Vorhergesagte stark hydrophobe Bereiche sind unterstrichen. Schwarze Dreiecke symbolisieren potentielle N-Glycosylierungstellen (Wallach und Segal, 1997), diese sind in den Petersilie-RBOH-Proteinen nicht konserviert.

Durch Datenbankabfragen mit Hilfe des Blastp-Algorithmus konnten etwa 100 ähnliche Proteinsequenzen ermittelt werden. Es wurden putative NADPH-Oxidasen aus Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, *Lycopersicon esculentum*, *Oryza sativa*), Mensch und anderen Säugern, dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* und Fe-Reduktasen aus *Arabidopsis* und aus den Hefen *Schizosaccharomyces pombe* und *Saccharomyces cerevisiae* gefunden (Torres *et al.*, 1998; Keller *et al.*, 1998; Amicucci *et al.*, 1999; Royer-Pokorka *et al.*, 1986; Suh *et al.*, 1999; Geiszt *et al.*, 2000; De Deken *et al.*, 2000; Robinson *et al.*, 1999; Roman *et al.*, 1993; Dancis *et al.*, 1992). In Tabelle 9 sind einige der am meisten verwandten Proteine von RBOH1 und RBOH2 aufgelistet. In der linken Spalte ist neben der Bezeichnung der Proteine auch die Größe der offenen Leserahmen angegeben. Die Größe der Proteine dieser Enzymfamilie variiert zwischen 564 Aminosäuren und 1551 Aminosäuren. Sowohl in Pflanzen, als auch in Säugern weisen einige GP91<sup>phox</sup>-Homologe erhebliche N-terminale Extensionen auf, die ein oder zwei EF-Hand-Motife enthalten.

**Tabelle 9: Verwandschaft von RBOH1 und RBOH2 zu bekannten pflanzlichen Proteinen und humanen NADPH-Oxidasen.** Die verwendeten Bezeichnungen werden folgenden Organismen zugeordnet: LeRBOH: *Lycopersicon esculentum*, AtRBOH: *Arabidopsis thaliana*, OsRBOH: *Oryza sativa*, ThOX2, GP91<sup>phox</sup>, MOX 1: *Homo sapiens*.

		RBOH1 (891 AS)		RBOH2 (657 AS)	
	Acc.-Nr.	ähnliche Aminosäuren	identische Aminosäuren	ähnliche Aminosäuren	identische Aminosäuren
LeRBOH 989 Aminosäuren	AF 088276	68%	54%	88%	82%
AtRBOHF 944 Aminosäuren	BAA 28953	64%	48%	86%	78%
AtRBOHG 977 Aminosäuren	AC 007764	62%	46%	83%	75%
OsRBOH 745 Aminosäuren, Fragment	AF 015302	71%	57%	85%	76%
AtRBOH, F-like 942 Aminosäuren	AL 096882	62%	48%	75%	64%
ThOX2, 1551 Aminosäuren	AF 230495	51%	32%	47%	28%
GP91 <sup>phox</sup> 570 Aminosäuren	S 70773	47%	32%	44%	30%
MOX 1 564 Aminosäuren	AF 127763	46%	31%	44%	31%

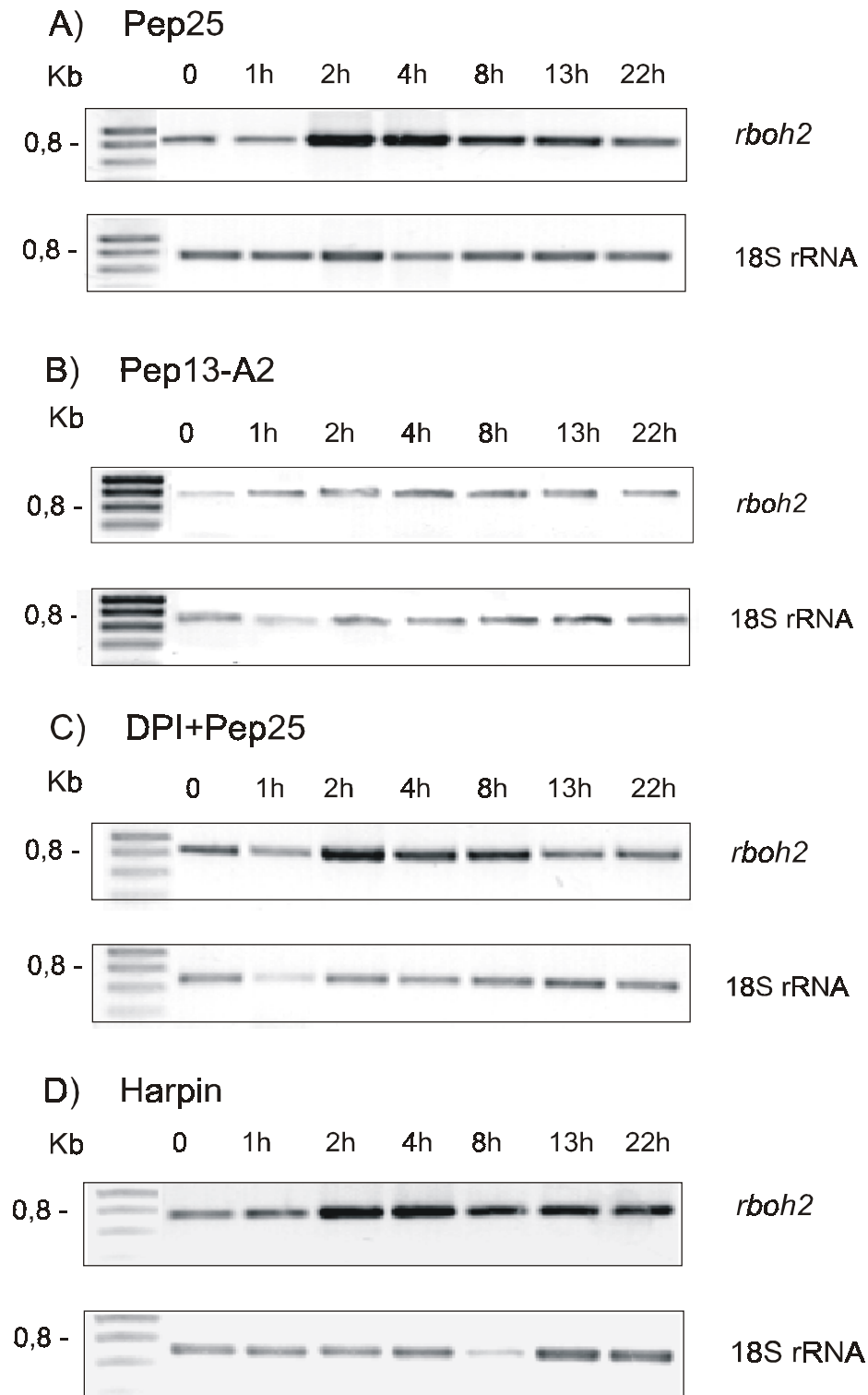
### 3.1.5 Expressionsanalyse von *rboh1* und *rboh2*

Zur Charakterisierung der *rboh1*- und *rboh2*-Transkriptakkumulation wurden Northern- und RT-PCR-Experimente durchgeführt. In Northern-Blot-Analysen konnte nur das *rboh2*-Transkript nachgewiesen werden. Die Größe der detektierten Bande entspricht mit 2,8 kb der Größe der isolierten *rboh2*-cDNA. Um einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von RBOH2 innerhalb der Elicitorsignalkette zu erhalten, wurde die Transkriptakkumulation in mit Elicitor Pep25 (50nM) behandelten Petersiliezellkulturen untersucht. In Northern-Analysen wurde ein transienter Anstieg der *rboh2*-Transkriptmenge nach 2 Stunden gefunden (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung einer radioaktiv markierten Sonde und Analyse der Daten am Phospho-Imager wurde die Induktion der Transkriptakkumulation nach Elicitierung quantifiziert. Der etwa 3-5fache Anstieg der Transkriptmenge wurde durch RT-PCR Experimente bestätigt [Abb. 7 A)].

Die Bindung des in Pep25 enthaltenen Pep13-Motivs an einen hochaffinen Rezeptor in der Plasmamembran ist notwendig und hinreichend für die Aktivierung der Signaltransduktionskette, in deren Folge Abwehrreaktionen induziert werden (Nürnberger *et al.*, 1994; Ligterink *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000). Dieses Motiv wurde in unserer Arbeitsgruppe durch sukzessiven Austausch der Aminosäuren des Pep13-Motivs durch Alanin analysiert (Nürnberger *et al.*, 1994, Nürnberger *et al.*, 1995) Dabei konnte gezeigt werden, daß der Austausch der Aminosäuren W2A und P5A die Bindungsaffinität zum Rezeptor so stark reduziert, daß die Aktivierung der Abwehrreaktionen inhibiert wird. In Übereinstimmung hiermit führte die Behandlung der Zellen mit dem inaktiven Analogon Pep13-A2 zu keiner Veränderung der *rboh2*-Transkriptakkumulation [Abb. 7 B)].

DPI, ein Suizid-Inhibitor der NADPH-Oxidase und anderer Flavoenzyme (Hancock und Jones, 1987; Doussi re und Vignais, 1999), inhibierte in Petersiliezellen den „oxidative burst“ und die Produktion von Phytoalexinen nach Elicitorbehandlung (Nürnberger *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997). Aus Abb. 7 C) wird ersichtlich, daß die Induktion der *rboh2*-Transkriptakkumulation in Petersiliezellen nach Applikation von Pep25 nicht durch die Präinkubation mit DPI inhibiert wurde.

Harpin, ein bakterieller Elicitor, induziert in Petersiliezellen die Produktion von ROS und die Synthese von Phytoalexinen ( J. Lee, pers. Mitteilung) . Die Applikation von 0,5 µM Harpin (eine Präparation des gereinigten rekombinanten Proteins wurde freundlicherweise von J. Lee zur Verfügung gestellt ) führte zu einem zeitlich und quantitativ ähnlich verlaufenden, transienten Anstieg der Transkriptmenge, wie nach Elicitierung von Petersiliezellen mit Pep25 beobachtet wurde [Abb. 7 D)]



**Abb. 7: RT-PCR-Analyse der *rboh2*-Transkriptakkumulation.**

Als interne Kontrolle wurde ein 780-bp-Fragment aus 18S rRNA amplifiziert. In Kontrollversuchen ohne die reverse Transkriptionsreaktion wurde kein Produkt erhalten (nicht gezeigt). Petersiliezellkulturen wurden für die angegebenen Zeiträume mit den zu untersuchenden Effektoren behandelt, anschließend durch Absaugen geerntet und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Als Kontrolle für die Induktionsexperimente wurde nach 24 h die Phytoalexinakkumulation in parallel behandelten Zellkulturen gemessen. Die Präparation der RNA-Proben und die Durchführung der nachfolgenden RT-PCR-Reaktionen werden in 2.3.2 und 2.3.3 beschrieben. Gezeigt sind repräsentative Gele ( $n=2-5$ ). A) Petersiliezellen wurden mit 50 nM Pep25 behandelt. B) Petersiliezellen wurden mit dem inaktiven Pep13-Analogen Pep13-A2 (50 nM) behandelt. C) Petersiliezellen wurden mit 5  $\mu$ M DPI für 15 min vorinkubiert, anschließend erfolgte die Elicitorbehandlung mit 50 nM Pep25. D) Petersiliezellen wurden mit 0,5  $\mu$ M Harpin elicitiert.

Das *rboh1*-Transkript wurde mittels RT-PCR und anschließender Hybridisierung des amplifizierten Fragmentes mit einer DIG-markierten *rboh1*-Sonde in Petersiliezellkultur nachgewiesen. Es waren 40 PCR-Zyklen notwendig, um eine im Gel sichtbare Bande zu erhalten (nicht gezeigt). Eine weitere Charakterisierung war aufgrund dieser geringen Abundanz des Transkriptes nicht möglich.

Unter Verwendung von RNA-Präparationen aus Blättern, Wurzel und Stengel sollte die *rboh2*-Transkriptakkumulation auch in der Pflanze nachgewiesen werden. RT-PCR-Experimente zeigen, daß das *rboh2*-Transkript in Blättern und Wurzeln detektiert wurde, nicht jedoch im Stengel von Petersiliepflanzen (Abb: 8).



**Abb. 8: RT-PCR-Analyse der *rboh2*-Transkriptakkumulation in Stengel, Blatt und Wurzel.**

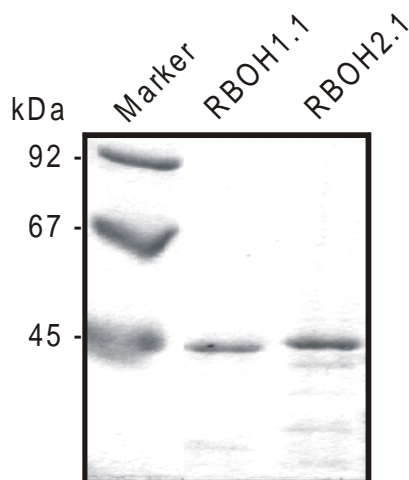
Die Pflanzenteile wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Präparation der RNA-Proben und die Durchführung der nachfolgenden RT-PCR-Reaktionen werden in 2.3.12.1 und 2.3.3 beschrieben.

## 3.2 Funktionelle Charakterisierung

### 3.2.1 Expression von RBOH1 und RBOH2 in *E.coli*

Zur funktionellen Analyse der rekombinanten Proteine und zur Generierung von Antisera wurde versucht *rboh1* und *rboh2* unter Verwendung von Expressionsvektoren der Serie pGEX-5X (Pharmacia) zu exprimieren. Diese ermöglichen die Expression von Proteinen als GST-Fusionsproteine (GST: Glutathion-S-Transferase). Die mittels PCR amplifizierte *rboh2*-cDNA wurde über eingefügte Restriktionsschnittstellen in den pGEX-5X-1-Expressionsvektor kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde durch Sequenzierung überprüft. Im Anschluß wurden Proteinextrakte der mit dem Expressionsplasmid pGEX-5X-RBOH2 transformierten Bakterien (*E.coli* BL21) mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung des Proteingels analysiert. Die Bildung eines GST-Fusionsproteins nach Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG konnte nicht detektiert werden. Darüberhinaus akkumulierte im Gegensatz zur Kontrolle (pGEX-5X-1) kein GST mehr. Aus diesem Grund wurden die C-terminalen, hydrophilen Bereiche RBOH1.1 (Leu<sub>726</sub>-Phe<sub>891</sub>) und RBOH2.1 (Asp<sub>473</sub>-Phe<sub>657</sub>) für die Expressionsversuche ausgewählt. Eine funktionelle Analyse war nun nicht mehr möglich, aber partiell exprimierte und gereinigte Proteine konnten für die Generierung von polyklonalen Antisera verwendet werden. Mittels PCR wurden die gewünschten Bereiche der cDNAs amplifiziert und geeignete Restriktionsschnittstellen eingeführt. Durch nachfolgende Klonierung in den pGEX-5X-2 Vektor konnten beide Polypeptide, nach Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG, als Fusionsproteine überexprimiert werden

(Abb.: 9) Die rekombinanten Fusionsproteine bildeten unlösliche *inclusionbodies*. Diese wurden als solche gereinigt und konnten nach Auftrennung mittels SDS-PAGE durch Anfärbung mit Coomassieblau als einzelne Banden mit der zu erwartenden Größe von 45 kDa sichtbar gemacht werden. Ungefärbte korrespondierende Gelabschnitte wurden ausgeschnitten und die Gelstreifen zur Generierung von Antikörpern verwendet. Mit der Herstellung der Immunseren in Kaninchen wurde die Firma Eurogentec beauftragt.



**Abb. 9: SDS-PAGE der rekombinanten Polypeptide RBOH1.1 und RBOH2.1**

Coomassie-gefärbtes 10%iges Polyacrylamidgel der gereinigten *inclusionbodies*, die aus den rekombinanten Proteinen gebildet wurden. Die Größen der Markerproteine sind links angegeben.

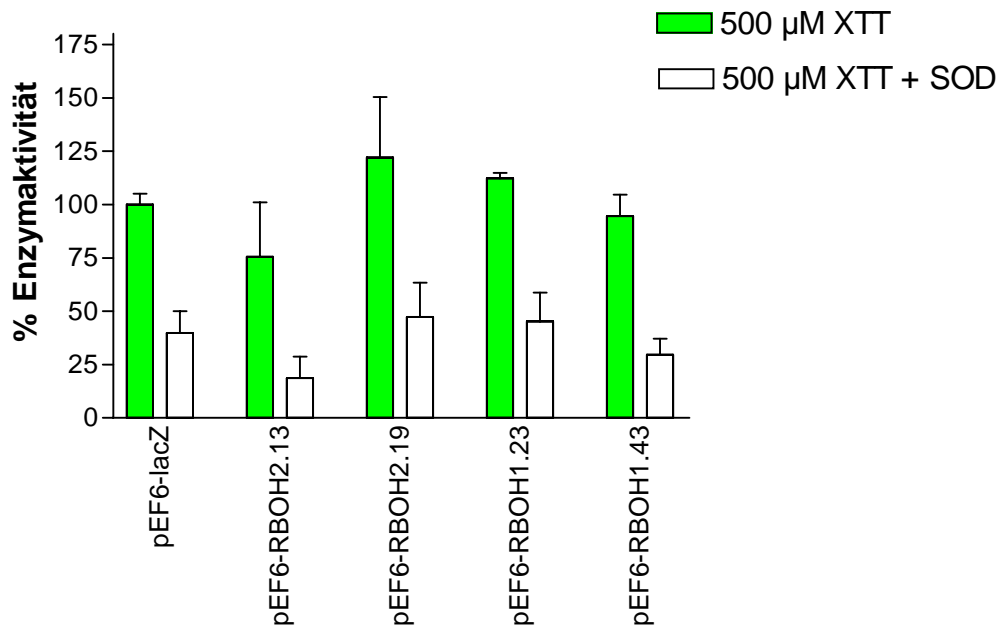
### 3.2.2 Versuche zum Nachweis der korrespondierenden Proteine in Petersiliezellen

Mit den erhaltenen Antiseren Anti-RBOH2.1-5934 und -5935, ebenso wie mit den Antiseren Anti-RBOH1.1-5936 und -5937 wurde durch Western-Blot-Analysen zunächst geprüft, ob diese mit den rekombinanten Proteinen RBOH1.1 und RBOH2.1 spezifisch reagieren. Im Gegensatz zum Präimmunserum erkannten die Antiseren spezifisch die korrespondierenden rekombinanten Proteine, wobei unter Verwendung von Anti-RBOH1.1-5937 und Anti-RBOH2.1-5934 die stärksten Signale detektiert wurden. Wie erwartet kreuzreagierten beide Antiseren auch in schwächerem Ausmaß mit dem jeweils nicht homologen rekombinanten Protein. Da RBOH1.1 und RBOH2.1 in *E.coli* als unlösliche *inclusionbodies* exprimiert wurden, konnten die gebildeten GST-Fusionsproteine nicht enzymatisch gespalten werden. Unter Verwendung von mikrosomalen Hefe-Fraktionen, in denen RBOH1 und RBOH2 heterolog exprimiert wurden (vgl. 3.2.6), konnte gezeigt werden, daß die Antiseren Anti-RBOH1.1-5937 und Anti-RBOH2.1-5934 die korrespondierenden, rekombinanten Proteine RBOH1 und RBOH2 (ohne GST) erkennen (nicht gezeigt). Neben mikrosomalen Fraktionen aus Petersiliezellen und angereicherten Plasmamembranen wurden auch gewebespezifische Proteinextrakte aus im Wachstum befindlichen Blättern, seneszenten Blättern, Haupt- und Nebenwurzeln und Stengel untersucht. Weiterhin wurden mikrosomale Fraktionen aus Arabidopsis-Zellkulturen getestet, da in diesen von Keller *et al.* (1998) die Detektion eines 98-kDa-Proteins unter

Verwendung eines Anti-AtRBOHF-Peptidantikörpers publiziert wurde. Dabei konnten weder mit dem Anti-RBOH2.1-5934- noch mit dem Anti-RBOH1.1-5937 Antiserum RBOH-Proteine in den untersuchten Proteinextrakten nachgewiesen werden, was auf die sehr geringe Abundanz der RBOH-Proteine in der Petersilie hinweist.

### 3.2.3 Heterologe Expression von RBOH1 und RBOH2 in NIH-3T3 Zellen

Im Jahr 1999 publizierten Suh *et al.* eine Arbeit, in der gezeigt wurde, daß das GP91<sup>phox</sup>-Homologe MOX1 nach Expression in NIH-3T3 Zellen ohne Rekrutierung anderer Komponenten die Bildung von O<sub>2</sub><sup>-</sup> katalysierte. Die Funktionalität der nichtphagozytischen GP91<sup>phox</sup>-Homologen ließ den Ansatz der heterologen Expression der RBOH-Proteine vernünftig erscheinen. In Zusammenarbeit mit Dirk Esser (MLU-Halle, Fachbereich Biotechnologie) wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen Fibroblastenzellen mit RBOH1- und RBOH2-kodierenden Plasmiden transfiziert wurden, die für die Expression in Säugerzellen geeignet sind. Die kodierenden offenen Leserahmen wurden durch PCR amplifiziert und in den Expressionsvektor pEF6/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert. Dabei wurden mittels der verwendeten Primer Kozaksequenzen eingefügt bzw. für *rboh2* optimiert (Kozak, 1987a, Kozak, 1987b, Kozak 1991). Der Vektor enthält ein V5-Epitop, so daß mit dem Anti-V5-Antiserum der Nachweis der Expressionsprodukte erfolgen konnte. NIH-3T3 Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden und einem Kontrollplasmid nach der Kalziumphosphat-Methode transfiziert (Loyter *et al.*, 1982). Nach Selektion wurden in den resultierenden stabilen Mischkulturen mittels Westernblot-Analyse die Expressionsprodukte nachgewiesen. Die rekombinanten Proteine RBOH1.23 und 43 wiesen ein apparentes Molekulargewicht von etwa 105-110 kDa auf. Für RBOH2.13 und 19 wurde eine Bande bei 78 kDa sichtbar (nicht gezeigt). Diese Größen entsprachen den vorhergesagten apparenten Molekulargewichten der unprozessierten Fusionsproteine, so daß beide Proteine offensichtlich nicht durch N-Glykolisierungsreaktionen modifiziert wurden. Für die Quantifizierung der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion wurde eine Methode etabliert, die auf der Reduktion des Tetrazoliumfarbstoffes XTT zum löslichen XTT-Formazan basiert (Sutherland *et al.*, 1997; Able *et al.*, 1998). Um die Abhängigkeit der Farbstoffreduktion von der O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion zu überprüfen, wurde in parallelen Kontrollansätzen Superoxiddismutase eingesetzt. Im Vergleich zu der kontrolltransfizierten Zellkultur ließ sich in den RBOH-exprimierenden Zellkulturen keine signifikant erhöhte O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion detektieren (Abb.: 10). Vermutlich wurden die pflanzlichen Proteine in den humanen Zellen nicht richtig prozessiert. Im Gegensatz zu MOX1- oder RENOX-transfizierten Fibroblastenzellen zeigen die RBOH1- und RBOH2-exprimierenden Zellen keinen Phänotyp (Suh *et al.*, 1999; Geiszt *et al.*, 2000). Möglicherweise war auch die Sensitivität der Methode zum Nachweis der Enzymaktivität der heterolog exprimierten Proteine nicht ausreichend. So wurde unter Verwendung eines Lucigenin-Assays in MOX1-transfizierten Zellen nach Zellaufschluß nur zweifach höhere Lumineszenz gemessen, als in Vektor-transfizierten Zellen (Suh *et al.*, 1999).



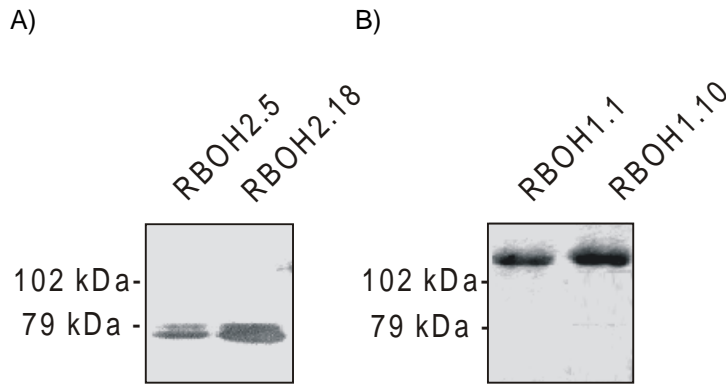
**Abb. 10: Detektion der  $O_2^-$ -Produktion in den *rboh2*- und *rboh1*-transfizierten Zelllinien (n=2).**

Als Kontrolle dienten mit dem Plasmid pEF6-lacZ transfizierte Zellen. Die Konstrukte pEF6-RBOH2.19 und pEF6-RBOH1.23 wurden sequenziert und auf ihre korrekte Polypeptidsequenz überprüft.

### 3.2.4 Heterologe Expression in der Hefe *S. cerevisiae*

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein genetisch gut charakterisierter, eukaryotischer Modellorganismus und, im Gegensatz zu *E.coli*, in der Lage, Modifikationen und Prozessierung von Proteinen ähnlich wie in anderen eukaryotischen Organismen auszuführen. Die Expression von heterologen, putativen integralen Membranproteinen kann somit zur Integration der Proteine in Hefemembranen führen. Der Hefeexpressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) erlaubt die induzierbare, heterologe Expression von Proteinen unter der Kontrolle des starken *GAL1*-Promotors. Das am C-Terminus fusionierte V5-Epitop ermöglicht die immunohistochemische Detektion der Fusionsproteine mittels Anti-V5-Antikörpern. Die offenen Leserahmen von *rboh1* und *rboh2* wurden durch PCR amplifiziert und in den Hefeexpressionsvektor kloniert. Dabei wurden mittels der verwendeten Primer Kozaksequenzen eingefügt bzw. für *rboh2* optimiert. Die Konstrukte pYESTOPO-RBOH2.5 und pYESTOPO-RBOH1.10 wurden durch Sequenzierung überprüft. Der Hefestamm *INVSc1* wurde mit den Plasmiden pYESTOPO-RBOH1.1 und 10, pYESTOPO-RBOH2.5 und 18 und mit pYESTOPO.*lacZ* als Expressionskontrolle transformiert. Übernachtskulturen der transgenen Hefen wurden geerntet und die heterologe Proteinexpression in Minimalmedium mit 2% Galaktose und 1% Raffinose induziert. Bei einer  $OD_{600}$  von 0,8-1,0 erfolgte die Ernte der Hefezellen und die hergestellten Proteinextrakte wurden in Western-Blot-Analysen untersucht. Für die rekombinanten RBOH1-Proteine wurde eine Bande von 105-108 KDa und für die RBOH2-Proteine Doppelbanden von 77 und 78 KDa detektiert (Abb. 11)



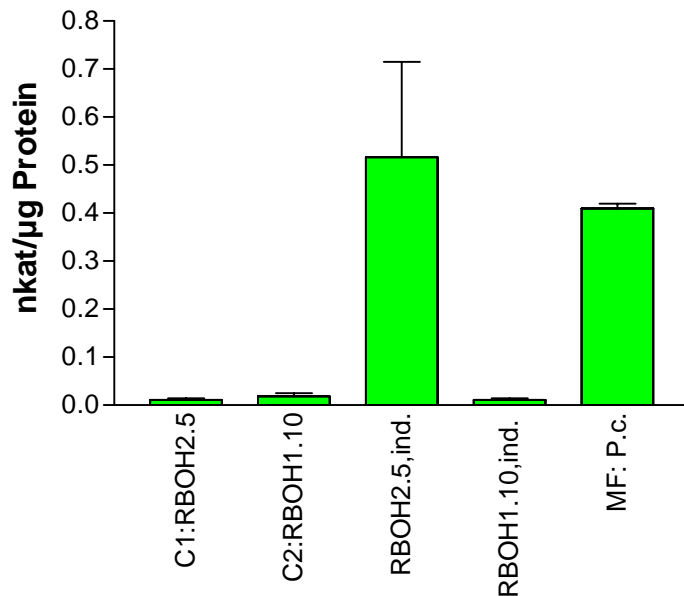


**Abb. 11: Westernblot-Analyse mit Anti-V5-HRP-Antikörpern zum Nachweis der heterologen Proteine in Hefeextrakten.** Pro Spur wurden 20 µg Gesamtproteinextrakt durch SDS-PAGE in einem 10%igen Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte der immunologische Nachweis mit Anti-V5-HRP-Antikörpern (1:5000) und die Detektion mit dem ECL-Reagenz. Die Expositionszeit betrug 1 min(A) oder 5s(B).

### 3.2.5 Enzymatische Charakterisierung der rekombinanten Enzyme RBOH1.10 und RBOH2.5

#### 3.2.5.1 Enzymaktivitäten

In Dot-Blot-Analysen konnte gezeigt werden, daß die heterolog exprimierten Proteine nur in den Hefemikrosomen lokalisiert waren, in den cytosolischen Fraktionen wurde kein Signal sichtbar (Daten nicht gezeigt). Daher wurden für Enzymaktivitätsmessungen mikrosomale Fraktionen aus transgenen Hefeextrakten präpariert, um eventuelle enzymatische Aktivitäten anzureichern und den Hintergrund während der Messungen zu verringern. Die mikrosomalen Fraktionen wurden mittels des Lucigenin-Assays auf  $O_2^-$ -Bildung getestet. Für pYESTOPO-*rboh2.5* transformierte Hefezellen wurde NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion gemessen. Im Gegensatz dazu war in Mikrosomen, die das rekombinante Protein RBOH1.10 enthielten, unter den angewandten Versuchsbedingungen keine Enzymaktivität meßbar (Abb.: 12). Kein Lumineszenzsignal wurde gemessen, wenn anstatt NADPH  $NADP^+$  in den Meßansatz gegeben wurde. Ohne NADPH oder nach Zugabe von hitzedenaturiertem Proteinextrakt (95°C, 10 min) wurde ebenfalls keine Chemilumineszenz gemessen. Es wurde ein linearer Zusammenhang zwischen der Menge an zugegebenem Proteinextrakt (0-16 µl) und dem Anstieg der resultierenden  $O_2^-$ -Produktion ermittelt (nicht gezeigt).



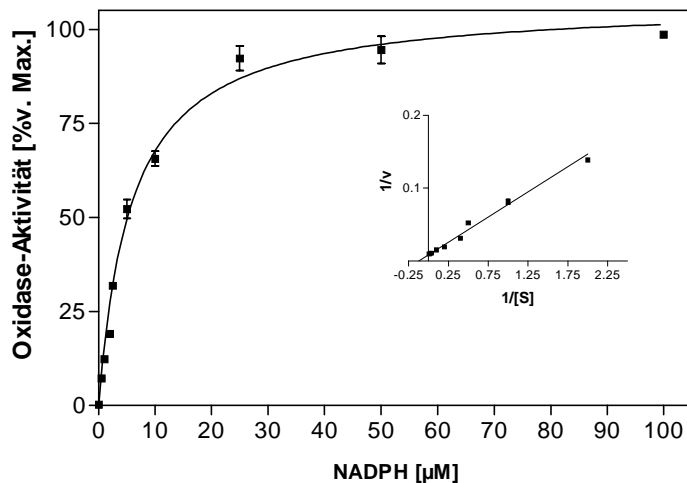
**Abb. 12: Messung der  $O_2^-$ -Produktion in mikrosomalen Fraktionen von Hefen, welche die Expressionsplasmide pYESTOPO-rboh2.5 oder pYESTOPO-rboh1.10 enthielten.**

In den ersten beiden Balken sind negative Kontrollen dargestellt (die Hefezellen wurden in Minimalmedium mit 2% Glucose angezogen). Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Messung der  $O_2^-$ -Produktion mittels des Lucigenin-Assays. Die Lumineszenz wurde 10 s nach Lucigenin-Injektion für 10 s gemessen. Es wurden jeweils 5  $\mu$ l (25  $\mu$ g) der mikrosomalen Fraktion in einer Enzymaktivitätsmessung eingesetzt. Als positive Kontrolle 5  $\mu$ l (37,5  $\mu$ g) Petersiliemikrosomen eingesetzt, dabei wurden etwa 0,4 nkat/ $\mu$ g Protein (entspricht 110000 RLE, relative Lichteinheiten) gemessen.

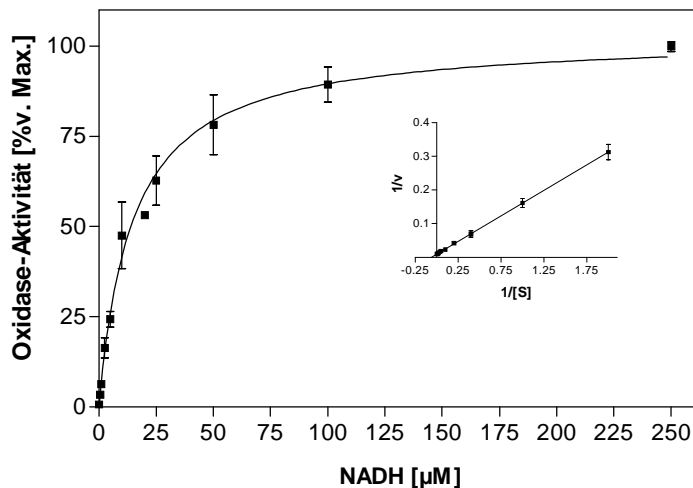
### 3.2.5.2 $K_M$ -Werte für die Substrate NADPH und NADH

Die NAD(P)H-Oxidaseaktivität des heterolog exprimierten Proteins RBOH2.5 sollte enzymkinetisch charakterisiert werden. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration der Elektronendonatoren NADPH und NADH wurde untersucht. Die ermittelten apparenten  $K_M$ -Werte betrugen  $8,2 \pm 1,3$   $\mu$ M für das Substrat NADPH und  $15 \pm 3,2$   $\mu$ M für das Substrat NADH (vgl. Abb. 13).

A)



B)



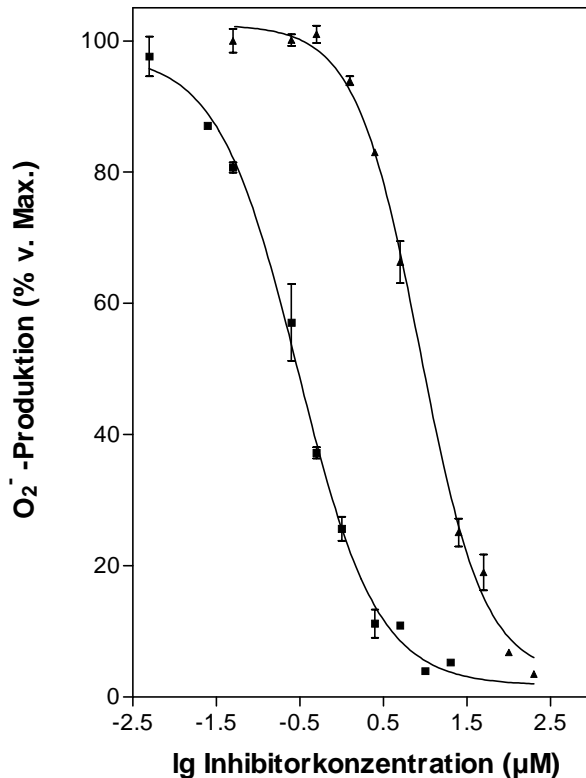
**Abb. 13: Abhängigkeit der NADPH-Oxidaseaktivität des rekombinanten RBOH2.5 von der Substratkonzentration.**

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Messung der  $O_2^-$ -Produktion mittels des Lucigenin-Assay. Pro Messung wurden 5,5  $\mu$ l (27,5  $\mu$ g) der mikrosomalen Hefefraktion und Substratkonzentrationen von 0,5-100  $\mu$ M NADPH [A)] und von 0,5-250  $\mu$ M NADH [B)] eingesetzt. Die Lumineszenz wurde 10 s nach Lucigenin-Injektion für 10 s gemessen. Die eingefügten Abbildungen zeigen die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver und Burk. Die daraus ermittelten apparenten  $K_M$ -Werte betragen  $8,2 \pm 1,3$   $\mu$ M für das Substrat NADPH und  $15 \pm 3,2$   $\mu$ M für das Substrat NADH. Es sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit je zwei parallelen Messungen dargestellt. Die maximale Oxidase-Aktivität beträgt 1,7 nkat/ $\mu$ g Protein mit NADPH als Elektronendonator und 5,61 nkat/ $\mu$ g Protein mit NADH als Substrat.

### 3.2.5.3 Hemmung der $O_2^-$ -Produktion durch DPI / IDP

DPI (Diphenyliodonium) und die weniger wirksamen Verbindung IDP (Diphenyliodonium) werden in der Literatur als potentielle Inhibitoren der NADPH-Oxidase und anderer Flavoenzyme beschrieben (Hancock und Jones, 1987; O'Donnell *et al.*, 1993). Ihre Wirksamkeit wurde auch in pflanzlichen Systemen, z.B. in Petersiliezellkulturen untersucht (Jabs *et al.*, 1997). Sowohl der *oxidative burst*, als auch nachfolgend induzierte Kaskaden

von Abwehrreaktionen wie die Phytoalexinbiosynthese werden in einigen Pflanze/Pathogen-Systemen durch DPI inhibiert. In Petersiliezellkulturen und Mikrosomen sind Konzentrationen von 0,9-1,5  $\mu\text{M}$  für die 50%ige Hemmung des *oxidative burst* und der Phytoalexinakkumulation ausreichend (Jabs *et al.*, 1997). Für das heterolog exprimierte RBOH2.5 wurde ein  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0,3  $\mu\text{M}$  für DPI und 8,9  $\mu\text{M}$  für IDP ermittelt (Abb. 14).

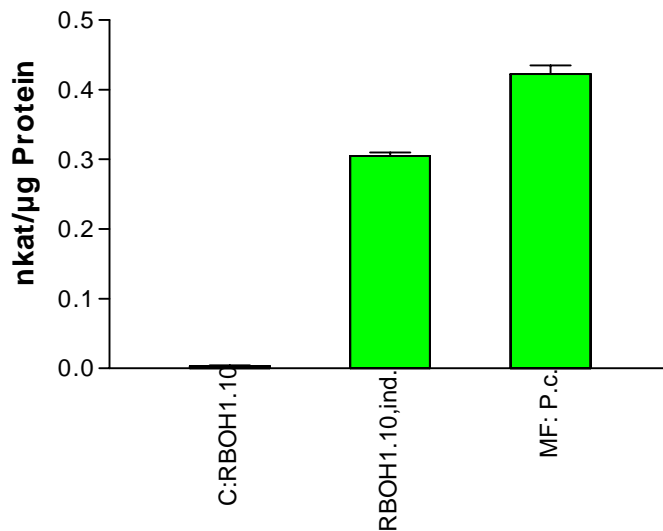


**Abb. 14: Hemmung der NADPH-Oxidaseaktivität des heterolog exprimierten RBOH2.5 durch DPI oder IDP**

Im Diagramm ist die Inhibition der  $\text{O}_2^-$ -Produktion in RBOH2.5-transformierten Hefe-Mikrosomen in Abhängigkeit von der Inhibitorkonzentration dargestellt. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Zugabe des Inhibitors (0,005-20  $\mu\text{M}$  DPI, ■ und 0,1-200  $\mu\text{M}$  IDP, ▲), der Hefe-Mikrosomen (5,5  $\mu\text{l}$ ; 27,5  $\mu\text{g}$ ), DDC (0,5  $\mu\text{M}$ ) und von NADPH (100  $\mu\text{M}$ ) in den Meßansatz. Es wurde die Lucigenin-Methode angewendet (Meßzeit: 10s nach 25 s Verzögerung; 100% Oxidase-Aktivität entsprechen 0,6 nkat/ $\mu\text{g}$  Protein).

#### 3.2.5.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit der NAD(P)H-Oxidaseaktivität von RBOH1

Der für die Mikrosomenpräparationen aus Hefe verwendete Extraktionspuffer wurde nach der Methode für die Isolierung von Petersiliemikrosomen modifiziert (Tschöpe, 1999) und enthielt kein freies Kalzium. Unter Verwendung eines Extraktionspuffers, dem neben 2mM EDTA noch 5mM  $\text{CaCl}_2$  zugesetzt wurde, konnte auch für RBOH1.10 NAD(P)H-abhängige  $\text{O}_2^-$ -Produktion gemessen werden (Abb. 15) Für die Substrate NADPH und NADH wurden die Michaelis-Menten-Konstanten ermittelt. Die ermittelten apparenten  $K_M$ -Werte betragen  $8,9 \pm 2,8 \mu\text{M}$  für das Substrat NADPH und  $19,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$  für das Substrat NADH (vgl. Abb. 16).



**Abb. 15: Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{O}_2^-$ -Produktion in mikrosomalen Fraktionen von Hefen, welche das Expressionsplasmid pYESTOPO-rboh1.10 enthielten.**

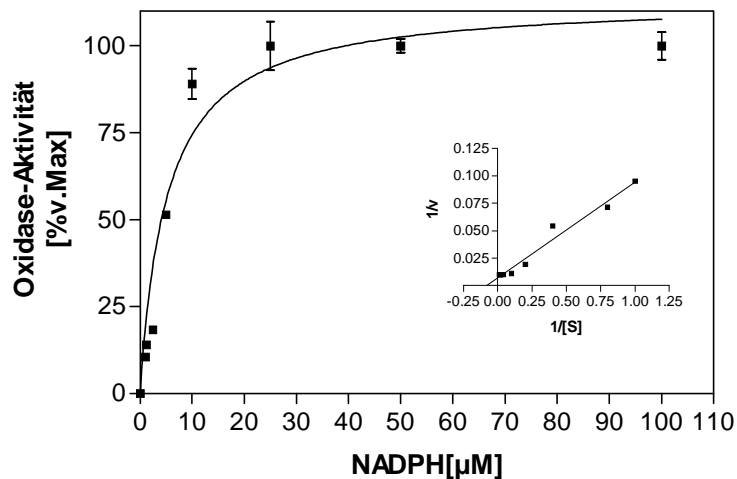
Im ersten Balken ist eine negative Kontrolle dargestellt (die Hefezellen wurden in Minimalmedium mit 2% Glucose angezogen). Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Messung der  $\text{O}_2^-$ -Produktion mittels des Lucigenin-Assays. Die Lumineszenz wurde 10 s nach Lucigenin-Injektion für 10 s gemessen. Es wurden jeweils 5 µl (25 µg) der mikrosomalen Fraktion in einer Enzymaktivitätsmessung eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde die Oxidase-Aktivität nach Zugabe von 5 µl (37,5 µg) Petersiliemikrosomen gemessen, dabei wurden 0,42 nkat/µg Protein (115000 RLU) ermittelt.

Die erhaltenen Daten wurden mit den ermittelten  $K_M$ -Werten für RBOH2.5 und die aus solubilisierten Petersilie-Mikrosomen aufgereinigte NADPH-Oxidaseaktivität verglichen und sind in der Tabelle 10 zusammengefaßt.

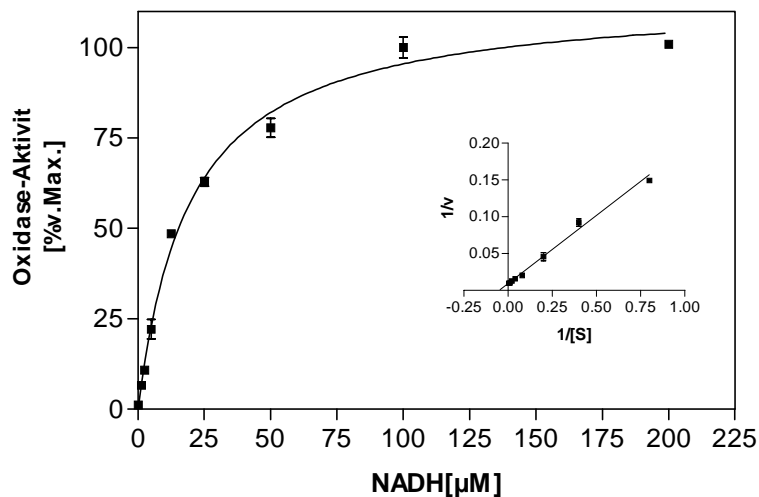
**Tabelle 10: Vergleich der apparenten  $K_m$ -Werte für NADPH und NADH**

	<u>NADPH (µM)</u>	<u>NADH (µM)</u>
RBOH1.10	8,9±2,8 (n=2)	19,2± 1,2µM (n=2)
RBOH2.5	8,2 ± 1,3 (n=3)	15 ± 3,2 (n=3)
Angereicherte NADPH-Oxidase-Aktivität aus Petersilie	3,1 ± 0,4 (n=2)	30 ± 5 (n=2)

A)



B)



**Abb. 16: Abhängigkeit der NADPH-Oxidaseaktivität des rekombinanten RBOH1.10 von der Substratkonzentration.**

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch Messung der  $O_2^-$ -Produktion mittels des Lucigenin-Assay. Pro Messung wurden 5,5  $\mu$ l (27,5  $\mu$ g) der mikrosomalen Hefefraktion und Substratkonzentrationen von 0,5-100  $\mu$ M NADPH [A]) und von 0,5-200  $\mu$ M NADH [B]) eingesetzt. Die Lumineszenz wurde 10 s nach Lucigenin-Injektion für 10 s gemessen. Die eingefügten Abbildungen zeigen die doppelt reziproke Darstellung nach Lineweaver und Burk. Die daraus ermittelten apparenten  $K_M$ -Werte betragen  $8,9 \pm 2,8$   $\mu$ M für das Substrat NADPH und  $19,2 \pm 1,2$   $\mu$ M für das Substrat NADH ( $n=2$ ). Die maximale Oxidase-Aktivität beträgt 0,35 nkat/ $\mu$ g Protein mit NADPH als Elektronendonator und 0,56 nkat/ $\mu$ g Protein mit NADH als Substrat.

### 3.2.6 Stabile Transformation von Petersiliezellen mit *rboh2*-Sense- und *rboh2*-Antisense-Konstrukten

Die bisher aufgezeigten Daten über die transiente Induktion der *rboh2*-Transkriptakkumulation in Petersiliezellen nach Elicitorbehandlung und die NAD(P)H-Oxidaseaktivität der rekombinanten Proteine RBOH2.5 und RBOH1.10 in Verbindung mit den ermittelten kinetischen Parametern, lassen die Hypothese zu, daß RBOH2 und/oder

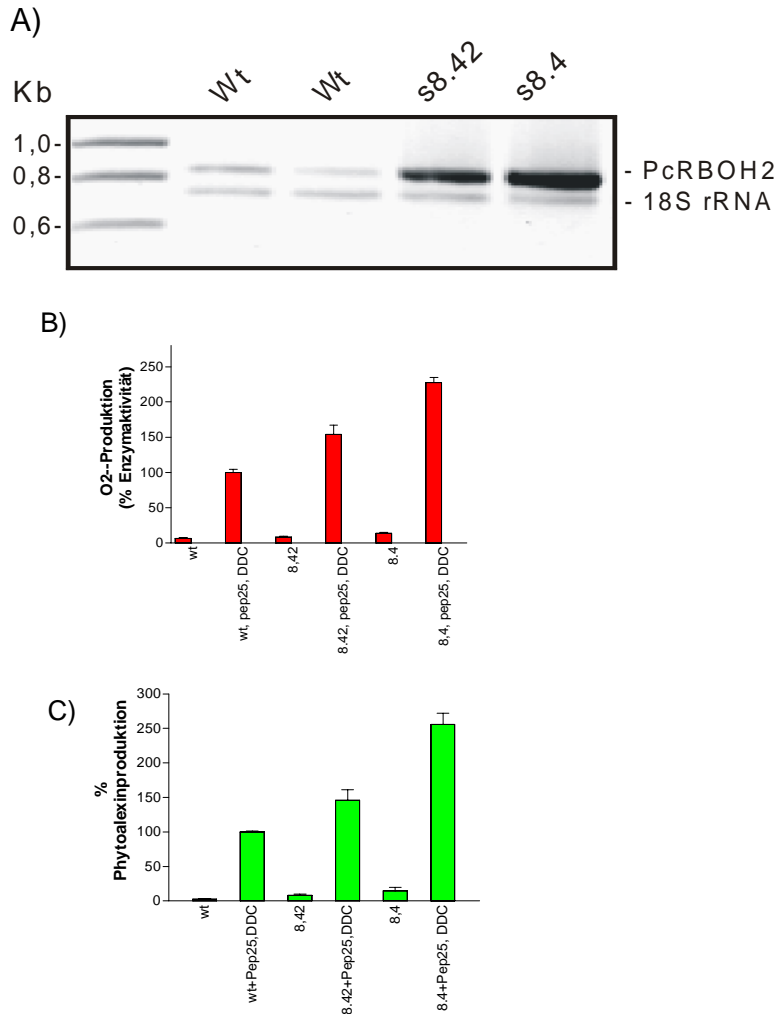
RBOH1 die induzierbare, transiente Produktion von  $O_2^-$ -Ionen in Petersilie katalysieren. Um die physiologische Funktion von RBOH2 in der Elicitor-vermittelten Signaltransduktion und der Aktivierung von Abwehrreaktionen zu zeigen, war ein *loss-of function*-Experiment von entscheidender Bedeutung, in dem die Elicitorsignalkette unterbrochen wird. Mittels stabil transformierter *rboh2*-Antisense-Linien sollte gezeigt werden, daß die durch den Elicitor Pep25 induzierte  $O_2^-$ -Produktion, welche hinreichend und notwendig für die nachfolgende Aktivierung von Abwehrgenen ist, von RBOH2 katalysiert wird. Ein zweiter Ansatz ist die Generierung von *rboh2*-Sense-Linien, in denen eine Überexpression von RBOH2 zu erhöhter  $O_2^-$ -Produktion und Phytoalexinakkumulation führen sollte.

### 3.2.6.1 Konstrukte für die stabile Transformation der Petersiliezellen

Für die Herstellung der Konstrukte für die stabile Transformation der Petersiezellkulturen wurde der binäre, pflanzliche Expressionsvektor pBIB-PFF19 (vgl. 2.2.4) verwendet, in dem der CaMV-35S-Promotor starke, konstitutive Expression in den Pflanzenzellen vermittelt. Der offene Leserahmen von *rboh2* wurde mittels PCR amplifiziert, in den pGEM-T-Vektor kloniert und sequenziert. Über die mittels der Primer eingefügte Restriktionsschnittstelle *KpnI* erfolgte die Klonierung in den pBIB-PFF19-Vektor. Die Methode zur stabilen Transformation der Zellkulturen mit den Plasmiden pBIB-PFF19-s8 und pBIB-PFF19-as6 wird im Material- und Methodenteil (2.2.4) beschrieben.

### 3.2.6.2. Analyse und Charakterisierung der *rboh2*-Sense-Linien

Bevor die isolierten transgenen Zellkulturen hinsichtlich ihres Phenotyps analysiert wurden, erfolgte ihre Charakterisierung mittels RT-PCR. Von 29 untersuchten transgenen Kalli wurden vier putative überexprimierende Linien gefunden, wobei die Linien s8.4 und s8.42 für eine weitere ausführliche Analyse und Charakterisierung ausgewählt wurden. In der Abb. 17 A) ist die stark erhöhte *rboh2*-Transkriptakkumulation in der s8.4- und der s8.42-Zellkultur dargestellt. Diese Zellkulturen wurden hinsichtlich ihrer  $O_2^-$ -Produktion im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Nach Elicitierung mit 50 nM Pep25 und gleichzeitiger Zugabe von Superoxid-Dismutase-Inhibitor DDC in die Zellsuspensionskulturen wurde in s8.42-Zellsuspensionen 1,5fach erhöhte  $O_2^-$ -Produktion und in s8.4 2,3fach erhöhte  $O_2^-$ -Produktion im Vergleich zum Wildtyp gemessen [Abb. 17 B)]. Interessant erschien, daß die  $H_2O_2$ -Akkumulation in den Sense-Linien im Vergleich zum Wildtyp supprimiert war (nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit der erhöhten  $O_2^-$ -Produktion in den transgenen Zellkulturen wurde auch gesteigerte Phytoalexinproduktion gemessen [Abb. 17 C)]. Bemerkenswert war die Korrelation zwischen erhöhter  $O_2^-$ -Produktion und Phytoalexinbiosynthese. Die höhere Phytoalexinakkumulation wurde im Kulturmedium von s8.4 gemessen, bei der auch höhere  $O_2^-$ -Produktion zu verzeichnen war.



**Abb. 17: Charakterisierung und phenotypische Analyse der *rboh2*-Sense-Linien.**

A) RT-PCR-Analyse zur Charakterisierung der s8.42- und s8.4-Linien (2.2.4) B) O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp. Es sind drei unabhängige Messungen mit mindestens zwei Parallelen dargestellt. Die Lucigenin-Messungen erfolgten nach Zugabe von 500 µM DDC und 50 nM Pep25 in die Zellsuspensionskulturen nach 30 min. C) Phytalexinakkumulation in den transgenen Linien im Vergleich zum Wildtyp nach Elicitierung der Suspensionskulturen mit 50 nM Pep25 und Zugabe von 500 µM DDC, gemessen nach 24 h.

### 3.2.6.3 Analyse und Charakterisierung der *rboh2*-Antisense-Linien

Es wurden insgesamt 42 transgene Kalli isoliert und mittels RT-PCR und Northern-Blot-Analyse charakterisiert. Dabei zeigte sich, daß keine *rboh2*-Antisense-Linie generiert werden konnte, in der die *rboh2*-Transkriptakkumulation vollständig unterdrückt war. Von neun untersuchten transgenen Zellsuspensionskulturen zeigte keine signifikante Veränderungen hinsichtlich ihrer Elicitorresponsivität.



### 3.2.7 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems (Two-Hybrid System) lassen sich potentielle Interaktionen von Proteinen *in vivo* studieren und nachweisen (Fields und Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Bartel *et al.*, 1993). In der vorliegenden Arbeit sollten mit dem Two-Hybrid-System Interaktionspartner von RBOH1 und RBOH2, wie z.B. mögliche cytosolische Untereinheiten oder Regulatoren, charakterisiert werden. Dieses genetische System beruht auf der Erkenntnis, daß eukaryotische Transkriptionsfaktoren modular aufgebaut sind und sowohl DNA-bindende Domänen (BD) als auch Aktivierungsdomänen (AD) haben. Von Brent und Ptashne wurde 1985 eine Arbeit publiziert, in der die Aktivierungsdomäne des GAL4-Proteins aus Hefe mit der DNA-bindenden Domäne des LEXA-Proteins aus *E. coli* fusioniert wurde, wobei in der Hefe ein funktioneller Transkriptionsfaktor entstand (Brent und Ptashne, 1985). Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, daß durch die Expression potentiell interagierender Proteine als Chimäre Protein-Protein-Interaktionen detektiert werden können. Die Interaktion wird über die Aktivierung von Reportergenen dargestellt. In dem in dieser Arbeit verwendeten HybriZAP™ Two-Hybrid Predigested Vector Kit (Stratagene) wird der Transkriptionsfaktor GAL4, der an der Regulation von Genen des Galaktosestoffwechsels in *S. cerevisiae* beteiligt ist, zur Konstruktion der Hybridproteine benutzt (Ma und Ptashne, 1987). Ein Hybridprotein besteht aus der DNA-bindenden Domäne fusioniert mit dem zu untersuchenden Beute-Protein (*bait*), das zweite aus der transaktivierenden Domäne fusioniert mit dem Köder-Protein (*prey*). In diesem Fall werden von einer geeigneten cDNA-Bank (Kroj, 1999) exprimierte Petersilieproteine als Köder-Protein untersucht. Beide Fusionsproteine selbst können allein nicht transkriptionsaktivierend wirken, wenn sie jedoch koexprimiert werden, führt die Interaktion der beiden Proteine zur Transkription eines Reportergens.

#### 3.2.7.1 Bedingungen

Da eine potentielle Interaktion der Testproteine im Kern der Hefezelle stattfindet, wurden Konstrukte hergestellt, die für Hybridproteine kodieren, dessen N-Terminus von der DNA-bindenden Domäne des GAL4 gebildet wird, fusioniert mit den hydrophilen C-Termini von PcRBOH1 oder PcRBOH2. Ein drittes Hybridprotein enthielt ein aus dem N-Terminus von PcRBOH2 stammendes hydrophiles Peptid mit einer Größe von 66 Aminosäuren (vgl. Tab. 11). In dem C-terminalen Bereich von GP91<sup>phox</sup> befinden sich Peptid-Domänen, die als essentiell für die Rekrutierung der cytosolischen Untereinheiten p47 und p67 beschrieben wurden (Kleinberg *et al.*, 1992). Darüberhinaus ist an die Fusionsproteine ein HA-Tag (Hämagglutinin) angekoppelt, so daß mit einem spezifischen Antikörper auch ein Immunnachweis durchgeführt werden konnte (Kroj, 1999). Das Screening wurde mit dem Reporterhefestamm PJ69-4A durchgeführt, welcher die Reportergene *ADE2*, *HIS3* und *lacZ* unter der Kontrolle der GAL4-bindenden Promotoren der *GAL2*-, *GAL1*- und *GAL7*-Gene enthält. Das Genprodukt des *lacZ*-Gens ist die  $\beta$ -Galaktosidase. Die Expression ließ sich mittels X-Gal-Platten nachweisen (Blaufärbung der Hefen) oder in einem *in vitro*-Assay mit ONPG (o-Nitrophenyl-b-D-Galactosid) als Substrat quantitativ detektieren. *ADE2* und *HIS3* erlaubten eine Selektion auf Adenin- bzw. Histidin-Auxotrophie.

**Tabelle 11: Für das Two-Hybrid-Screening hergestellte Plasmide.**

Prey-Plasmid	Bezeichnung	Länge	abgeleitete Aminosäuresequenz, MW
C-Terminus; PcRBOH1	pBD-HA42	495 bp	18,2 kDa
N-Terminus; PcRBOH2	pBD-HA51	198 bp	7,3 kDa
C-Terminus, PcRBOH2	pBD-HA52	552 bp	20,2 kDa

### 3.2.7.2 Testverfahren zur Eignung der Konstrukte

Mittels einiger Transformations- bzw. Kotransformationsexperimente unter Verwendung von Kontrollplasmiden kann überprüft werden, ob sich die hergestellten Konstrukte für einen Two-Hybrid-Screen eignen. Die Kontrollplasmide p53 und pLaminC kodieren für Fusionsproteine mit der DNA-bindenden Domäne des GAL4 und werden in Kotransformationsexperimenten als Positiv- bzw. Negativkontrolle eingesetzt.

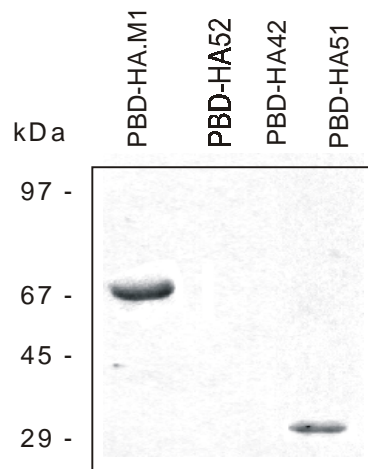
**Tabelle 12: Kontrolltransformationen zur Eignung der hergestellten Konstrukte für einen Two-Hybrid-Screen**

Bait-Plasmid	Prey-Plasmid	SD-Leu-Agar	SD-Trp-Agar	SD-Leu-Trp, -His-Agar	SD-Leu,-Trp -Ade-Agar
p53			<sup>1</sup> +		
pLaminC			+		
	pSV40	+			
p53	pSV40			+	+
pLaminC	pSV40			<sup>2</sup> -	-
pBD-HA42	pSV40			-	-
pBD-HA51	pSV40			-	-
pBD-HA52	pSV40			-	-

<sup>1</sup>Wachstum (+) oder <sup>2</sup>kein Wachstum (-)

Das P53 und SV40T-Antigen interagieren *in vivo* und zeigen Reporterexpression. Wie auch in der Negativkontrolle pLaminC-pSV40 wurde für alle drei Konstrukte pBD-HA42, pBD-HA51, pBD-HA52 keine Autoaktivierung der Reporter gefunden (vgl. Tab. 12). Die Konstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert und die Expression der Fusionsproteine nach Transformation in den Reporterhefestamm in Westernblot-Analysen untersucht. Als Positivkontrolle wurde das Plasmid pBD-HA.M1 verwendet, welches für ein Fusionsprotein mit einer Petersilie-MAP-Kinase kodiert (Kroj, 1999). Proteinextrakte wurden hergestellt und mit Anti-HA-Antikörpern analysiert. Ein Signal der zu erwartenden Größe wurde nur in Extrakten sichtbar, die pBD-HA51 und pBD-HA.M1 enthielten (Abb. 17). Dabei ist auffällig, daß die Expression des pBD-HA51-Fusionsproteins schwächer ist, als die der fusionierten MAP-Kinase. Es ist möglich, daß die von den Plasmiden pBD-HA42 und pBD-HA52 kodierten Fusionsproteine in der Hefe instabil sind und abgebaut werden oder die Expression unter dem ADH1-Promotor so schwach war, daß die Proteine in der Westernblot-Analyse nicht nachgewiesen werden können. Der 1500 bp lange ADH1-

Promotor ist in dem verwendeten Plasmid pBD-GAL4 Cam auf 408 bp verkürzt, was ein niedrigeres Expressionsniveau zur Folge hat (Tornow und Santangelo, 1990; Legrain *et al.*, 1994).



**Abb. 17: Westernblot-Analyse mit HA-Antikörpern zum Nachweis der Fusionsproteine in Hefeextrakten.** Pro Spur wurden jeweils 25 µg Gesamtproteinextrakt durch SDS-PAGE in einem 10%igen Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrocellulose erfolgte der immunologische Nachweis mit HA-Antikörpern (1:5000), anschließend erfolgte die Detektion mittels Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörper (1:5000) und ECL-Reagenz. Die Belichtungszeit betrug 20 s. Das Kontrollplasmid p53 enthält keinen HA-Tag.

### 3.2.7.3 Resultate der Hefe-Zwei-Hybrid-Screens

Eine Übersicht über die Ergebnisse der durchgeführten Zwei-Hybrid-Screens liefert die Tabelle 13. Es wurden mit Fusionsprotein etwa  $1,5 \times 10^6$  Primärtransformanden analysiert.

**Tabelle 13: Ergebnisse der durchgeführten Two-Hybrid-Screens**

Bait-Plasmid	Anzahl der durchsuchten Primärtransformanden	Pos. Klone
pBD-HA51	$1,3 \times 10^6$	26
pBD-HA42	$1,5 \times 10^6$	4
pBD-HA52	$1,5 \times 10^6$	3

Nach der zweiten Selektionsrunde wurden 4 Klone (pAD51-8, pAD51-9, pAD51-13, pAD42-1) isoliert, deren exprimierte Fusionsproteine nach Retransformation in die Hefe spezifisch mit PBD-HA51, bzw. PBD-HA42 interagierten, d.h. die Reportergenexpression wurde nachgewiesen. Die Kontrolltransformationen mit p53 oder pLaminC führten nicht zur Aktivierung der Reportergene. Nach automatischer Sequenzierung dieser cDNA-Klone wurden durch Datenbankvergleiche folgende Homologien zu anderen bekannten DNA-Sequenzen oder Proteinen gefunden (Tab.14):

**Tabelle 14: Ergebnis von Datenbankabfragen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der positiven cDNA-Klone**

Prey-Plasmid	Homologe Sequenzen
pAD51-8	95 % Identität zu <i>RRN26</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> , das für mitochondriale 26S rRNA kodiert (Y08501)
pAD51-9	Signifikante Homologie zu einem hypothetischen Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i> (AC002561), keine Hinweise zur Funktion
pAD51-13	keine signifikante Homologie
pAD42-1	Homologie zu mikrosomaler Glutathion-S-Transferase aus dem Menschen (AF 026977) : 29% Identität auf Aminosäureebene

### 3.3. Isolierung und Charakterisierung von cDNA-Klonen nach partieller Reinigung einer putativen NAD(P)H-Oxidase

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine weitere Strategie zur Charakterisierung einer NADPH-Oxidase aus Petersilie verfolgt. Markus Tschöpe etablierte im Rahmen seiner Promotionsarbeit einen Enzymaktivitätstest, um selektiv die Produktion von Superoxidanionen in Petersiliezellkulturen zu detektieren (Tschöpe, 1999). Mit dieser Voraussetzung konnte eine NADPH-Oxidaseaktivität aus Mikrosomen solubilisiert, über Ionenaustauschchromatographie und Pseudoaffinitätschromatographie aufgereinigt und charakterisiert werden. Dabei wurde mittels SDS-PAGE eine 98 kDa Bande identifiziert, deren Abundanz mit der Enzymaktivität korrelierte. Durch proteolytischen Verdau dieses aus dem Gel eluierten Proteins wurden Peptidfragmente erhalten, welche mittels HPLC aufgetrennt und durch N-terminale Peptidsequenzierung analysiert wurden. Einige Peptide wiesen Ähnlichkeiten zu pflanzlichen Oxidasen auf, insbesondere zu Ascorbat-Oxidasen, die der Familie der Multi-Kupfer-Oxidasen zugeordnet werden (Yang *et al.*, 1986; Albani *et al.*, 1992; de Silva *et al.*, 1997). Ähnlichkeiten zu GP91<sup>phox</sup>-Homologen aus Pflanzen oder zu den Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus Säuger-Phagozyten wurden nicht gefunden. Immunopräzipitationsexperimente mit einem Anti-Peptid-Antiserum demonstrierten, daß die gemessene NADPH-Oxidaseaktivität im Eluat der Red-Sepharose-Farbstoff-Chromatographie spezifisch um maximal 38% der Ausgangsaktivität gehemmt wurde.

Als Voraussetzung für eine weitere funktionelle Charakterisierung der postulierten, neuartigen NADPH-Oxidase stand die Identifizierung und Charakterisierung der Gene, die für das aufgereinigte 98-kDa-Protein kodieren, im Mittelpunkt des folgenden Teiles dieser Arbeit.

#### 3.3.1. Isolierung der korrespondierenden cDNA-Klone *aoh1* und *aoh2*

Die Peptidsequenzen P98d: KFPGPVICVTTNNNVK und P98c: KASGPLPEPPQDQFDK (Tschöpe, 1999) bildeten die Grundlage für die Synthese degenerierter Primer, um mittels RT-PCR eine geeignete Sonde für das nachfolgende Screening einer Petersilie-cDNA Bank herzustellen. Da die Reihenfolge der Peptide innerhalb der Aminosäuresequenz nicht

bekannt war, wurden für beide Peptide sowohl degenerierte Sense-, als auch Antisense-Primer abgeleitet. Für die reverse Transkriptionsreaktion wurde 100 ng mRNA eingesetzt, als Primer wurde entweder ein Hexamer-Zufallsprimer oder ein genspezifischer Primer verwendet. Die anschließenden PCRs wurden bei einem Temperaturgradienten von 40°C-60°C (Annealingtemperatur) durchgeführt. Ein spezifisch gebildetes 0,8-kb-Produkt wurde kloniert und mehrere unabhängige Inserts wurden sequenziert. Dabei wurden zwei sehr ähnliche Sequenzen *faoh1* und *faoh2* (89% Identität untereinander) erhalten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen wiesen signifikante Homologien zu pollenspezifisch exprimierten Proteinen auf, die als Ascorbat-Oxidase-Homologe bezeichnet werden. Das Fragment *faoh1* (siehe Anhang) wurde als DIG-markierte Sonde für das Screening einer Petersilie-cDNA-Bank (2.3.11) eingesetzt. Die Eignung von *faoh1* als homologe Sonde wurde in einer Southern-Blot-Analyse untersucht. Unter wenig stringenten Hybridisierungs- und Waschbedingungen (Hybridisierungstemperatur 60°C; Waschbedingungen: 2xSSC, 0.1 %SDS, 58°C) wurden zahlreiche, definierte Banden detektiert (Daten nicht gezeigt). Unter Verwendung der Sonde *faoh1* wurden  $2,5 \times 10^5$  Phagen analysiert. Dabei wurden mehr als 100 hybridisierende Phagen identifiziert. Siebzig Phagen wurden nach der ersten Plattierungsrunde isoliert. Davon wurden 19 Phagen für die Gewinnung von Plasmiden durch *in vivo excision* ausgesucht. Nach zwei weiteren Plattierungsrunden wurden die Plasmide *pAOH1-19* (AOH, *ascorbate oxidase homolog*) erhalten, mittels Restriktionsanalyse und Hybridisierungsexperimenten analysiert und Plasmide mit unterschiedlichen Inserts zur Sequenzanalyse ausgewählt. Die erhaltenen Sequenzen ließen sich, entsprechend den PCR-Fragmenten *faoh1* und 2, zwei unterschiedlichen cDNA-Klonen *aoh1* und *aoh2* zuordnen. Für *aoh1* wurde ein Gesamtlängenklon isoliert. Die korrespondierende *aoh1*-cDNA kodiert für einen offenen Leserahmen mit 591 Aminosäuren. Im Fall von *aoh2* wurden mittels PCR unter Verwendung eines genspezifischen *aoh2*-Antisense- und eines vektorspezifischen Sense-Primers die isolierten rekombinanten Phagen gescreent und auf diese Weise ein Gesamtlängenklon *aoh2* mit einem kodierenden offenen Leserahmen von ebenfalls 591 Aminosäuren identifiziert (Tab.:15). Beide Gesamtlängenkclone wurden vollständig bidirektional sequenziert (Anhang 4 und 5).

**Tabelle 15: Charakterisierung der analysierten cDNA-Klone *aoh1* und *aoh2***

Bezeichnung des Plasmids	Länge der cDNA	abgeleitete Aminosäuresequenz
pAOH1	2103 bp	ORF AOH1: 591 Aminosäuren
pAOH2	2249 bp	ORF AOH2: 591 Aminosäuren

### 3.3.2 Analyse der *aoh*-cDNAs und Sequenzvergleiche

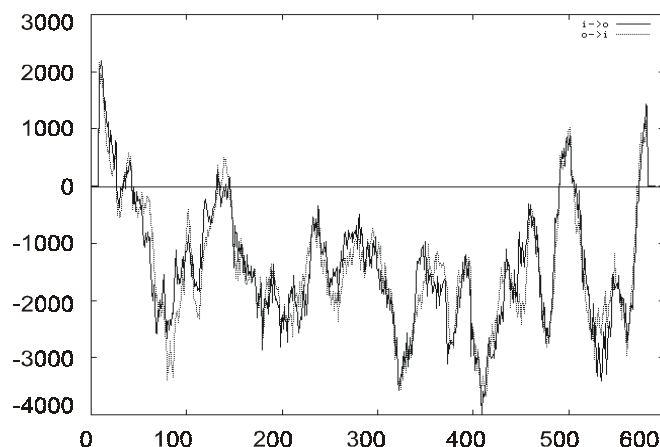
Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen AOH1 und AOH2 mit den Sequenzen der Peptidfragmente, die durch proteolytischen Verdau der putativen 98-kDa-NADPH-Oxidase erhalten wurden, ergab, daß alle Peptidsequenzen zugeordnet werden konnten. Einzelne Aminosäureaustausche waren auf nicht eindeutig interpretierbare Daten bei der Sequenzierung der Peptide zurückzuführen (T.Nürnberg, pers. Mitteilung). Der in der Abb. 18 dargestellte Vergleich zeigte, daß die sequenzierten Peptidfragmente P98a-f in der AOH2-Sequenz wiedergefunden wurden. Im Fall von AOH1 wurden drei Aminosäureaustausche gefunden. Wahrscheinlich war AOH1 nicht oder nur in geringer Menge im Vergleich zu AOH2 in der verwendeten Peptidfraktion vorhanden.

A)	P98a	1	KADFPK	6
	AOH1	413	KADFPS	419
	AOH2	413	KADFPK	419
B)	P98b	1	KGPITGPPK	9
	AOH1	419	SRPITGPPK	428
	AOH2	419	KGPITGPPK	428
C)	P98c	1	KASGPLPEPPQDQFDK	16
	AOH1	317	KASGPLPEAPQDQFDK	332
	AOH2	317	KASGPLPEPPQDQFDK	332
D)	P98d	1	KFPGPVIcVTNNNVK	16
	AOH1	54	KFPGPVINVTNNNVV	70
	AOH2	54	KFPGPVINVTNNNVK	70
E)	P98e	1	KTFAMNQA	8
	AOH1	332	KTFSMNQA	340
	AOH2	332	KTFSMNQA	340
F)	P98f1	1	KDLGRPDGVLID	12
	AOH1	184	KDLGMPDGVLIN	196
	AOH2	184	KDLGMPDGVLIN	196
G)	P98f2	1	KGPYMYcDTcVP	12
	AOH1	197	KGPYMYNDSLVP	209
	AOH2	197	KGPYMYNDTLVP	209

**Abb. 18: Vergleich der Peptidsequenzen des aus dem SDS-Gel isolierten 98-kDa-Proteins (Tschöpe, 1999) mit AOH1 und AOH2**

Auf Aminosäureebene weisen AOH1 und AOH2 92% Identität zueinander auf. Ein Vergleich mit bekannten Proteinen durch Datenbankabfragen mit Hilfe des Blastp-Algorithmus ergab, wie auch für die PCR-Fragmente *faoh1* und *faoh2*, sehr hohe Ähnlichkeiten mit Pollenspezifisch exprimierten Proteinen, die signifikante Homologien zu pflanzlichen Ascorbat-Oxidasen und Laccasen aufweisen. Diese Multi-Kupfer-Oxidasen, einschließlich der  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{O}_2$ -Oxidoreduktasen Ceruloplasmin (Yang *et al.*, 1986) und FET3 (Askwith *et al.*, 1994) katalysieren die Ein-Elektronen-Oxidation des Substrates in Verbindung mit der Reduktion von Sauerstoff, wobei Wasserstoffperoxid oder Wasser gebildet werden (Mc Guirl und Dooley, 1999). Ein Alignment von AOH1 und AOH2 mit einer Ascorbat-Oxidase aus Melone

(29% Identität) ist in der Abb. 20 dargestellt. Dabei ist besonders interessant, daß die Kupfer-Bindestelle (PROSITE: PDOC00076, PS00080) der Ascorbat-Oxidase in AOH1 und AOH2, wie auch in den Pollen-spezifisch exprimierten homologen Proteinen, nicht konserviert ist. Da die aufgereinigte NAD(P)H-Oxidaseaktivität mit NADPH von der Affinitätssäule eluiert wurde, (Tschöpe, 1999), sollten putative Bindestellen für NADPH vorhanden sein. Obwohl keine exakten Konsensussequenzen bekannt sind, wird das glycinreiche Bindemotif in jedem Fall von einer definierten Sekundärstruktur begleitet. Diese ist durch eine  $\beta$ -Faltblatt- $\alpha$ -Helix- $\beta$ -Faltblattstruktur charakterisiert (Rossmann, 1975; Bellamacina, 1996). Unter Beachtung dieser Strukturmerkmale konnten mögliche Kofaktorbindestellen nicht identifiziert werden. Der N-Terminus beider Polypeptide enthält putative Signalsequenzen zur Prozession in das Endoplasmatische Retikulum. Neben der hydrophoben Signalsequenz weisen nur zwei definierte Bereiche der C-Termini hydrophoben Charakter auf (Abb. 19). Computergestützte Analysen (PSORTI, DGPI, big-PI Predictor) weisen auf eine wahrscheinliche Lokalisation in der Plasmamembran über einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker) hin. Eine kovalente posttranslationale Modifikation mit GPI findet im Endoplasmatischen Retikulum statt, wo an den C-Terminus des Proteins nach dem Abspalten einer hydrophoben Signalsequenz das GPI-Grundgerüst gebunden wird.



**Abb.19: Mit dem TMPred-Programm erstellter Hydrophobizitätsplot von AOH1.**

Auf der unteren Skala ist die Anzahl der Aminosäuren angegeben. Auf der Y-Achse geben positive Werte putative membranüberspannende Domänen an.

PcAOH1	-----	MASFSSLSLL	FVCISMFLSY	SLAEDATIP-	YNFVVSYITA	39
PcAOH2	-----	MASFTFLSLL	FVYISLFLSY	SYAEDATVS-	YDFVVSYITA	39
CmAox4	MAKVADKPF	PKPFLVFFVL	SIFGFGITL	SEAGFPKIRH	YKWEVEYMF	50
PcAOH1	SPLGVPQQVI	AINGKFPGPV	INVTNNNVV	VNVKNKLD-E	ELLMTWAGVQ	88
PcAOH2	SPLGVPQQVI	AINGKFPGPV	INVTNNNVK	VNVKNKLD-E	DLLMTWDGVQ	88
CmAox4	SPDCVENIVM	GINGQFPGPT	IRANAGDMVV	VELTNKLHTE	GVVIHWHGIL	100
PcAOH1	QRRTSWQDGV	LG-TNCPIPP	KWNWTYNFQV	KDQIGSFFYF	PSLNFORASG	137
PcAOH2	QRRTSWQDGV	LG-TNCPIPP	KWNWTYNFQV	KDQIGSFFYF	PSLNFORASG	137
CmAox4	QRGTPWADGT	ASISQCAINP	GETFTYRFVV	-DKAGTYFYH	GHLGMQRASG	149
PcAOH1	GFGGIIINNR	AVIPFPDTP	HEDIPIMIGD	WYT-SNHTAL	RRTLNGG-KD	185
PcAOH2	GFGGIIINNR	EVIAIPFANP	DEDVPVMIGD	WYT-SNHTAL	RRTLNGG-KD	185
CmAox4	LYGSLIVDPQ	EGTSEPFHY-	DEEINLLSD	WWHQSVMKQE	VGLSSKPMRW	198
PcAOH1	LGMPDGVLIN	GKGPPY----	-RYNDSLVP-	-----DGIDY	LTIDVHPGKT	223
PcAOH2	LGMPDGVLIN	GKGPPY----	-RYNDTLVP-	-----EGIDY	ETIDVHPGKT	223
CmAox4	IGEPQSILIN	GRGQFDCSIA	AKYKNGLKQC	ELSGKEQCAP	FILHVPKKI	248
PcAOH1	YRLRVSNVGI	STSLNFRIQG	HNLLLAETEG	SYTVQQNYTS	LDIHVGQTSYS	273
PcAOH2	YRFRVSNVGI	STSLNFRIQN	HNLLLAETEG	SYTVQQNYTS	LDIHVGQTSYS	273
CmAox4	YRIRIASTTA	LASLNFAIGN	HKLLVVEADG	NYVQPFSTSD	IDIYSGESYS	298
PcAOH1	FLLTTDQNAS	TDYYIVASAR	FVNESVWRRV	TGVGILRYSN	SKGKASGPLP	323
PcAOH2	FLVTMDQNAS	TDYYIVASAR	FVNESVWRRV	TGVGILRYSN	SKGKASGPLP	323
CmAox4	VLLTTDQNP	ENYVWSIGVR	ARLPKTPPGL	TVLNYPNSV	SKLPISPPPE	348
PcAOH1	EAPQDQFDKT	FSMNQARSIR	WNVSASGARP	NPQGSFRYGS	INVTDVYVLR	373
PcAOH2	EPPQDQFDKT	FSMNQARSIR	WNVSASGARP	NPQGSFRYGS	INVTDVYVLR	373
CmAox4	TPDWEDFDRS	-----KNFT	FRIFAAMGSP	KPPVRYN---	---RRLFLN	386
PcAOH1	NKPPVTIDGK	RRTTLNGISF	VNPHTPIRLA	DRYKVKNVYK	ADFPSPR---	420
PcAOH2	NKPPVTIDGK	RRTTLNGISF	VNPHTPIRLA	DWFKVKNVYK	ADFPKGP---	420
CmAox4	TQN--RINGF	MKWAINNVSL	ALPPTPYLAA	MKFRLSTAFN	QNPPPETFPI	434
PcAOH1	---ITGPPKM	-ETKIINGTF	RGFM-----	IFQN-----	NDTKMQSYHM	456
PcAOH2	---ITGPPKM	-ETNIINGTF	RGFM-----	IFQN-----	NDTKMQSYHM	456
CmAox4	DYDINNPPRN	PETATNGVY	KFNMGETVDV	ILQANMLNA	NTSEIHPWHL	484
PcAOH1	DGYAFFVVG	DYGEWSEN	GT-YNKWDGI	ARATTQVFP	AWTAVLISLD	505
PcAOH2	DGYAFFVVG	DYGEWTNNS	GT-YNKWDGI	ARSTTQVFP	AWTAVLISLD	505
CmAox4	HGHDFWVLGY	GEGKFSAAED	GRKLNKNPP	LRNTTVIFPY	GWTAIRFVAD	534
PcAOH1	NVGIWNIRAE	NLDTWYLGQE	TYVKVNPPEP	TNKTELPIPE	NALFCGTL	555
PcAOH2	NVGIWNIRAE	NLDTWYLGQE	TYVKVNPPEP	TNKTELPIPD	NVLYCGAL	555
CmAox4	NPGVWAFHCH	IEPHLMGM-	---GVIFAEG	VHKVGM-IPP	NAMACG	579
PcAOH1	LQKPQDISSA	KSVTSTSKL	LFPLLVMVCA	FVSTFQ		591
PcAOH2	RQKPQDVSSA	TSVMSHESKI	FETLLVMVCA	FLSIFQ		591
CmAox4	IKNYPRKP--	-----	-----	-----		587

**Abb.20: Vergleich der abgeleiteten offenen Leserahmen der cDNA-Klone aoh1 und aoh2 mit der Aminosäuresequenz einer Ascorbat-Oxidase aus *Cucumis melo* (Acc.-Nr. AAF35911).**

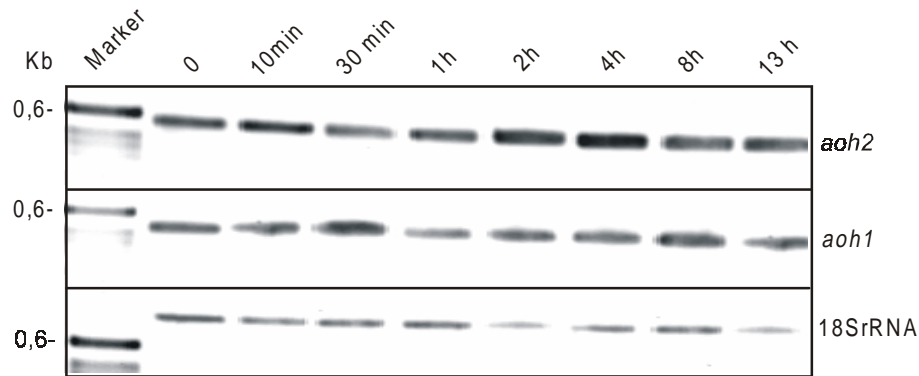
Identische Aminosäuren sind gelb unterlegt. Der rot unterlegte Bereich repräsentiert eine Kupfer-Bindedomäne (Messerschmidt und Huber, 1990), dabei sind die an der Bindung beteiligten Aminosäuren fett hervorgehoben. Die unterstrichenen Sequenzabschnitte stellen putative spaltbare N-terminale Signalpeptid dar. Der Pfeil zeigt die  $\omega$ -Schnittstelle für den GPI-Anker an, wo die Abspaltung der Signalsequenz erfolgt.

### 3.3.3 Expressionsanalyse der aoh1- und aoh2-Transkripte

Die Akkumulation von aoh-Transkripten nach Elicitorbehandlung mit Pep25 (50 nM) in Petersiliezellkulturen wurde mittels RT-PCR-Experimenten analysiert. Die in der Abbildung 21 dargestellten Ergebnisse der RT-PCR-Analyse zeigen, daß die aoh1- und aoh2-Transkriptmengen nach Elicitierung unverändert bleiben. Das aoh1-Transkript scheint im Vergleich zu aoh2 abundanter zu sein, da im Fall von aoh1 weniger Zyklen zur



Amplifizierung vergleichbarer Menge an PCR-Produkt notwendig waren. Für *aoh2* wurden 35 PCR-Zyklen durchgeführt und im Fall von *aoh1* wurden die amplifizierten Produkte nach 30 Zyklen analysiert. In Northern-Blot-Analysen wurden unter Verwendung von DIG-markierten Sonden, die den offenen Leserahmen von *aoh1* und *aoh2* repräsentieren, Transkripte mit einer Größe von etwa 2,1 kb detektiert (Daten nicht gezeigt).

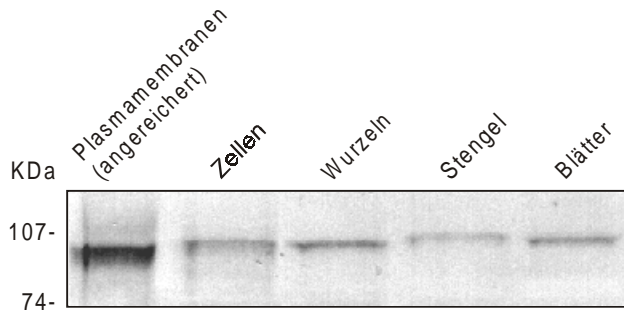


**Abb. 21: RT-PCR-Analyse der *aoh1*- und *aoh2*-Transkriptakkumulation nach Elicitorbehandlung.**

Petersiliezellkulturen wurden für die angegebenen Zeiträume mit Pep 25 (50nM) behandelt (n=2). Als interne Kontrolle wurde ein 780-bp-Fragment aus 18S rRNA amplifiziert. In Kontrollansätzen ohne die reverse Transkriptasereaktion wurde kein Produkt erhalten.

### 3.3.4 Gewebespezifische Expressionsanalyse der AOH-Proteine

Um die Expression der Petersilie-AOH-Proteine zu charakterisieren, stand ein Anti-Peptidantikörper P112 zur Verfügung. Die spezifische Reaktion dieses Antikörpers mit einem 98-kDa-Protein aus der mikrosomalen Fraktion von Petersiliezellen wurde bereits nachgewiesen (Tschöpe, 1999). Aufgrund der hohen Homologie der Peptidsequenzen von AOH1 und AOH2 in dem Sequenzabschnitt [Abb. 18 C)], gegen den das Antiserum generiert wurde, kann man mit dem Antiserum P112 nicht zwischen den beiden Homologen AOH1 und AOH2 diskriminieren. Aufgrund des Aminosäureaustauschs P325A in AOH1 [Abb.: 18 C)] läßt sich auch nicht ausschließen, daß das Petidantiserum P112 nur AOH2 erkennt. Petersilie-Proteinextrakte aus Blättern, Wurzel und Stengel wurden in Western-Blot-Analysen getestet. In den untersuchten Geweben wurde ein Protein mit einem apparenten Molekulargewicht von 98 kDa erkannt (Abb. 22), die geringen Größenunterschiede der detektierten Banden können nicht erklärt werden. Von besonderem Interesse hinsichtlich der funktionellen Charakterisierung der AOH-Proteine ist ihre subzelluläre Lokalisierung, da ihre vermutete Funktion die Intergration in die Plasmamembran voraussetzt. In einer etwa 3fach angereicherten Plasmamembranfraktion wurde eine vielfach stärkere Bande als in den anderen Proteinextrakten detektiert (Abb. 22), was auf die Lokalisation der AOH-Proteine in der Plasmamembran hindeuten könnte.



**Abb.22: Gewebespezifische Expressionsanalyse von AOH1/2 mittels Western-Analyse unter Verwendung des Anti-Peptidantiserums P112.**

In jeder Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen, im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebloftet. Nach Inkubation mit dem Anti-Peptidantikörper P112 und mit Alkalischer Phosphatase gekoppeltem sekundären Antikörper erfolgte die Detektion mittels NBT/BCIP. Die Größen der Markerproteine sind links angegeben. Die Plasmamembranen wurden aus Petersiliezellen präpariert und sind etwa 3fach angereichert im Verhältnis zur mikrosomalen Fraktion. Der Blot wurde mir freundlicherweise von M. Krzymowska zur Verfügung gestellt.

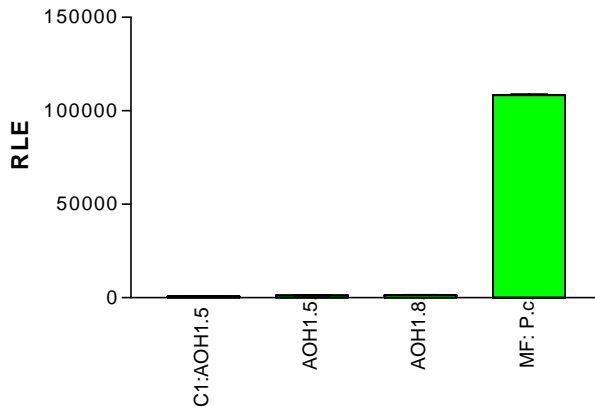
### 3.3.5 Heterologe Expression von AOH1 in NIH-3T3 Zellen und in Zellen der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

Die *aoh1*-cDNA enthielt den vollständigen offenen Leserahmen von AOH1. Durch heterologe Expression in zwei eukaryotischen Expressionssystemen sollte das rekombinante Protein hinsichtlich seiner vermuteten NADPH-Oxidaseaktivität untersucht werden. Die mittels PCR amplifizierte *aoh1*-cDNA wurde in den Hefe-Expressionsvektor pYES2.1/V5-His-TOPO und den Expressionsvektor pEF6/V6-His-TOPO kloniert (siehe auch 3.2.4/5). Die Konstrukte pYESTOPO-*aoh1.5* und pEF6-*aoh1.9* wurden durch Sequenzierung und Vergleich mit der *aoh1*-cDNA Sequenz überprüft.

Die Transfektion der NIH-3T3 Zellen mit dem Expressionsplasmid pEF6-*aoh1.9* erfolgte gleichzeitig mit den unter 3.2.4 beschriebenen Transfektionsexperimenten von pEF6-*rboh1* und pEF6-*rboh2*. Im Gegensatz zu den rekombinanten pEF-RBOH1- und pEF-RBOH2-Proteinen konnte für AOH1.9 in den durchgeführten Western-Blot-Analysen kein Expressionsprodukt detektiert werden. In den mit pEF6-*aoh1.9* transfizierten Zellen wurden in Enzymaktivitätsmessungen keine erhöhte  $O_2^-$ -Produktion detektiert (nicht gezeigt).

Die heterologe Expression von AOH1 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurde wie unter 3.2.5 beschrieben durchgeführt. Dabei konnte das heterologe Expressionsprodukt in Western- und Dot-Blot-Analysen in der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen werden. Die Größe der dabei detektierten Bande beträgt etwa 95-98 kDa, so daß das apparente Molekulargewicht des rekombinanten Proteins pYESTOPO-AOH1.5 mit 90-93 kDa angegeben werden kann (Daten nicht gezeigt). Das Expressionsniveau von pYESTOPO-AOH1.5 in der Hefe ist sehr gering. Obwohl der Nachweis der heterolog exprimierten Proteine mittels Chemilumineszenz sehr empfindlich ist, wird nach zweiminütiger Expositionszeit des Filmes nur eine schwache Bande sichtbar. Mikrosomale Fraktionen transgener Hefen wurden in Enzymaktivitätsmessungen auf  $O_2^-$ -Bildung untersucht (Abb.

23). Es wurden keine signifikanten Enzymaktivitäten gefunden, wobei als Ursache dafür, neben dem äußerst geringen Expressionsniveau, vor allem das Fehlen von Kofaktoren oder weiteren Untereinheiten möglich ist.



**Abb. 23: Messung der  $O_2^-$ -Produktion in den mikrosomalen Fraktionen von Hefen, die mit den Expressionsplasmiden pYESTOPO-*aoh1.5* und 8 transformiert wurden.**

C1:AOH1.5. repräsentiert die  $O_2^-$ -Produktion, die in Kontrollextrakten gemessen wurde. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte durch Messung der  $O_2^-$ -Produktion mittels des Lucigenin-Assays. Es wurden jeweils 5  $\mu$ l (25  $\mu$ g) der mikrosomalen Fraktion in einer Enzymaktivitätsmessung eingesetzt, als positive Kontrolle wurden die RLE nach Zugabe von 5  $\mu$ l (37,5  $\mu$ g) Petersiliemikrosomen ermittelt (entspricht 110 000 RLE).

### 3.3.6 Stabile Transformation von Petersiliezellen mit *aoh1*-Antisense-Konstrukten

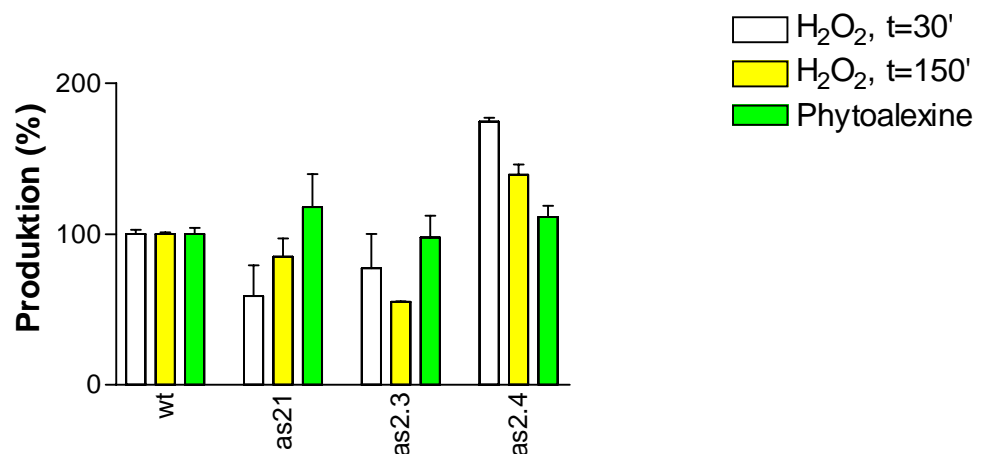
Da die heterologe Expression von AOH1 keinen Aufschluß über eine mögliche Enzymaktivität der putativen 98-kDa-NADPH-Oxidase ergab, sollten Untersuchungen mit stabil transformierten Petersiliezellkulturen, in denen die Akkumulation der AOH-Proteine supprimiert war, Hinweise über die Rolle dieser Proteine innerhalb der Elicitorsignalkette liefern. Der offene Leserahmen *aoh1* wurde in den binären Vektor pBIB-PFF19 kloniert und Petersiliezellen mit dem *aoh1*-Antisense-Konstrukt transformiert (vgl. 2.2.4). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von *aoh1* und *aoh2* wurde davon ausgegangen, daß in einem Antisense-Ansatz die Expression beider Gene unterdrückt wird. Nach 5-6 Wochen wurden 28 hygromycinresistente Kalli isoliert und mittels Western-Blot-Analyse und RT-PCR analysiert. Davon zeigten 7 transgene Kalli stark reduziertes und zwei Kalli reduziertes Expressionsniveau auf RNA- und Proteinebene (Tab. 16). Bis auf die transgenen Linien *aoh1*-as21, *aoh1*-as2.3 und *aoh1*-as2.4 konnte keine dieser Linien weiter charakterisiert werden, da zu geringes oder kein Wachstum zu verzeichnen war. Der gleiche, vermutlich letale Phenotyp wurde später beobachtet, als Arabidopsis-Pflanzen mit *aoh1*-Antisensekonstrukten transformiert wurden (M. Krzymowska, pers. Mitteilung). In Elicitierungsexperimenten wurde die  $H_2O_2$ -Produktion und die Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium der transgenen Zellkulturen im Vergleich zum Wildtyp untersucht (Abb. 24). Die gemessenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen im Medium der transgenen Zellkulturen *aoh1*-as21 und *aoh1*-as2.3 war um 30-45% verringert, aber bezüglich der Phytoalexinbiosynthese konnten keine Unterschiede im Vergleich zu den nichttransgenen Zellkulturen festgestellt

werden. Die Zellkultur aoh1-as2.4 zeigte keine Beeinträchtigung der Elicitorresponsivität, sowohl die  $H_2O_2$ -Produktion, als auch die Phytoalexinakkumulation waren, im Vergleich zum Wildtyp, nicht reduziert.

**Tabelle 16: Analyse der aoh1-Antisense-Linien.**

Die verwendeten Symbole repräsentieren folgende Bedeutungen 1) – kein Transkript nachgewiesen, 2) + geringe Transkriptakkumulation/Proteinexpression im Vergleich zum Wildtyp [+++++] 3) n.a. nicht analysiert 4) Wachstum der Zellen wurde auf einer Skala von 1-5 eingeordnet [1: sehr gut, 2: gut, 5: kein Wachstum]

<i>aoh1</i> -Antisense-Linie	RT-PCR ( <i>aoh1</i> )	RT-PCR ( <i>aoh2</i> )	Western-Blot-Analyse	Wachstum
3.1	-	-	n.a.	5
3.3	-	+	n.a.	5
3.5	-	+	n.a.	5
3.11	-	+	n.a.	5
4.7	-	+	n.a.	5
28	-	+	-	5
21	-	+	-	2
2.3	+	+	+	2
2.4	+	+	-	2
wt	+++++	+++++	+++++	2



**Abb. 24: Charakterisierung der transgenen aoh1-Antisense-Kulturen im Vergleich zur nichttransgenen Petersiliezellkultur.**

Es wurde die  $H_2O_2$ -Produktion (t=30 min, 150min) und die Phytoalexinakkumulation nach Elicitorbehandlung gemessen (n=2).

## 4. Diskussion

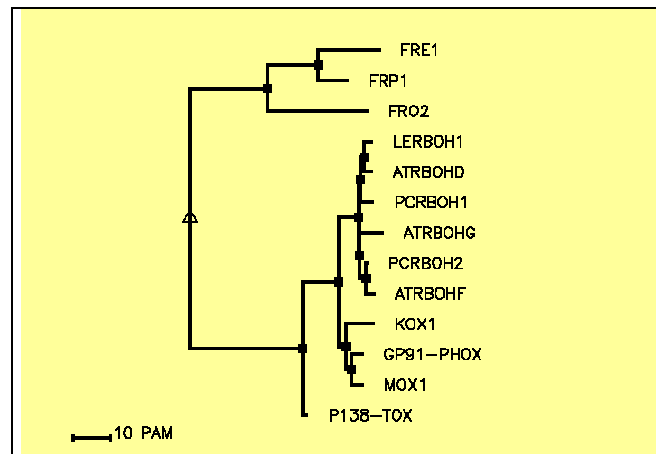
Die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies stellt eine zentrale Komponente sowohl der unspezifischen Abwehr in Säugetieren (*respiratory burst*) als auch der pflanzlichen Pathogenabwehr (*oxidative burst*) dar. Innerhalb der tierischen Immunabwehr katalysiert eine plasmamembrangebundene NADPH-Oxidase aus Phagozyten die massive und transiente Produktion von Superoxidanionen. Die molekularen Mechanismen der Entstehung der ROS in Pflanzen hingegen sind noch nicht aufgeklärt, aber eine Reihe von Arbeiten weist bereits auf Ähnlichkeiten mit dem *respiratory burst* in Säugetieren hin (Dwyer *et al.*, 1996; Lamb und Dixon, *et al.*, 1997). So konnten Signaltransduktionselemente, die in tierischen Systemen beschrieben wurden, auch in Pflanzen identifiziert werden.

Die Suche nach und die molekularbiologische Charakterisierung von pflanzlichen Homologen der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, GP91<sup>phox</sup>, stellte die Basis für eine funktionelle Analyse dieser Proteine durch heterologe Expression in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* dar. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die NAD(P)H-abhängige O<sub>2</sub><sup>-</sup>-Produktion, katalysiert durch pflanzliche GP91<sup>phox</sup>-Homologe in einem heterologen System nachgewiesen werden. Mit diesen Daten wurde somit zum ersten Mal eine funktionelle Verbindung zwischen GP91<sup>phox</sup>-Homologen aus Pflanzen und einer von vielen Arbeitsgruppen postulierten NADPH-Oxidaseaktivität dieser Enzyme hergestellt.

### 4.1. Isolierung und Charakterisierung von *rboh1* und *rboh2*

#### 4.1.1. Sequenzvergleiche

Durch das Screening einer Petersilie-cDNA-Bank mit einer heterologen Sonde wurden zwei cDNA-Klone *rboh1* und *rboh2* identifiziert. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben zahlreiche strukturelle Ähnlichkeiten mit GP91<sup>phox</sup> (vgl. 3.1.4) und erlaubten die gemeinsame Zuordnung in eine Multi-Enzymfamilie. Die abgeleiteten Polypeptidsequenzen RBOH1 und RBOH2 weisen nur 30% Identität zu GP91<sup>phox</sup> auf. Der relativ geringe Grad an Übereinstimmung wird auch für andere Proteine dieser Multi-Enzymfamilie beobachtet. Beispielsweise weist das GP91<sup>phox</sup>-Homologe Renox aus der Maus (Geiszt *et al.*, 2000) nur 39% Identität mit GP91<sup>phox</sup> auf, obgleich die Größe der beiden Polypeptide mit 578 bzw. 570 Aminosäuren fast übereinstimmt. Die Fe-Reduktasen FRE1 und FRE2 aus *Saccharomyces cerevisiae* und FRP1 aus *Schizosaccharomyces pombe* weisen nur etwa 25 % Identität untereinander auf (Martins *et al.*, 1998, Roman *et al.*, 1993). Die Darstellung eines phylogentischen Stammbaumes (Abb. 25) soll den Grad der Verwandtschaft verschiedener GP91<sup>phox</sup>-homologer Proteine mit unterschiedlichen putativen Funktionen aufzeigen. Dabei fallen die Fe-Reduktasen aus Hefe und die Fe-Chelatreduktasen aus Arabidopsis in eine von den NADPH-Oxidasen distinkte Klasse.



**Abb. 25: Phylogenetischer Stammbaum von putativen NADPH-Oxidasen und Fe-Reduktasen.**

Das Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurde mit Hilfe des ClustalW-Programmes erstellt. Die verwendeten Bezeichnungen für die Proteinennamen sind dabei folgenden *Accession*-Nummern zuzuordnen: FRE1: *Saccharomyces cerevisiae*, S30075 (Dancis *et al.*, 1992); FRP1: *Schizosaccharomyces pombe*, A48141 (Roman *et al.*, 1993); FRO2: *Arabidopsis thaliana*, CAA70770 (Robinson *et al.*, 1999); LeRBOH1: *Lycopersicon esculentum*, AAF73124; AtRBOHD: *Arabidopsis thaliana*, AF08822 (Groom *et al.*, 1997); AtRBOHG: *Arabidopsis thaliana*, AL096822; AtRBOHF: *Arabidopsis thaliana*, BAA28953 (Groom *et al.*, 1997); KOX1: *Homo sapiens*, AAF 87572 (Geiszt *et al.*, 2000); GP91-PHOX: *Homo sapiens*, S70773 (Royer-Pokorka *et al.*, 1986); MOX1: *Homo sapiens*, Q9Y5S8 (Suh *et al.*, 1999); P138-TOX: *Homo sapiens*, NP\_054799 (Dupuy *et al.*, 1999), ist identisch mit ThOX2 (De Deken *et al.*, 2000)

Hinsichtlich eines Vergleiches der genomischen Organisation zwischen *gp91<sup>phox</sup>* und *Atrbohhd*, erscheint es interessant, daß die Positionen des 6. und 7. Introns mit Position 7 und 8 des humanen *gp91<sup>phox</sup>* übereinstimmen, da dies auf eine evolutionäre Verwandtschaft der Gene hindeutet (Groom *et al.*, 1996; Skalnik *et al.*, 1991).

#### 4.1.2 Ähnlichkeiten und Unterschiede zum NADPH-Oxidase-Komplex aus Phagozyten

Welche Hinweise sprechen für die Existenz eines strukturell homologen, multimeren NADPH-Oxidase-Komplexes in Pflanzen? Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen sprechen gegen die Hypothese, daß in Pflanzen ein dem humanen Enzym ähnlicher, multimerer NADPH-Oxidase-Komplex existiert. Unter Verwendung von Antiseren gegen die GP91<sup>phox</sup>-, p67<sup>phox</sup>- und p47<sup>phox</sup>-Untereinheit wurden mikrosomale und cytosolische Fraktionen aus Petersiliezellkulturen untersucht. Dabei konnten keine spezifischen Signale der zu erwartenden Größe in der entsprechenden Fraktion detektiert werden (Tschöpe, 1999). Die Expressionsklonierung von in Soja detektierten Proteinen, die spezifisch mit den Antikörpern gegen die humanen Untereinheiten der NADPH-Oxidase interagierten, führte zur Identifizierung von Proteinen, deren Polypeptidsequenzen keine Homologien zu den korrespondierenden Untereinheiten der NADPH-Oxidase aufwiesen, aber signifikante Ähnlichkeiten zu Proteinen mit anderen physiologischen Funktionen (Tenhaken und Thulke, 1996; Tenhaken und Rübel, 1998). Aufschlußreich erscheint die Tatsache, daß innerhalb der Sequenzierprojekte, in deren Rahmen z.B. das Genom von *Arabidopsis thaliana* bereits vollständig sequenziert wurde (The Arabidopsis Genome Initiative, Nature,

2000), keine pflanzlichen Homologen der cytosolischen Untereinheiten p67<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, und p40<sup>phox</sup> identifiziert werden konnten.

In einigen Pflanzenspezies wie Soja und Arabidopsis wurden unter Verwendung von Antiseren, die gegen die cytosolischen Untereinheiten p47<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> gerichtet waren, Kreuzreaktionen mit pflanzlichen Proteinen in den zu erwartenden Größenbereichen detektiert (Dwyer et al., 1996; Tenhaken et al., 1995; Desikan et al., 1996). In Tomate wurde in Western-Blot-Analysen, unter Verwendung von Anti-p47<sup>phox</sup>- und Anti-p67<sup>phox</sup>-Antiseren, nach Infektion mit einer avirulenten Rasse des Pathogens *Cladosporium fulvum* steigende Signalintensitäten der korrespondierenden Banden in der Plasmamembran detektiert, die mit steigender O<sub>2</sub><sup>-</sup> Produktion einherging (Xing et al., 1997). Da keine dieser detektierten Proteine kloniert wurde, ist im Kontext mit den oben beschriebenen Arbeiten, die Relevanz dieser Daten fragwürdig.

Neben den cytosolischen Untereinheiten sind noch sogenannte kleine GTP-bindende Proteine Rac1, Rac2 und Rap1A an der Aktivierung der NADPH-Oxidase aus Phagozyten beteiligt (Henderson und Chappell, 1996; Gorzalczanky et al., 2000; Ambruso et al., 2000). Einige Rac2-Homologe aus Pflanzen wurden isoliert, charakterisiert und eine mögliche Rolle bei der Auslösung des *oxidative burst* und der HR innerhalb von inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen postuliert (Kieffer et al., 1997; Xing et al., 1997; Kawasaki et al., 1999; Schiene et al., 2000). In transgenen Reis-Zellsuspensionkulturen und -Pflanzen wurde der Einfluß der Überexpression konstitutiv aktiver (Rac G19V) und dominant negativer Formen (Rac T24N) des Reis-Homologen OsRac1 unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors untersucht (Kawasaki et al., 1999). Die Expression von OsRac1-G19V induziert die Produktion von ROS und die Auslösung von Zelltod in Reis-Zellkulturen und in den Blättern von Reispflanzen. Experimente mit der dominant negativen Form (Rac T24N) zeigten, daß sowohl der durch den Protein-Phosphatase-Inhibitor Calyculin induzierte *oxidative burst*, als auch die Läsionsbildung in transgenen *sl*-Mutanten (*sl*: *Sekiguchi lesion*) inhibiert waren. (Kawasaki et al., 1999). In Soja wurde der Einfluß einer dominant negativen Form (RacN17) und einer konstitutiv aktiven Form (RacV12) durch transiente Expression in Zellkulturen getestet (Park et al., 2000). Nach Applikation verschiedener Elicitoren wie Harpin und Oligogalakturonsäure wurden in den mit RacV12-transformierten Zellen weitaus höhere ROS-Konzentrationen gemessen als in nichttransformierten Zellen. Parallel dazu war die Produktion von ROS in den Zellen geringer, die die dominant negative Form Rac N17 exprimierten (Park et al., 2000). An welcher Stelle der Signaltransduktionsketten die pflanzlichen Rac-Homologen eingreifen, oder ob sie direkt an der Regulation einer NADPH-Oxidase beteiligt sind, muß in zukünftigen Experimenten noch untersucht werden.

#### 4.1.3 Neue humane GP91<sup>phox</sup>-Homologe

In Tieren wird der Produktion von ROS neben ihrer klar definierten, antibiotischen Wirkung in den Phagozyten eine spezifische Rolle bei Signaltransduktionsprozessen, zugeschrieben. Zum Beispiel wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an

Rezeptoren die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Aktivierung nachfolgender Signaltransduktionskomponenten einschließlich einer p42/p44 MAPK-Kaskade und Thyrosinphosphorylierungsreaktionen induziert (Sundaresan *et al.*, 1995; Bae *et al.*, 1999). Durch Sequenzvergleiche von GP91<sup>phox</sup> mit humanen EST-Datenbanken wurden einige GP91<sup>phox</sup>-Homologe in spezialisierten, nichtphagozytischen Zellen identifiziert und funktionell charakterisiert.

MOX1 wird vor allem im Dickdarm exprimiert und nach Überexpression von MOX1 in NIH-3T3 Fibroblastenzellen wurde gesteigerte Produktion von ROS und erhöhte mitogene Aktivität nachgewiesen. Die dabei gebildete Menge an ROS betrug 5-10% im Vergleich zur Menge, die durch den aktivierten NADPH-Oxidase-Komplex aus Phagozyten produziert wird (Suh *et al.*, 1999). In Ras-transfektierten Fibroblastenzellen korrelierte die steigende ROS-Produktion ebenfalls mit Teilungsrate der Zellen (Irani *et al.*, 1997, Lee *et al.*, 1999). Die durch den Wachstumsfaktor PDGF induzierte Zellteilung in Muskelzellen geht mit einer Verdopplung der *mox1*-Transkriptmenge einher (Suh *et al.*, 1999). Diese Daten lassen vermuten, daß MOX1 eine Rolle bei der Wachstumsregulation und Differenzierung spielt (Suh *et al.*, 1999). Ein verkürztes, durch alternatives *splicing* des *mox1*-Transkriptes gebildetes Protein, NOH-1, wurde kürzlich identifiziert. Das Protein besteht aus 191 Aminosäuren, enthält vier transmembrane Domänen und wird als funktioneller Protonenkanal beschrieben (Banfi *et al.*, 2000). NIH-3T3 Fibroblastenzellen, die mit dem aus der Niere isolierten *gp91*<sup>phox</sup>-Homologen KOX1 transfektiert wurden, zeigten erhöhte ROS-Produktion, aus der ein seneszenten Phänotyp auf zellulärer Ebene resultierte (Geiszt *et al.*, 2000). Eine Funktion z.B. bei der Regulation von sauerstoffabhängiger Genexpression durch den redoxregulierten Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$  wurde postuliert (Ebert und Bunn, 1999). Der C-Terminus der Thyroid-Oxidase P138<sup>TOX</sup> weist Homologien zu GP91<sup>phox</sup> und MOX1 auf, der N-Terminus enthält interessanterweise zwei putative Ca<sup>2+</sup>-Bindedomänen (EF-Hand-Motive) und homologe Bereiche zu Peroxidasen (Dupuy *et al.*, 1999; De Deken *et al.*, 2000). Das aus dem Primärprodukt O<sub>2</sub><sup>-</sup> gebildete H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist als Substrat am letzten Schritt der Biosynthese des Schilddrüsenhormons beteiligt, der durch die Thyroperoxidase katalysiert wird (Nakamura *et al.*, 1989).

Aufgrund der Zytotoxizität der ROS und ihrer Beteiligung an essentiellen, zellulären Prozessen wäre vorstellbar, daß die Kompartimentierung der Untereinheiten des humanen NADPH-Oxidase-Komplexes einen Regulationsmechanismus darstellt, der die Zelle vor den Reaktionsprodukten eines unkontrolliert aktiven Enzyms schützt. Eine Reihe jüngerer Arbeiten zeigte, daß die cytosolischen Untereinheiten nicht, wie früher angenommen, an der Redoxreaktion oder Substratbindung beteiligt sind. So ist die NADPH-Oxidaseaktivität unabhängig von der cytosolischen Unterheit P47<sup>phox</sup>. In einem zellfreien Reaktionsansatz kann die Enzymaktivität, in Abwesenheit von P47<sup>phox</sup>, durch Zugabe des Flavocytochrom b<sub>558</sub> und hohe Konzentrationen an P67<sup>phox</sup> und Rac rekonstituiert werden. Durch die Anwesenheit der P47<sup>phox</sup>-Untereinheit wird lediglich die Affinität von P67<sup>phox</sup> und Rac2 zur Bildung des Oxidasekomplexes um zwei Größenordnungen erhöht (Freeman und Lambeth, 1996). Cross *et al.* (1999) wiesen nach, daß der Assemblierungsprozeß, der zur Bildung des aktiven NADPH-Oxidase-Komplexes führt, vor allem katalytischen Charakter aufweist.



Der Mechanismus der Aktivierung erfolgt nicht über die Bildung eines stöchiometrischen Komplexes (Cross *et al.*, 1999). Die Biosynthese des heterodimeren Flavocytochroms  $b_{558}$  wurde detailliert untersucht und zeigte, daß die  $p22^{\text{phox}}$ -Untereinheit für die Expression der katalytischen Untereinheit  $GP91^{\text{phox}}$  nicht erforderlich ist. Kotransformationsexperimente demonstrierten lediglich eine erhöhte Abundanz von  $GP91^{\text{phox}}$  in Anwesenheit der  $P22^{\text{phox}}$ -Untereinheit (Yu *et al.*, 1997, Yu *et al.*, 1999). Koshkin und Pick (1994) beobachteten im zellfreien Reaktionsansatz  $O_2^-$ -Produktion in Anwesenheit des Flavocytochrom  $b_{558}$  und Abwesenheit der anderen Untereinheiten. Aminosäuren, bei denen die Aminosäureaustausche dazu führen, daß die Translokation der cytosolischen Komponenten  $P67^{\text{phox}}$ ,  $P47^{\text{phox}}$ , Rac1 und Rac2 zum aktiven Komplex inhibiert wird (Biberstine-Kinkade, *et al.*, 1999), sind in Mox1 und den RBOH-Proteinen nicht konserviert.

Die Ähnlichkeiten zwischen  $GP91^{\text{phox}}$  und  $GP91^{\text{phox}}$ -Homologen aus Pflanzen und Tieren deuten auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und damit auf eine funktionelle Verwandtschaft hin. Die hier aufgezeigten Daten zeigen, daß die katalytische Untereinheit  $GP91^{\text{phox}}$  und homologe Proteine ohne Rekrutierung cytosolischer Untereinheiten funktionell sind und ließen den Ansatz der heterologen Expression der RBOH-Proteine sinnvoll erscheinen.

## **4.2 Heterologe Expression von *rboh1* und *rboh2* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

### **4.2.1 Nachweis der NAD(P)H-Oxidaseaktivität der rekombinanten Proteine RBOH1 und RBOH2**

In den vergangenen Jahren führte die heterologe Expression von pflanzlichen Proteinen in Hefen oder die Komplementation von Hefemutanten mit pflanzlichen cDNAs zur erfolgreichen funktionellen Charakterisierung von zahlreichen pflanzlichen Proteinen. Dabei haben sich die in Hefen gemessenen Daten oftmals als physiologisch sinnvoll erwiesen und ließen sich mit den in Pflanzen gemessenen Daten vergleichen (Minet *et al.*, 1992; Sentenac *et al.*, 1992; Weise *et al.*, 2000).

Die Expressionsversuche in dem heterologen System *Saccharomyces cerevisiae* erwiesen sich zunächst als schwierig. Unter Verwendung des routinemäßig eingesetzten Expressionsvektors pYES.2 konnte die Bildung von rekombinanten Proteinen nicht nachgewiesen werden. Erst durch das Einfügen einer Kozak-Sequenz zur Erhöhung der Translationseffizienz und den Einsatz eines Vektors, der ein V5-Epitop-Tag besitzt, gelang es, nach Induktion der Proteinbiosynthese, die Expressionsprodukte nachzuweisen. Die Expression der rekombinanten Proteine RBOH1 und RBOH2 konnte durch Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden. Der Vergleich der theoretisch berechneten Molekulargewichte mit den apparenten Molekulargewichten zeigte, daß beide Proteine in Hefe scheinbar nicht durch N-Glycosylierungsreaktionen posttranslational modifiziert werden. Die Messung der NAD(P)H-abhängigen  $O_2^-$ -Produktion in den transgenen

Hefezellkulturen ergab durch das Auftreten von Hintergrundaktivität keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu Kontrollzellkulturen. Erst in mikrosomalen Fraktionen, in denen die Expression der rekombinanten Proteine RBOH1.10 und RBOH2.5 nachgewiesen wurde, konnte die Hintergrundaktivität minimiert und NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion detektiert werden.

#### 4.2.2 NAD(P)H-Oxidaseaktivität des rekombinanten RBOH1.10-Proteins ist $Ca^{2+}$ -abhängig

Interessanterweise war die NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion in RBOH2.5-Mikrosomen unabhängig von der Anwesenheit von  $Ca^{2+}$ , denn der Extraktionspuffer I, der zur Präparation der Hefemikrosomen (modifiziert nach Tschöpe, 1999) eingesetzt wurde, enthielt 10 mM EDTA. Unter diesen Bedingungen wurde in RBOH1.10-Mikrosomen, trotz der gut nachweisbaren Synthese des rekombinanten Proteins keine NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion detektiert. Erst unter Verwendung eines Extraktionspuffers der neben 2mM EDTA noch 5mM  $CaCl_2$  enthielt, wurde auch in RBOH1.10-Mikrosomen NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion festgestellt. Die RBOH1-Polypeptidsequenz enthält im Unterschied zum kürzeren RBOH2 mindestens ein  $Ca^{2+}$ -bindendes EF-Hand Motiv (vgl. 3.1.4). Die Aminosäuresequenz des Arabidopsis-Homologen AtRBOHF weist im N-Terminus zwei EF-Handmotive auf, wobei das zweite Motiv nur gering mit der kanonischen Konsensussequenz (Kretsinger, 1996) übereinstimmt. Synthetisierte Peptide, die diese beiden Sequenzen überspannen, binden  $^{45}Ca^{2+}$ . Dabei war das autoradiographisch detektierte Signal des zweiten Motivs um ein Vielfaches geringer und auch eine Negativkontrolle erzeugte ein Hintergrundsignal (Keller *et al.*, 1998). Die Situation im Fall von RBOH1 ist ähnlich. Das Motiv  $_{232}DKDADGRITQDEV_{244}$  stimmt mit der Konsensussequenz überein, aber die Zuordnung eines zweiten Motivs erscheint wegen der erheblichen Abweichungen von der Konsensussequenz zweifelhaft. Obwohl die Mehrzahl der  $Ca^{2+}$ -bindenden Enzyme geradzahlige EF-Hand-Motive enthält, gibt es Ausnahmen von dieser Regel. So enthalten die humane FAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase, Osteonectin und eine Myosin-Untereinheit nur ein EF-Hand-Bindemotiv (PROSITE). Die Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem  $Ca^{2+}$  an AtRBOHF-Peptiden implizieren die Existenz eines möglichen Mechanismus für die direkte Regulation der RBOH-Proteine durch  $Ca^{2+}$ . Auch die NADPH-Oxidaseaktivität des P138<sup>tox</sup>-Enzyms wird durch die Anwesenheit von 0,2  $\mu$ M  $Ca^{2+}$ -Ionen aktiviert (Nakamura, 1987). Da die zelluläre Verteilung von  $Ca^{2+}$  stark kompartimentiert ist, könnte dies ein Regulationsmechanismus für lokal beschränkte oder spezialisierte Produktion von ROS an erforderlicher Stelle sein (Bestwick *et al.*, 1997).

Der *oxidative burst* und andere Abwehrreaktionen liegen unterhalb des transienten Anstiegs der cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration (Levine *et al.*, 1996; Piedras *et al.*, 1998; Blume *et al.*, 2000). Über die  $Ca^{2+}$ -Bindestelle könnte RBOH1 eine aktive Konformation einnehmen und für den schon nach zwei Minuten einsetzenden Anstieg der ROS-Konzentration verantwortlich sein. Der induzierte Anstieg der *rboh2*-Transkriptmenge nach Elicitierung würde in die zweite, langandauernde Phase des *oxidative burst* involviert sein.

In Plasmamembranen, die aus infizierten Kartoffelknollen präpariert wurden, detektierten Doke und Miura (1995) eine induzierbare NADPH-Oxidaseaktivität, die nicht  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig war. Die  $\text{O}_2^-$ -Produktion wurde nur nach Infektion mit einer avirulenten Rasse des Pathogens *Phytophthora infestans* detektiert. In Plasmamembranfraktionen, die aus nicht behandelten oder aus mit einer virulenten Rasse von *Phytophthora infestans* inokulierten Kartoffelknollen gewonnen wurden, konnte diese induzierbare NADPH-Oxidaseaktivität nicht gefunden werden. Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Unabhängigkeit der enzymatischen Aktivität wurde auch für RBOH2 gezeigt (vgl. 3.2.5.1).

#### 4.2.3 Enzymkinetische Eigenschaften

Durch die Charakterisierung der Enzymaktivität von RBOH1.10 und RBOH2.5 sollte ein Vergleich mit in anderen Systemen ermittelten Parametern ermöglicht werden. Die Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Konzentration der Elektronendonatoren NADPH und NADH wurde anhand der Auftragung nach Lineweaver und Burk (Lineweaver und Burk, 1934) ermittelt. Die dabei erhaltenen apparenten  $K_M$ -Werte betragen im Fall von RBOH1.10  $8,9 \pm 2,8 \mu\text{M}$  für NADPH und  $19,2 \pm 1,2 \mu\text{M}$  für NADH. Für RBOH2.5 wurden ähnliche Werte ermittelt und betragen  $8,2 \pm 1,3 \mu\text{M}$  für NADPH und  $15 \pm 3,2 \mu\text{M}$  NADH. Eine aufgereinigte NAD(P)H-Oxidaseaktivität aus Petersiliezellen wies  $K_M$ -Werte von  $3,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$  für NADPH und  $30 \pm 5 \mu\text{M}$  für NADH auf (Tschöpe, 1999). Die Enzymaktivitäten der heterolog exprimierten RBOH-Proteine stimmten gut mit diesen kinetischen Parametern überein. In aus Rosenzellen präparierten Plasmamembranfraktionen wurde die  $\text{O}_2^-$ -produzierende Enzymaktivität charakterisiert. Die  $K_M$ -Werte für die Substrate NADPH und NADH betrugen  $19 \mu\text{M}$  bzw.  $159 \mu\text{M}$  (Murphy und Auh, 96).  $K_M$ -Werte für die humane NADPH-Oxidase aus Phagozyten liegen bei  $30\text{-}40 \mu\text{M}$  für NADPH und etwa zehnfach höher für NADH (Morel *et al.*, 1991; Chanock *et al.*, 1994).

Der NADH-Oxidase-Hemmstoff DPI inhibiert in vielen pflanzlichen Systemen schon in sehr niedrigen Konzentrationen die Akkumulation von ROS und Phytoalexinen nach Elicitierung (Jabs *et al.*, 1997; Lamb und Dixon, 1997). Die halbmaximalen Konzentrationen, die eingesetzt werden müssen, um die durch RBOH2.5 katalysierte NADPH-abhängige  $\text{O}_2^-$ -Produktion durch DPI und IDP zu hemmen, korrelieren mit den  $\text{IC}_{50}$ -Werten für die Inhibierung der  $\text{O}_2^-$ -Produktion in Petersilie-Mikrosomen und die Hemmung der humanen NADPH-Oxidase aus Phagozyten (vgl. Tab. 16). Auch in anderen pflanzlichen Systemen genügten geringe DPI-Konzentrationen, um die Produktion der ROS zu blocken. In Tabakzellkulturen die das R-Gen *Cf9* besitzen und nach Elicitierung mit Avr9 typische Abwehrreaktionen zeigen, wurde die ROS-Produktion mit einem  $\text{IC}_{50}$  Wert von  $0,2 \mu\text{M}$  DPI inhibiert (Piedras *et al.*, 1998). Geringe DPI-Konzentrationen ( $\text{IC}_{50} = 30 \text{ nM}$ ) reichen aus, um die NADPH-abhängige  $\text{O}_2^-$ -Produktion in Plasmamembranen von Rosenzellen zu hemmen (Murphy und Auh, 1996).

**Tabelle 16: IC<sub>50</sub> –Werte von DPI und IDP für das heterolog exprimierte RBOH2.5 zum Vergleich der NADPH-Oxidase-Aktivität in Petersilie und humanen Neutrophilen.**

	IC <sub>50</sub> (μM) DPI	IC <sub>50</sub> (μM) IDP
RBOH2.5 (in Hefemikrosomen)	0,3 ± 0,08	8,9 ± 2,1
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion in Petersilie-Mikrosomen	0,9 ± 0,3	17 ± 3
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> -Produktion im Solubilisat der Petersilie-Mikrosome	1,2 ± 0,3	37 ± 6
NADPH-Oxidase-Aktivität in humanen Neutrophilen	0,9	80

### 4.3 Expressionsanalyse von *rboh2*

#### 4.3.1 *Rboh2* – Unterschiede zu anderen pflanzlichen gp91<sup>phox</sup>-Homologen

Der offene Leserahmen von *rboh2* kodiert für ein Protein von 657 Aminosäuren. RBOH2 enthält nicht, wie alle anderen pflanzlichen GP91<sup>phox</sup>-Homologen, N-terminale Extensionen von 300 bis 400 Aminosäuren und die darin befindlichen EF-Hand-Motive. So sind in allen anderen bekannten Sequenzen aus Arabidopsis, Reis und Tomate putative Ca<sup>2+</sup>-Bindestellen vorhanden. Es ist nicht anzunehmen, daß die klonierte *rboh2*-Sequenz unvollständig ist, da in Northern-Blot-Analysen ein Transkript mit identischer Länge zum cDNA-Insert detektiert wurde. Die Sequenz eines durch 5'Race-Experimente amplifizierten PCR-Produktes überspannt das 5'-Ende der *rboh2*-cDNA einschließlich des nichttranslatierten Bereiches. Es ist dennoch vorstellbar, daß das *rboh2*-Transkript durch alternatives *Splicing* entstanden sein könnte. Daraufhin würde die relativ gute Übereinstimmung des Bereiches direkt vor dem Beginn des offenen Leserahmens mit dem Konsensus von Exon/Intron Übergangssequenzen (vgl. Abb.4) deuten. Dafür könnte auch sprechen, daß die das Translationskodon flankierenden Sequenzen (CATAAUGC) nur teilweise Übereinstimmung mit der Konsensussequenz für die Translationsinitiation pflanzlicher mRNAs (AACAAUGG; Lütcke *et al.*, 1987) aufweisen. Dementsprechend könnte parallel ein längeres Transkript akkumulieren, das wegen geringer Abundanz in Northern-Blot-Analysen nicht detektiert wurde. Aufschluß darüber sollte die Analyse von genomischen Sequenzen geben. Die zur Verfügung stehende genomische Bank wurde vollständig analysiert. Dabei wurde nur ein Klon isoliert, der stromaufwärts der *rboh2*-cDNA ein Retrotransposon enthielt. Die genomische Organisation von *rboh2* konnte aus diesem Grund nicht geklärt werden.

*Rboh2* unterscheidet sich nicht nur hinsichtlich seiner Größe von allen anderen pflanzlichen gp91<sup>phox</sup>-Homologen, sondern auch bezüglich seiner Abundanz. Während sich unter Verwendung von DIG-markierten Sonden das *rboh2*-Transkript schon nach 10 Minuten Expositionszeit des Röntgen-Filmes nachweisen ließ, konnte das *rboh1*-Transkript in Northern-Blot-Analysen nicht detektiert werden, auch nicht unter Verwendung von 2μg

Poly(A)<sup>+</sup>-RNA als RNA-Präparation. Das *Osrboha*-Transkript konnte in Northern-Blot-Analysen ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Groom *et al.*, 1996). Von sechs charakterisierten *Atrboh*-Genen (Torres *et al.*, 1998) wurden in Northern-Blot-Analysen nur für *Atrboh*d und *Atrboh*f nach 4 Tagen Expositionszeit Signale detektiert. Dabei sind die Transkriptmengen in den Wurzeln um ein Vielfaches höher, als in Blüten, Blättern oder im Stengel (Torres *et al.*, 1998). Das *rboh*2-Transkript wurde in vergleichbaren Mengen in Blättern und in Wurzeln der Petersilie detektiert, nicht aber im Stengel.

#### 4.3.2 Induktion der Transkriptakkumulation von *rboh*2 – einem elicitorresponsiven Gen

In elicitorbehandelten Petersiliezellkulturen (50 nM Pep25) wurde ein transienter Anstieg der *rboh*2-Transkriptmenge mit einem Maximum nach 2 Stunden gefunden. Nach Applikation des inaktiven Pep13-Analogen Pep13-A2, welches nicht an den Rezeptor binden und keine der untersuchten Abwehrantworten auslösen kann, wurde kein Anstieg der Transkriptmenge beobachtet. Dies deutet ebenfalls auf eine rezeptorvermittelte Regulation der *rboh*2-Transkription hin. Neben Pep25 induziert auch der bakterielle Elicitor Harpin die verstärkte Akkumulation des *rboh*2-Transkriptes in Petersiliezellen mit einer ähnlichen Kinetik. Dabei gleichen einige durch Harpin ausgelöste Abwehrantworten wie die Induktion der Phytoalexin-Biosynthese den durch Pep25 aktivierten Abwehrreaktionen (J.Lee, pers. Mitteilung). In Arabidopsis-Zellkulturen bewirkte die Applikation von 1 µg/ml<sup>-1</sup> Harpin einen transienten Anstieg der *Atrboh*d-Transkriptmenge mit einem Maximum nach einer Stunde (Desikan *et al.*, 1998). Die Applikation von 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bewirkte einen ähnlichen, wenngleich schwächeren Anstieg der *Atrboh*d-Transkriptmenge mit einem Maximum nach zwei Stunden. Dabei könnte die Aktivierung der Transkriptakkumulation eine Antwort auf oxidativen Stress darstellen oder, von einer möglichen NADPH-Oxidase-Funktion der *Atrboh*-Klone ausgehend, einen Feedback-Regulationsmechanismus. Im Kontext dazu wurde gezeigt, daß das Transkript eines *gp91*<sup>phox</sup>-Homologen aus Tomate (Acc.-Nr.: AAF73124) nach Befall durch die Weißfliege langandauernd über 9 Tage akkumuliert. Die Induktion der Transkriptakkumulation wird sowohl in befallenen Blättern, als auch in systemisch nicht befallenen Blättern beobachtet. Das Gen ist durch Jasmonsäure und Ethylen reguliert (Linda Walling, Riverside, pers. Mitteilung). Es könnte demnach in einen SA-unabhängigen Signaltransduktionsweg involviert sein, in dem Jasmonsäure und Ethylen systemische Resistenz vermitteln (Thomma *et al.*, 1998; Pieterse und Van Loon, 1999). Nach Verwundung wurde eine transiente Genaktivierung gefunden. Eine erhöhte Expression nach Verwundung wurde auch für andere pathogenresponsive Gene beschrieben. Differentielle Expressionsanalysen zeigen auffallende Übereinstimmungen bei der Charakterisierung von sehr früh induzierten Genen bei der Wundantwort und Resistenzantwort in Tabakzellkulturen die das R-Gen *Cf9* besitzen und nach Elicitierung mit Avr9 typische Abwehrreaktionen zeigen (Durrant *et al.*, 2000).

Durch die Analyse differentiell exprimierter Gene nach Salzstress wurde in der salztoleranten Pflanze *Mesembryanthemum crystallinum* ein cDNA-Fragment (Acc.-Nr.: BE034131) isoliert, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeiten zu

GP91-Homologen aufweist. Eine spezifische Regulation des Gens muß in weiteren Untersuchungen verifiziert werden.

Die Präinkubation der Petersiliezellen mit DPI inhibierte die transiente Produktion von ROS, zeigte jedoch keinen Einfluß auf die elicitorinduzierte *rboh2*-Transkriptakkumulation. Daraus ergeben sich zwei Interpretationsmöglichkeiten: einerseits, von der möglichen NAD(P)H-Oxidase-Aktivität ausgehend, könnte man annehmen, daß RBOH2 in den zur Phytoalexinbiosynthese führenden Signalweg involviert ist. DPI hemmt dabei das Enzym und die Transkriptaktivierung erfolgt unabhängig von der Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies. Andererseits läßt sich nicht ausschließen, daß die Induktion der *rboh2*-Transkriptakkumulation wie die Aktivierung der MAPKs (Kroj, 1999; Romeis *et al.*, 1999) in einem ROS-unabhängigen, parallelen Signalweg lokalisiert ist.

#### 4.3.3 Strukturelle Ähnlichkeiten mit Fe-Reduktasen

Wie im Abschnitt 3.1.4 festgestellt wurde, weisen die RBOH-Proteine neben Homologien zu GP91<sup>phox</sup> und GP91<sup>phox</sup>-Homologen auch Ähnlichkeiten zu Fe-Reduktasen und Fe-Chelatreduktasen auf. Fe-Reduktasen aus der Hefe und die Fe-Chelatreduktasen aus Arabidopsis gehören wie die GP91<sup>phox</sup>-Homologen zu einer Familie von flavocytochromhaltigen Enzymen, die ein Elektron über die Plasmamembran transportieren, wobei entweder Fe<sup>3+</sup>-Ionen oder O<sub>2</sub> den Elektronenakzeptor darstellen. Das in der Wurzel exprimierte, gering abundante *fro2*-Gen aus Arabidopsis kodiert für eine Fe-Chelatreduktase. Diese weist, ebenso wie die Fe-Reduktasen FRP1 und FRE1, Homologien zu GP91<sup>phox</sup> auf, insbesondere hinsichtlich der putativen FAD- und NAD(P)H-Bindestellen, der Hydrophobizitätsmuster und der vorhergesagten isoelektrischen Punkte (Dancis *et al.*, 1993; Roman *et al.*, 1993; Finegold *et al.*, 1996; Shatwell *et al.*, 1996; Robinson *et al.*, 1999). Das FRO2-Protein besteht aus 725 Aminosäuren und der C-Terminus weist, zusätzlich zu den aufgeführten homologen Bereichen, etwa 10% Identität zu p22<sup>phox</sup> auf (Robinson *et al.*, 1999). Das Enzym katalysiert die Reduktion von extrazellulärem Fe(III)-Chelat und die freigesetzten Fe<sup>2+</sup>-Ionen werden über Transporter in die Rhizodermiszellen aufgenommen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeiten wurde versucht, Hinweise zu erhalten, ob RBOH2 eine Rolle bei der Fe-Assimilation in Petersilie einnimmt. Die Expression von *rboh2* in Fe-defizienten (300 µM Ferrozine) und Fe-suffizienten Zellkulturen (100 µM Fe<sup>3+</sup>-EDTA) wurde über einen Zeitraum von zwölf Stunden bis zu drei Tagen analysiert. Während die Akkumulation des *fro2*-Transkript in den Wurzelzellen nach drei Tagen durch Eisenmangel induziert wird (Robinson *et al.*, 1999), blieb die *rboh2*-Transkriptmenge in den Petersiliezellen unverändert (Daten nicht gezeigt). Auch gibt es bisher keine Hinweise, daß die pflanzlichen GP91<sup>phox</sup>-Homologen bei der Fe-Assimilation in Pflanzen eine Bedeutung haben. Komplementationsanalysen von Fe-Reduktasemutanten aus *Saccharomyces cerevisiae* (Georgatsou und Alexandraki; 1994) mit der *AtrbohD*-cDNA oder mit pflanzlichen cDNA-Banken waren nicht erfolgreich (Ulrich Eckhardt, HU Berlin; persönliche Mitteilung). Für das humane GP91<sup>phox</sup> wurde gezeigt, daß

trotz der strukturellen Ähnlichkeiten die Eisenaufnahme in Neutrophilen nicht vom Flavocytochrom  $b_{558}$  vermittelt wird (De Leo *et al.*, 1999).

## 4.4 Untersuchungen zur Funktion der RBOH-Proteine

### 4.4.1 Detektion der Proteine RBOH1 und RBOH2 in Petersilie

Bemerkenswert war die Beobachtung, daß unter Verwendung von mono- und polyklonalen Anti-GP91<sup>phox</sup>-Antiseren weder in Zellextrakten, noch in Mikrosomen korrespondierende Proteine aus Petersilie detektiert werden konnten (Tschöpe, 1999). Auch im Eluat einer Affinitätschromatographie, in dem eine NADPH-Oxidaseaktivität aufgereinigt war, konnte mittels eines Anti-RBOH2-Peptidantikörpers kein Protein detektiert werden (Tschöpe, 1999). Im Rahmen dieser Arbeit gelang es nicht, trotz der Suche nach optimalen experimentellen Bedingungen und unter Verwendung verschiedener Proteinextrakte wie Mikrosomen, aus Wurzelzellen präparierte Mikrosomen, aus elicitierten Zellen (t=4h; 50nM Pep25) präparierte Mikrosomen, Plasmamembranen (etwa dreifach angereichert im Vergleich zur mikrosomalen Fraktion) korrespondierende Proteine durch Western-Blot-Analysen unter Verwendung des Anti-RBOH2.1-5934- oder Anti-RBOH1-5937-Antiserums nachzuweisen. In mikrosomalen Fraktionen, welche aus transgenen Zellkulturen mit erhöhter Transkriptmenge (s8.4, s8.42, vgl. 3.xx) präpariert waren, erkannte das Anti-RBOH2.1-5934-Antiserum nur eine Bande im niederen Molekulargewichtsbereich. In Gesamt-Proteinextrakten aus Arabidopsis-Zellkulturen konnte unter Verwendung eines Anti-Peptidantikörpers kein korrespondierendes Protein detektiert werden, nur in Mikrosomen und gereinigter Plasmamembran wurde eine 98-kDa-Bande identifiziert (Keller *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse lassen sich durch die geringe Abundanz der pflanzlichen GP91<sup>phox</sup>-Homologen erklären.

### 4.4.2 Identifizierung von cytosolischen Untereinheiten oder anderen Regulatoren durch das Hefe-Zwei-Hybrid-System

Über die Suche nach interagierenden Proteinen wurde mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems eine Reihe pflanzlicher Signalkomponenten identifiziert (Ni *et al.*, 1998, Tang *et al.*, 1996). Mit der Durchführung eines Zwei-Hybrid-Screening wurde das Ziel verfolgt, zusätzliche Untereinheiten oder Regulatoren von RBOH1 und RBOH2 zu identifizieren. Es wurden vier positive Klone isoliert, die im Zwei-Hybrid-System mit den Fusionsproteinen pBD-HA51 oder pBD-HA42 interagierten. Für zwei der isolierten cDNA-Klone, pAD51-9 und pAD51-13, konnten durch Datenbankabfragen und Sequenzvergleiche keine Hinweise auf Ähnlichkeiten mit anderen Sequenzen erhalten werden. Die abgeleitete Aminosäuresequenz von pAD51-8 weist 94% Identität mit einem ribosomalen Protein aus Arabidopsis auf. Da ribosomale Proteine eine Spitzenposition in einer Liste von identifizierten, falsch positiven Zwei-Hybrid-Klonen einnehmen (Hengen, 1997), ist davon auszugehen, daß kein funktioneller Zusammenhang zu RBOH2 hergestellt werden kann. PAD42-1 zeigt signifikante Ähnlichkeiten zu einer humanen, mikrosomalen Glutathion-S-

Transferase, pflanzliche Homologe wurden nicht gefunden. Die Bedeutung dieses Resultates ist auf dieser Ebene der Versuchsdurchführung nicht interpretierbar. Die Spezifität der Interaktion mit PBD-HA42 sollte noch durch quantitative Bestimmungen der  $\beta$ -Galaktosidaseaktivität und durch *in vitro* Bindungsstudien verifiziert werden.

Im Kontext mit der sich im Verlauf dieser Arbeit herauskristallisierenden Vermutung, daß homologe Proteine der cytosolischen Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus Phagozyten in Pflanzen nicht existieren, ist die Weiterführung des Experimentes kritisch zu betrachten. Zu bedenken wäre außerdem, daß die Anwendung von neuen Zwei-Hybrid-Systemen, bei dem potentielle Protein-Protein-Wechselwirkungen im Zytosol der Zelle detektiert werden, prinzipiell einen vielversprechenderen Ansatz darstellen würde, da z.B. die Lokalisation der zu untersuchenden Proteine im Cytosol posttranslationale Modifikationen erlaubt (Broder et al, 1998). Auch hinsichtlich des sehr geringen Expressionniveaus von pBD-HA42 und pBD-HA52 (vgl. Abb. 17) wäre die Verwendung von anderen Vektoren bzw. Konstrukten sinnvoll.

#### 4.4.3 Analyse von *rboh2*-Sense- und -Antisense-Linien

Um Informationen über die physiologische Funktion der RBOH-Proteine zu erhalten, waren Untersuchungen mit transgenen Pflanzen von Interesse. Da Petersiliepflanzen für die genetische Bearbeitung nicht geeignet sind, sollte die Generierung und Analyse stabil transformierter Zellkulturen funktionelle Untersuchungen ermöglichen. Der Phänotyp der *rboh2*-Sense-Linien s8.42 und s8.4 zeigte, daß im Vergleich zum Wildtyp die erhöhte *rboh2*-Transkriptakkumulation mit gesteigerter  $O_2^-$ -Produktion und Phytoalexinbiosynthese korrelierte. Im Vergleich zur Phytoalexinproduktion in anderen, elicitorbehandelten transgenen Petersiliezellkulturen liegen die Werte mit 144% und 247% über dem Durchschnitt normaler Schwankungen. Bei acht charakterisierten Linien, die Apoäquorin exprimierten (Blume *et al.*, 2000), lag die durchschnittlich produzierte Menge an Furanocumarinen bei 67 %. Bei sieben charakterisierten *aox1*-Antisense-Linien betrug der Durchschnitt 92,8%. Elf charakterisierte *rboh2*-Antisense-Linien, in denen keine signifikante Veränderungen der Transkriptmenge detektiert wurden, produzierten durchschnittlich 121% der Phytoalexinmenge im Vergleich zur nichttransgenen Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Der erhöhte oxidative Stress schien, vor allem in der Linie s8.4 mit dem stärker ausgeprägten Phänotyp, zur Aktivierung von Enzymen wie Peroxidasen und Katalasen zu führen, denn die gemessene  $H_2O_2$ -Konzentration betrug nur 33% ( $t=30$  min) und 25% ( $t=3,5h$ ) im Vergleich zum Wildtyp. Diese Effekte könnten auf einen vermuteten, kausalen Zusammenhang zwischen der Funktion der RBOH-Proteine und ihre Involvierung in die Elicitorsignalkette hindeuten.

Um diese Interpretation zu beweisen, sollte in stabil transformierten *rboh2*-Antisense-Kulturen die Produktion der ROS und Furanocumarine signifikant verringert oder blockiert sein. Es wurde keine transgene Kultur gefunden, in der das *rboh2*-Transkript nicht akkumulierte. Durch Northern-Blot-Anaysen wurde gezeigt, daß in einigen Zellkulturen große Mengen des 1,75-kb-Antisense-Transkriptes akkumulierten (nicht gezeigt). Dies



deutet zumindest auf die Integration funktioneller Plasmide hin. Somit ist davon auszugehen, daß die Generierung von *rboh2*-Antisense-Zellkulturen, in denen die Expression von dem konstitutiven Promotor CaMV-35S vermittelt wird, schwierig ist. Es wäre vorstellbar, daß ein Zusammenhang zum veränderten Redoxstatus in den Zellen besteht. Wie über die transiente Produktion von ROS oder den Redoxstatus der Zelle Signalmechanismen vermittelt werden, ist ansatzweise verstanden. Einige Beispiele, wie bei redoxregulierten Transkriptionsfaktoren die Funktion von Proteinen verändert wird, sind schon bekannt. Der *E.coli* Transkriptionsfaktor OxyR wird durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder Glutathiondisulfid (GSSG) über die Bildung einer intramolekularen Disulfidbrücke aktiviert und anschließend durch die enzymatische Reduktion der Disulfidbrücke inaktiviert (Aslund *et al.*, 1999). Der SoxR-Transkriptionsfaktor wird durch Superoxid und NO aktiviert, dabei ist ein 2Fe-2S-Cluster die redoxensitive Komponente (Liochev *et al.*, 1999; Ding und Dimple, 2000). Der  $\sigma^R$ -Faktor aus *Streptomyces coelicolor* und das *E.coli* Chaperon Hsp33 wurden ebenfalls als redoxaktive Proteine charakterisiert (Paget *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 1999). Auch eukaryotische Signaltransduktionswege können über redoxregulierte Proteine reguliert werden. ASK1, eine MAPKKK, wird über einen Tumornekrosisfaktor- $\alpha$ -(TNF- $\alpha$ )-vermittelten Signalweg aktiviert, der zur Apoptose führt. In einem Zwei-Hybrid-Screen wurde das redoxregulierte Thioredoxin als negativer Regulator der ASK1 identifiziert. Steigende ROS Konzentrationen oder Stimulierung durch TNF- $\alpha$  bewirken die Dissoziation des inaktiven ASK1-Thioredoxin-Komplexes und Aktivierung des Signaltransduktionsweges (Saitoh *et al.*, 1998).

Transgene Pflanzen oder Zellkulturen aus anderen Systemen, in denen *gp91<sup>phox</sup>*-Homologe überexprimiert wurden, oder *knock out*-Mutanten wurden noch nicht charakterisiert. In der Arbeit von Keller *et al.* (1998) wurde erwähnt, daß transgene Antisense-Tabakpflanzen möglicherweise einen Phänotyp hinsichtlich ihrer Pathogenresponsivität zeigen. Ergebnisse der Analysen solcher Pflanzen wurden bisher nicht publiziert. Die Analyse von *knock out*-Mutanten aus Arabidopsis ist wegen der möglicherweise funktionellen Redundanz von zehn GP91<sup>phox</sup>-Homologen schwierig (Torres *et al.*, 1998, Keller *et al.*, 1998).

In Tiersystemen wurden *knock-out* Mäuse (*gp91<sup>phox</sup>-/-*/*NO-Synthase (NOS2)*<sup>-/-</sup>) beschrieben, die einen extremen Phänotyp aufweisen. Unter sterilen Bedingungen sterben fast alle Mäuse an normalerweise ungefährlichen Infektionen. Im Gegensatz dazu entwickeln die Mäuse mit nur einer Defizienz selten solche spontanen Infektionen, auch unter wenig sterilen Bedingungen (Shiloh *et al.*, 1999; Nathan und Shiloh, 2000). Diese starke funktionelle Kooperativität von ROS und NO könnte auch bei der pflanzlichen Pathogenabwehr von Bedeutung sein (Delledonne *et al.*, 1998; Durner *et al.*, 1998; Nathan und Shiloh, 2000).

## 4.5 Ascorbat-Oxidase-Homologe (AOH) – neue Enzyme mit putativer NAD(P)H-Oxidaseaktivität

Grundlage für die Klonierung der cDNAs *aoh1* und *aoh2* bildete die Anreicherung einer NADPH-Oxidaseaktivität aus Petersiliezellen (Tschöpe, 1999). Nach Solubilisierung der Enzymaktivität und einer Aufreinigung durch Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie wurde eine 98-kDa-Bande aus dem Gel eluiert, deren Abundanz mit der NADPH-Oxidaseaktivität korrelierte. Aufgrund des starken Aktivitätsverlustes während der Reinigungsprozedur konnte keine homogene Enzympräparation erhalten werden und im silbergefärbten SDS-PA-Gel von Fraktionen der Farbstoffchromatographie war eine Mehrzahl von distinkten Banden sichtbar (Tschöpe, 1999). Die Möglichkeit läßt sich nicht ausschließen, daß trotz der Korrelation zwischen Enzymaktivität und der Abundanz des 98-kDa-Proteins nicht das gesuchte Protein isoliert wurde. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß die RBOH-Proteine nur sehr gering abundant sind (vgl. 4.3.1).

### 4.5.1 Sequenzanalyse von AOH1 und AOH2

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen AOH1 und AOH2 weisen mit bis zu 76% Identität die höchste Homologie zu pflanzlichen, pollenspezifisch exprimierten Proteinen auf. Dabei handelt es sich um eine Proteinfamilie, die trotz ihrer Verwandtschaft zu Multi-Kupfer-Oxidasen, funktionell noch nicht beschrieben wurde. Die Enzyme dieser Proteinfamilie (Ascorbat-Oxidase, Laccase, Ceruloplasmin) enthalten neben einer mononuklearen Kupferbindestelle (T1) ein trinukleares Kupferbindezentrum (T3). Die Oxidation des Substrates erfolgt in der Nähe des T1-Zentrums, das den Elektronentransfer zum T3-Zentrum vermittelt, wo der molekulare Sauerstoff zum Wasser reduziert wird (Mc Guirl und Dooley, 1999). Die Histidinreste, die im T3-Zentrum an der Bindung der Kupferionen beteiligt sind, wurden in den AOH-Proteinen und den homologen pollenspezifisch exprimierten Proteinen nicht gefunden. Welche Faktoren oder prostetische Gruppen am Elektronentransfer beteiligt sein könnten, ist unklar (vgl. 3.3.2) Hinweise darüber könnten anhand von UV-Spektren erhalten werden, wenn es gelingt, eine ausreichende Menge an gereinigtem Protein bereitzustellen.

Ein pollenspezifisch exprimiertes Protein, Bp10, aus Raps wurde bisher näher charakterisiert (Albani *et al.*, 1992). Da die konservierten Histidinreste, die im aktiven Zentrum an der Enzymkatalyse beteiligt sind, nicht vorhanden waren, wurde eine evolutionäre Verwandtschaft zu Multi-Kupfer-Oxidasen postuliert, aber mit distinkter, unbekannter Funktion (Albani *et al.*, 1992). Daraufhin deuteten Expressionsversuche mit dem rekombinanten Bp10-Protein in *E.coli*. Für das heterolog exprimierte Protein konnte keine Ascorbat-Oxidaseaktivität nachgewiesen werden, aber das Wachstum der Bakterien wurde nach Induktion der Proteinbiosynthese stark inhibiert. Als Ursache wurde eine enzymatische Aktivität des rekombinanten Polypeptids angenommen (Albani *et al.*, 1992). Multi-Kupferoxidasen nutzen oft molekularen Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Mc Guirl und Dooley, 1999), wobei als mögliche Reaktionsprodukte ROS oder Wasser entstehen.

Von einer putativen NADPH-Oxidasefunktion der AOH-Proteine ausgehend und im Kontext mit der transienten, pollenspezifischen Expression des Bp10-Proteins (Albani *et al.*, 1992) könnten freigesetzte ROS eine Signalfunktion bei Entwicklungsprozessen einnehmen.

Computergestützte Vorhersagen (PSORTI, DGPI, big-PI Predictor) zur funktionellen und strukturellen Charakterisierung der AOH-Proteine ergaben, daß diese wahrscheinlich durch eine GPI-Verankerung in der Plasmamembran modifiziert werden. Zwei der bisher identifizierten AOH-Homologen (Acc.-Nr.: T07634 und BAB08664) aus Arabidopsis mit dem höchsten Grad an Identität (80% auf Aminosäureebene zu AOH1) würden auch über einen GPI-Anker in der Plasmamembran lokalisiert sein. GPI-verankerte Proteine sind ausschließlich auf der extrazellulären Seite der Plasmamembran lokalisiert (Englund, 1993) und werden für zahlreiche eukaryotische Organismen beschrieben. In Pflanzen enthalten Arabinogalaktan-Proteine GPI-Anker, wobei diesen eine Rolle innerhalb der zellulären Differenzierung und bei der Bildung von extrazellulären Signalmolekülen zugeschrieben wird (Schultz *et al.*, 1998; Takos *et al.*, 1998; Youl *et al.*, 1998; Sherrier *et al.*, 1999). Eine gemeinsame Funktion von GPI-verankerten Proteinen ist nicht bekannt. Für den GPI-Anker werden verschiedene Funktionen postuliert wie seine Teilnahme an Signaltransduktionsprozessen durch die Abspaltung von Anker-Komponenten, die selbst als Botenstoff dienen (z.B. Diacylglycerin) oder über die Interaktion mit signalübermittelnden Proteinen wie Tyrosinkinasen und heterotrimeren G-Proteinen (Tachado *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1996). Für Ceruloplasmin, eine humane  $\text{Fe}^{2+}$ - $\text{O}_2$ -Oxidoreduktase, wurde eine GPI-verankerte Form identifiziert, die in Astrozyten, einer Hauptform der Gliazellen, exprimiert wird. Dieses membrangebundene Ceruloplasmin ist katalytisch aktiv. Daraus folgern die Autoren, daß die GPI-verankerte Form, ebenso wie die sekretierte, die Oxidation von  $\text{Fe}^{2+}$ -Ionen katalysiert (Patel und David, 1997).

#### **4.5.2 Funktionelle Charakterisierung der AOH-Proteine**

##### **4.5.2.1 Expressionsanalyse**

Die AOH-Proteine werden in verschiedenen Organen von Petersiliepflanzen wie in Blättern, Wurzeln und im Stengel exprimiert. Die pollenspezifische Expression der AOH-Proteine ist aufgrund der hohen Homologie wahrscheinlich, wurde aber noch nicht untersucht. Die entwicklungsspezifische Expression von Proteinen würde keinesfalls einen Widerspruch zu Beteiligung an der Pathogenabwehr darstellen. Zum Beispiel weist das Hauptpollenallergen des Birkenpollens Bet v I 55% Identität auf Aminosäureebene zu einem PR-Protein aus der Erbse auf (Breiteneder *et al.*, 1989; Swoboda *et al.*, 1994).

Es wäre noch zu klären, ob der verwendete Anti-Peptidantikörper P112 beide AOH-Proteine erkennt. Ein wichtiges Hilfsmittel wäre dabei die Gewinnung von Anti-Peptid-Antisera, die zwischen AOH1 und AOH2 diskriminieren. Die Verifizierung der Spezifität dieser Antisera könnte mit Hilfe von bakteriell exprimierten AOH-Proteinen erfolgen. Mit dieser Voraussetzung könnten auch Immunlokalisationsstudien durchgeführt werden, um die Fragestellung nach der subzellulären Lokalisation der AOH-Proteine zu klären.

#### 4.5.2.2 Versuche zum Nachweis der Enzymaktivität des rekombinanten AOH1

Durch heterologe Expression der AOH-Proteine sollte gezeigt werden, ob die AOH-Proteine Oxidasen sind, die über die Reduktion von NADPH die Oxidation von molekularem Sauerstoff zum Superoxid anion katalysieren. Expressionsversuche in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* und in NIH-3T3 Zellen erwiesen sich als nicht erfolgreich (vgl. 3.3.4). Durch heterologe Expression in der Hefe konnten geringe Mengen des rekombinanten Proteins AOH1 nachgewiesen werden. Mikrosomale Fraktionen der Hefen wurden in Enzymaktivitätsmessungen auf  $O_2^-$ -Produktion getestet. Es wurden keine signifikanten Enzymaktivitäten gefunden, wobei als Ursache dafür, neben dem äußerst geringen Expressionsniveau, vor allem das Fehlen von Kofaktoren oder weiteren Untereinheiten möglich ist. Die Expression des AOH1-Proteins als GST-Fusionsprotein in *E.coli* führte nicht zur Bildung des rekombinanten Proteins. Nach Induktion der Proteinbiosynthese mit IPTG wurden in Western-Blot-Analysen unter Verwendung eines Anti-GST-Antikörpers eine große Vielzahl von Banden detektiert, die wahrscheinlich aus Abbauprodukten resultieren (M. Krzymowska, pers. Mitteilung).

#### 4.5.2.3 Analyse von stabil transformierten *aoh1*-Antisense-Kulturen

Von neun gewachsenen *aoh1*-Antisense-Kalli konnten nur drei Kulturen weiter untersucht werden. Die transgenen Kalli, in denen die Expression der AOH-Proteine stark unterdrückt war, wuchsen nicht und es konnten keine Flüssigkulturen etabliert werden. In den drei untersuchten transgenen Kulturen waren die detektierten Proteinmengen im Vergleich zum Wildtyp stark verringert. Die in RT-PCR-Experimenten nachgewiesenen *aoh1*- und *aoh2*-Transkriptmengen deuteten daraufhin, daß wahrscheinlich noch geringe Menge der AOH-Proteine exprimiert wurden. Dies könnte die Ursache sowohl für die Lebensfähigkeit, als auch für einen nicht nachweisbaren Phänotyp dieser Kulturen gewesen sein. Die gemessenen  $H_2O_2$ -Konzentrationen und die Menge an gebildeten Furanocumarinen im Medium der elicitorbehandelten, transgenen Zellkulturen waren, im Vergleich zum Wildtyp, nicht signifikant verändert.

## 4.6 Ausblick

Im Mittelpunkt zukünftiger Arbeiten sollte zuerst die Klärung der physiologischen Funktion(en) der RBOH-Proteine stehen. Dafür wäre zunächst die Generierung weiterer transgener Linien erforderlich, wobei Petersiliezellen stabil mit *rboh1*-Antisense- und *rboh1*-Sense-Konstrukten transformiert werden würden. Generell ist für Transformationsexperimente die Schaffung neuer Konstrukte zu überdenken, in denen die Expression von einem induzierbaren Promotor vermittelt wird. Die Analyse von transgenen, *rboh*-überexprimierenden Arabidopsis-Pflanzen innerhalb der gut charakterisierten Arabidopsis/Pathogensysteme könnte zur Klärung der Frage beitragen, ob die RBOH-Proteine eine Funktion innerhalb der zur Induktion von Abwehrreaktionen führenden Signalketten haben. Bei der Generierung von RBOH-überexprimierenden Pflanzen könnte die Verwendung von Expressionsvektoren, die einen Epitop-Tag besitzen, aufschlußreich sein, da die Lokalisation der RBOH-Proteine in Petersilie nicht gezeigt werden konnte.

Weiterhin sollte die Regulation der Enzymaktivität der heterolog exprimierten RBOH-Proteine durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen weiter untersucht und charakterisiert werden. Die enzymatischen Parameter der rekombinanten RBOH-Proteine wurden in mikrosomalen Fraktionen transgener Hefen bestimmt, in denen keine endogene NADPH-abhängige  $\text{O}_2^-$ -Produktion meßbar war. Der über den Expressionsvektor eingeführte C-terminale Histidin-Tag ermöglicht auch eine Reinigung der rekombinanten Proteine. So könnte man durch Experimente mit über Nickelagarose gereinigten Proteinen weitere enzymatische Charakterisierungen vornehmen und in zukünftigen Experimenten die spezifischen Enzymaktivitäten ermitteln. Die Aufnahme von UV-Spektren könnte Aufschluß über die Natur von eventuellen Cofaktoren geben, z.B. ob es sich um FAD-haltige Enzyme handelt.

Ein weiterer vielversprechender Ansatz ist die Durchführung einer Komplementationsanalyse in humanen, *gp91<sup>phox</sup>*-defizienten PLB-985 X-CGD Zellen. Diese Untersuchungen werden in Zusammenarbeit mit M. Dinauer („Indiana University School of Medicine“, Indianapolis, USA) durchgeführt und sind bisher noch nicht abgeschlossen.

Mit Hilfe der Methode des *genome walking* sollte es möglich sein die genomische Struktur von *rboh2* zu klären, um zu untersuchen, ob stromaufwärts vom *rboh2*-5'-Ende gelegene Sequenzen für Bereiche mit Homologie zu RBOH1 kodieren. In diesem Zusammenhang wäre auch die Isolation und Sequenzanalyse des *rboh2*-Promotors von großem Interesse. Mit dieser Voraussetzung könnten Promotor-GUS- oder -GFP-Konstrukte geschaffen und in Lokalisationsstudien eingesetzt werden.

Um die AOH-Proteine funktionell zu charakterisieren, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten und Ansätze. Ein direkter Weg wäre ihre Reinigung über eine Affinitätssäule mit immobilisiertem Antikörper, um eine homogene Präparation größerer Proteinmengen zu gewinnen und die postulierte NAD(P)H-oxidase-Aktivität zu verifizieren. Der Nachweis der enzymatischen Aktivität kann auch durch Überexpression in anderen eukaryotischen Systemen gelingen. Durch die heterologe Expression der AOH-Proteine in der Hefe *Pichia*

---

*methanolica* wird eine vielfach höhere Menge an gebildetem rekombinanten Protein erwartet. Damit würde in zukünftigen Experimenten eine gute Interpretation der Ergebnisse aus Enzymaktivitätsmessungen möglich sein.

## 5 Zusammenfassung

Die massive, transiente Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*oxidative burst*) ist eine frühe und zentrale Komponente der pflanzlichen Pathogenabwehr. Neben der direkten antimikrobiellen Wirkung und Katalyse bei der Vernetzung von Zellwandbestandteilen haben die ROS auch eine wichtige Signalfunktion bei der Auslösung von Abwehrreaktionen. Als Mechanismus für die Entstehung des *oxidative burst* wird vor allem die primäre Bildung von  $O_2^-$ -Ionen durch eine NADPH-Oxidase diskutiert. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals ein funktioneller Zusammenhang zwischen pflanzlichen Genen mit Homologie zur katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase aus Phagozyten, *gp91<sup>phox</sup>*, und der vermuteten NADPH-Oxidaseaktivität der kodierenden Proteine hergestellt werden.

Durch das Screening einer Petersilie-cDNA-Bank mit einer heterologen Sonde wurden zwei cDNA-Klone *rboh1* und *rboh2* kloniert. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben zahlreiche strukturelle Ähnlichkeiten mit *GP91<sup>phox</sup>* und deuteten auf einen gemeinsamen evolutionären Ursprung und damit auf eine funktionelle Verwandtschaft hin. Die heterologe Expression der Gene in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte durch den Einsatz eines Vektors, der ein Epitop-Tag besitzt, und das Einfügen einer Kozak-Sequenz zur Erhöhung der Translationseffizienz in Western-Blot-Analysen gezeigt werden. Dabei wurde die Lokalisation der rekombinanten Proteine RBOH1 und RBOH2 in den mikrosomalen Fraktionen nachgewiesen und NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion detektiert. Es wurde gezeigt, daß die NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Bildung in RBOH2-Mikrosomen unabhängig von der Anwesenheit von  $Ca^{2+}$  war. Hingegen wurde in RBOH1-Mikrosomen erst unter Verwendung eines  $Ca^{2+}$ -haltigen Extraktionspuffers NAD(P)H-abhängige  $O_2^-$ -Produktion nachgewiesen. Übereinstimmend damit enthält die RBOH1-Aminosäuresequenz ein putatives  $Ca^{2+}$ -bindendes EF-Hand-Motif, das in RBOH2 nicht vorhanden ist. Der NADH-Oxidase-Hemmstoff DPI inhibiert in vielen pflanzlichen Systemen in sehr niedrigen Konzentrationen den *oxidative burst* (Jabs *et al.*, 1997; Lamb und Dixon, 1997). Die halbmaximale Konzentration, die eingesetzt werden mußte, um die durch RBOH2 katalysierte NADPH-abhängige  $O_2^-$ -Produktion durch DPI zu hemmen, korrelierte mit den  $IC_{50}$ -Werten für die Inhibierung der  $O_2^-$ -Produktion in Petersilie-Mikrosomen und die Hemmung der NADPH-Oxidase aus Phagozyten.

In Petersiliezellkulturen wurde nach Elicitorbehandlung ein transienter Anstieg der *rboh2*-Transkriptmenge mit einem Maximum nach 2 Stunden gefunden. Nach Applikation des inaktiven Pep13-Analogen Pep13-A2, welches nicht an den Rezeptor binden und keine der untersuchten Abwehrantworten auslösen kann, wurde kein Anstieg der Transkriptmenge beobachtet. Dies deutet auf eine rezeptorvermittelte Regulation der *rboh2*-Transkription hin. Neben Pep25 induziert auch der bakterielle Elicitor Harpin eine Aktivierung der *rboh2*-Transkriptakkumulation mit einer ähnlichen Kinetik. Das *rboh1*-Transkript konnte in Northern-Blot-Analysen nicht detektiert werden. Durch die Überexpression der hydrophilen C-Termini von RBOH1 und RBOH2 in *E.coli* wurden polyklonale Antiseren gegen diese Polypeptide gewonnen. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es trotz der Suche nach optimalen

experimentellen Bedingungen und unter Verwendung verschiedener Proteinextrakte nicht, die korrespondierenden Petersilie-Proteine durch Western-Blot-Analysen nachzuweisen.

Durch Untersuchungen mit stabil transformierten Petersiliezellkulturen sollte die Vermutung über eine Funktion der RBOH-Proteine innerhalb des *oxidative burst* verifiziert werden. In den *rboh2*-Sense-Kulturen s8.42 und s8.4 wurde im Vergleich zum Wildtyp erhöhte *rboh2*-Transkriptakkumulation detektiert, die mit gesteigerter  $O_2^-$ -Produktion und Phytoalexinbiosynthese nach Elicitorbehandlung korrelierte. In stabil transformierten *rboh2*-Antisense-Kulturen sollte die Produktion der ROS und Furanocumarine signifikant verringert oder blockiert sein. Allerdings konnte keine *rboh2*-Antisense-Kultur generiert werden, in der die *rboh2*-Transkriptakkumulation vollständig unterdrückt war.

Im Rahmen der Dissertation von M. Tschöpe (1999) wurde eine NADPH-Oxidase-Aktivität aus der Petersilie aufgereinigt. Die Identifizierung einer 98 kDa Bande, deren Auftreten mit der Enzymaktivität korrelierte, führte nach Isolierung und Verdau zur Gewinnung von Peptidfragmenten, die signifikante Homologien zu pflanzlichen Ascorbat-Oxidasen aufwiesen. Da keine Ähnlichkeiten zu GP91<sup>phox</sup>-Homologen oder zu den Untereinheiten der NADPH-Oxidase aus Säuger-Phagozyten gefunden wurde, sollte die Klonierung der korrespondierenden cDNA-Klone die weitere funktionelle Charakterisierung der neuen, putativen NADPH-Oxidase ermöglichen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen AOH1 und AOH2 weisen mit bis zu 76% Identität die höchste Homologie zu pollenspezifisch exprimierten Proteinen auf, für die evolutionäre Verwandtschaft zu Multi-Kupfer-Oxidasen postuliert wurde, aber mit distinkter, unbekannter Funktion. Die durchgeführten Experimente zur funktionellen Analyse der AOH-Proteine waren bisher nicht erfolgreich. Weitere Versuche zur heterologen Expression der AOH-Proteine in neuen eukaryotischen Expressionssystemen könnte die zentrale Frage der Enzymaktivität der rekombinanten Proteine klären.



## 6 Literatur

- Able, A.J., Guest, D.I., Sutherland, M.W. (1998) Use of a new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae*. *Plant Physiol* 117:491-499.
- Albani, D., Sardana, R., Robert, L.S., Altosaar, I., Arnison, P.G., Fabijanski, S.F. (1992) A *Brassica napus* gene family which shows sequence similarity to ascorbate oxidase is expressed in developing pollen. Molecular characterization and analysis of promoter activity in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 3:331-342.
- Allan, A.C., Fluhr, R., (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* 9: 1559-1572.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* 25: 3389-3402.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A., Lamb, C., (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92:773-784.
- Ambruso, D.R., Knall, C., Abell, A.N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R.J., Oyer, R., Johnson, G.L., Roos, D. (2000) Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(9):4654-4659.
- Amicucci, E., Gaschler, K. and Ward, J.M. (1999) NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol.* 1, 524-528 (1999)
- Apostol, I., Heinsteins, P.F., Low, P.S., (1989) Rapid stimulation of an *oxidative burst* during elicitation of cultured plant-cells: role in defense and signal transduction. *Plant Physiol.* 90: 109-116.
- Askwith, C., Eide, D., Van Ho, A., Bernard, P.S., Li, L., Davis-Kaplan, S., Sipe, D.M., Kaplan, J. (2000) The FET3 gene of *S. cerevisiae* encodes a multicopper oxidase required for ferrous iron uptake. *Cell.* 1994 76(2):403-410.
- Aslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., Storz, G. (1999) Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96(11):6161-6165.
- Auh, C.-K., and Murphy, T.M. (1995) Plasma membrane redox enzyme is involved in the synthesis of  $O_2^-$  and  $H_2O_2$  by *Phytophthora* elicitor-stimulated rose cells. *Plant Physiol.* 107:1241-1247.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K., eds (1994). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: Greene Publishing Association/Wiley Interscience).

- Avrova, A.O., Stewart, H.E., De Jong, W.D., Heilbronn, J., Lyon, G.D., Birch, P.R. (1999) A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12(12):1114-1119.
- Babior, B.M. (1992) The respiratory burst oxidase. *Adv Enzymol* 65:49-95.
- Babior, B.M. (1999) NADPH Oxidase: An Update. *Blood* 93(5): 1464-1476.
- Bae, G.U., Seo, D.W., Kwon, H.K., Lee, H.Y., Hong, S., Lee, Z.W., Ha, K.S., Lee, H.W., Han, J.W. (1999) Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 274(46):32596-32602.
- Baker, C.J., Orlandi, E.W., Mock, N.M. (1993) Harpin, an elicitor of the hypersensitive response in tobacco caused by *Erwinia amylovora* elicits active oxygen production in suspension cells. *Plant Physiol.* 102: 1341-1344.
- Baker, C.J., and Orlandi, E.W. (1995) Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:299-321
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B., Dinesh-Kumar, S.P. (1997) Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276(5313):726-33.
- Banfi, B., Maturana, A., Jaconi, S., Arnaudeau, S., Laforge, T., Sinha, B., Ligeti, E., Demaurex, N., Krause, K.H. (2000) A mammalian H<sup>+</sup> channel generated through alternative splicing of the NADPH oxidase homolog NOH-1. *Science* 287(5450):138-142.
- Bartel, P.A., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993a) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In: *Cellular interactions and development: A practical approach.* (Hartley, D.A., ed.) IRL Press, New York, pp 153-179.
- Bartel, P.A., Chien, C.-T., Sternglanz, R., Fields, S. (1993b) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *Biotechniques* 14: 920-924.
- Beffa, R., Szell, M., Meuwly, P., Pay, A., Vogeli-Lange, R., Metraux, J.P., Neuhaus, G., Meins, F., Nagy, N. (1995) Cholera toxin elevates pathogen resistance and induces pathogenesis-related gene expression in tobacco. *EMBO J.* 14: 5753-5761.
- Bellamacina, C.R. (1996) The nicotinamide dinucleotide binding motif: a comparison of nucleotide binding proteins. *FASEB J.* 10(11):1257-1269.
- Bestwick, C.S., Brown, I.R., Bennett, M.H.R., and Mansfield, J.W. (1997) Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Cell* 9:209-221.
- Biberstine-Kinkade, K.J., Yu, L., Dinauer, M.C. (1999) Mutagenesis of an arginine- and lysine-rich domain in the gp91<sup>phox</sup> subunit of the phagocyte NADPH-oxidase flavocytochrome b<sub>558</sub>. *J. Biol. Chem.* 274(15):10451-10457.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D. (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 12: 1425-1440.
- Blumwald, E., Aharon, G.S., Lam, B.C.-H. (1998) Early signal transduction pathways in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 3: 342-346.

- Bokoch, G.M. (1995) Regulation of the phagocyte respiratory burst by small GTP-binding proteins. *Trends Cell Biol.* 5: 109-113.
- Boller, T. (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 46:189-214.
- Bolwell, G.P., Davies, D.R., Gerrish, C., Auh, C.K., Murphy, T.M. (1998) Comparative biochemistry of the *oxidative burst* produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol.* 116: 1379-1385.
- Bolwell, G.P. (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr Opin Plant Biol* 2: 287-294.
- Bowles, D.J. (1990) Defense-related proteins in higher plants. *Ann. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
- Bonas, U., Van den Ackerveken G. (1997) Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant J.* 12(1):1-7.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J., (1992) Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant-cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* 70: 21-30.
- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989) The gene coding for the major birch pollen allergen Betv1, is highly homologous to a pea disease resistance response gene. *EMBO J.* 7:1935-1938.
- Brent, R., Ptashne, M. (1985) A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell.* 43(3 Pt 2):729-736.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R., Lamb, C. (1994) Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell* 6: 1703-1712.
- Broder, Y.C., Katz, S., Aronheim, A. (1998) The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein-protein interactions. *Curr Biol.* 8(20):1121-1124.
- Brown, J.W.S., Smith, P., Simpson, C.G., (1986) Arabidopsis consensus intron sequences. *Plant Mol. Biol.* 32: 531-535.
- Buchanan, B.B. *et al.*, (2000) Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland.
- Bucher, P (1990) Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoters. *J. Mol. Biol.* 212: 563-578.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Langebartels, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Camp, W. (1996) Transgenic tobacco with reduced catalase activity develops necrotic lesions and induces pathogenesis-related expression under high light. *Plant J.* 10:491-503.
- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, A., Inze, D., Van Camp, W., (1998) Defense activation and enhanced pathogen

tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 5818-5823.

Chandra, S., and Low, P.S. (1995) Role of phosphorylation in elicitation of the oxidative burst in cultured soybean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4120-4123.

Chandra, S., Stennis, M., and Low, P.S. (1997) Measurement of Ca<sup>2+</sup> fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. *J. Biol. Chem.* 272:28274-28280.

Chanock, S.J., El Benna, J., Smith, R.M., Babior, B.M. (1994) The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 269: 24519-24522.

Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D.F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262:1883-1886.

Chien, C.-T., Bartel, P.A., Sternglanz, R., Fields, S. (1991) The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9578-9582.

Collmer, A., Badel, J.L., Charkowski, A.O., Deng, W.-L., Fouts, D.E., Ramos, A.R., Rehm, A.H., Anderson, D.M., Schneewind, O., van Dijk, K., Alfano J.R. (2000) *Pseudomonas syringae* Hrp type III secretion system and effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8770-8777.

Conrath, U., Jeblick, W., Kauss, H. (1991) The protein kinase inhibitor, K252a, decreases elicitor induced Ca<sup>2+</sup> uptake and K<sup>+</sup> release, and increases coumarin synthesis in parsley cells. *FEBS Lett.* 279: 141-144.

Corbisier, P., Houbion, A., Remacle, J. (1987) A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.* 164: 240-247.

Cross, A.R., Erickson, R.W., Curnutte, J.T. (1999) The mechanism of activation of NADPH oxidase in the cell-free system: the activation process is primarily catalytic and not through the formation of a stoichiometric complex. *Biochem J.* 341 ( Pt 2):251-255.

Dancis, A., Roman, D.G., Anderson, G.J., Hinnebusch, A.G., Klausner, R.D. (1992) Ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae*: molecular characterization, role in iron uptake, and transcriptional control by iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89(9):3869-3873.

Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H., (1996) Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* 8: 1793-1807.

Davis, D., Merida, J., Legendre, L., Low, P.S., Heinsteins, P. (1993) Independent elicitation of the oxidative burst and phytoalexin formation in cultured plant cells. *Phytochemistry* 32: 607-611.

De Deken, X., Wang, D., Many, M.C., Costagliola, S., Libert, F., Vassart, G., Dumont, J.E., Miot, F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J. Biol. Chem.* 275(30):23227-23233.

Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.

- Delaney, T.P. (1997). Genetic Dissection of Acquired Resistance to Disease. *Plant Physiol.* 111:5-12.
- De Leo, F.R., Ulman, K.V., Davis, A.R., Jutila, K.L., and Quinn, M.T. (1996) Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67<sup>phox</sup> and flavocytochrome b to a common functional domain in p47<sup>phox</sup>. *J. Biol. Chem.* 271:17013-1702.
- De Leo, F.R., Olakanmi, O., Rasmussen, G.T., Lewis, T.S., McCormick, S.J., Nauseef, W.M., Britigan, B.E. (1999) Despite structural similarities between gp91<sup>phox</sup> and FRE1, flavocytochrome b<sub>558</sub> does not mediate iron uptake by myeloid cells. *J. Lab. Clin. Med.* 134(3):275-82.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Del Pozo, O., Lam, E. (1998) Caspases and programmed cell death in the hypersensitive response of plants to pathogens. *Curr. Biol.* 8(20):1129-1132.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Coffey, M.J., Neill, S.J. (1996) Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Lett.* 382:213-217.
- Desikan, R., Burnett, E.C., Hancock, J.T., Neill, S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of a homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.* 49(327): 1767-1771.
- De Silva, D., Davis-Kaplan, S., Fergestad, J., Kaplan, J. (1997) Purification and characterization of Fet3 protein, a yeast homologue of ceruloplasmin. *J. Biol. Chem.* 272(22):14208-14213.
- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W., Hall, A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* 265:531-533.
- Dietrich, A., Mayer, J.E., Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* 265:6360-6368.
- Dietrich, R.A., Delaney T.P., Uknes, S.J., Ward E. R., Ryals J. A., Dangl J.L. (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell.* 77: 565-577.
- Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., Dangl, J.L. (1997) A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* 88(5):685-694.
- Dinesh-Kumar, S.P., Baker, B.J. (2000) Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(4):1908-1913.
- Ding, H., Demple, B. (2000) Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(10):5146-5150.
- Dixon, R.A., and Paiva, N.L. (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7:1085-1097.

Doke, N., (1983a) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357.

Doke, N. (1983b) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23:359-367.

Doke, N. (1985) NADPH-dependent  $O_2^-$  generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol Plant Pathol* 27: 311-322.

Doke, N., Ohashi, Y. (1988) Involvement of a  $O_2^-$  generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32:163-175.

Doke, N., Miura, Y. (1995) *In vitro* activation of NADPH  $O_2^-$  generating system in a plasma membrane rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46: 17-28.

Dong, X. (1998) SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:316-323.

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B., Kauffmann, S. (1999) Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.* 121(1):163-172.

Doussiere, J., Gaillard, J., Vignais, P.V. (1999) The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for arylidonium compounds. *Biochemistry* 38(12):3694-3703.

Dupuy C, Ohayon R, Valent A, Noel-Hudson MS, Deme D and Virion A., (1999) Purification of a novel flavoprotein involved in the thyroid NADPH oxidase. Cloning of the porcine and human cDNAs. *J. Biol. Chem.* 274 (52), 37265-37269.

Durner, J., Gow, A.J., Stamler, J.S., Glazebrook, J. (1999) Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(25):14206-14207.

Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F., (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10328-10333.

Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell* 12: 963-977.

Dusi, S., Donini, M., Rossi, F. (1996) Mechanisms of NADPH oxidase activation: translocation of p40phox, Rac1 and Rac2 from the cytosol to the membranes in human neutrophils lacking p47<sup>phox</sup> or p67<sup>phox</sup>. *Biochem J.* 314 ( Pt 2):409-412.

Dwyer, S.C., Legendre, L., Low, P.S., and Leto, T.L. (1996) Plant and human neutrophil oxidative burst complexes contain immunologically related proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1289:231-237.

- Ebel, J., Scheel, D. (1992) Elicitor recognition and signal transduction . In: Plant gene research. Genes involved in plant defense. (Boller, T. Meins, F., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp: 183-205.
- Ebel, J., Scheel, D. (1997) Signals in host-parasite interaction. In: The mycota, Part A, Plant Relationships (Carroll, G., Tudzynski, P., eds.), Springer Verlag, Berlin, pp. 183-205.
- Ebel, J., and Mithöfer, A. (1998) Early events in the elicitation of plant defense. *Planta* 206:335-348.
- Ebert, B.L., Bunn, H.F. (1999) Regulation of the erythropoietin gene. *Blood* 94(6):1864-1877
- El Benna, J., Ruedi, J.M., Babior, B.M. (1994) Cytosolic guanine nucleotide-binding protein Rac2 operates in vivo as a component of the neutrophil respiratory burst oxidase. Transfer of Rac2 and the cytosolic oxidase components p47phox and p67phox to the submembranous actin cytoskeleton during oxidase activation. *J. Biol. Chem.* 269:6729
- Englund, P.T. (1993 ). The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62:121-138.
- Epple, P., Apel, K., Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 9(4):509-520.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* 18:265-276.
- Filippone, M.P., Diaz Ricci, J., Mamani de Marchese, A., Farias, R.N., Castagnaro, A. (1999) Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Lett.* 459(1):115-118.
- Finegold, A.A., Shatwell, K.P., Segal, A.W., Klausner, R.D., and Dancis, A. (1996) Intramembrane bis-heme motif for transmembrane electron transport conserved in a yeast iron reductase and the human NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 271:31021-31024.
- Finer, J.J., Vain, P., Jones, M.W., and McMullen, M.D. (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep.* 11:323-328.
- Finkel, T. (2000) Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett.* 476(1-2):52-54.
- Fields, S., Song, O.K., (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Flor, H.H. (1947) Host–parasite interactions in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology* 45:680-685.
- Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Freeman, J.L., Lambeth, J.D. (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47<sup>phox</sup> in vitro. *J. Biol. Chem.* 271(37):22578-22582.
- Fridovich, I. (1995) Superoxide radicals and superoxide dismutases. *Annu. Rev. Biochem.* 64: 97-112.

- Frohnmeier, H., Loyall, L., Blatt, M.R., and Grabov, A. (1999) Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free  $\text{Ca}^{2+}$  and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J.* 20:109-117.
- Geiszt, M., Kopp, J.B., Varnai, P., Leto, T.L. (2000) Identification of Renox, an NAD(P)H Oxidase in Kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 8010-8014.
- Gelli, A., Higgins, V.J., and Blumwald, E. (1997) Activation of plant plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* 113:269-279.
- Georgatsou, E., Alexandraki, D. (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 5:3065-3073.
- Glazener, J.A., Orlandi, E.W., Baker, C.J., (1996) The active oxygen response of cell suspensions to incompatible bacteria is not sufficient to cause hypersensitive cell death. *Plant Physiol.* 110: 759-763.
- Gómez-Gómez, L., and Boller, T. (2000) A LRR receptor-like kinase is involved in the perception of the bacterial elicitor, flagellin, in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 5:1003-1011.
- Gorzalczany, Y., Sigal, N., Itan, M., Lotan, O., Pick, E. (2000) Targeting of rac1 to the phagocyte membrane is sufficient for the induction of NADPH oxidase assembly. *J. Biol. Chem.* 275(51):40073-40081.
- Grant, J.J., Loake, G.J. (2000) Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance. *Plant Physiol.* 124: 21-30.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., Mansfield, J. (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* 4: 441-450.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M. (1994) Programmed cell death in plants: A pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* 77:551-563.
- Greenberg, J.T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:525-545.
- Groom, Q.J., Torres, M.A., Fordham-Skelton, A.P., Hammond-Kosack, K.E., Robinson, N.J., Jones, J.D.G. (1996) RbohA a rice homologue of the mammalian gp91<sup>phox</sup> respiratory burst oxidase gene. *Plant J.* 10: 515-522.
- Grosskopf, D.G., Felix, G., and Boller, T. (1990) K-252a inhibits the response of tomato cells to fungal elicitors in vivo and their microsomal protein kinase in vitro. *FEBS Lett.* 275:177-180.
- Guthrie, C., Fink, G.R. (1991) Guide to yeast genetics: Methods in Enzymology. Vol.194, Academic press, London.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989) Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:347-369.
- Hahlbrock, K., Scheel, D., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R., and Schmelzer, E. (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4150-4157.



- Hahn, M.G. (1996) Microbial elicitors and their receptors in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34:387-412.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186: 1-85.
- Hammond-Kosack, K.E., Jones, J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8(10):1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1997) Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:575-607.
- Hancock, J.T., Jones, O.T. (1987) The inhibition by diphenyleneiodonium and its analogues of superoxide generation by macrophages. *Biochem. J.* 242(1): 103-107.
- Hancock, R.E.W., Scott, M.G. (2000) The role of antimicrobial peptides in animal defenses *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 8856-8861.
- Harding, S.A., Oh, S.-H., Roberts, D.M., (1997) Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. *EMBO J.* 16: 1137-1144.
- Harlow, E.D., and Lane, E. (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Haufler, K.D., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1986) Elicitor-stimulated furanocoumarin-biosynthesis in parsley cells: S-adenosyl-L-methionine : bergapten and S-adenosyl-L-methionine: Xantholol-O-methyltransferases. *Z. Naturforsch.* 41c, 228-239.
- He, S.Y., Huang, H.-C., and Collmer, A. (1993) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* HarpinPss: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* 73:1255-1266.
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 315-319.
- Henderson L.M., Chappell, J.B. (1996) NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta* 1273:87-107.
- Hengen, P.N. (1997) False positives from the yeast two-hybrid system. *Trends Biochem. Sci.* 22(1):33-34.
- Heo, W.D., Lee, S.H., Kim, M.C., Kim, J.C., Chung, W.S., Chun, H.J., Lee, K.J., Park, C.Y., Park, H.C., Choi, J.Y., Cho, M.J. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc Natl Acad Sci.* 96(2):766-771.
- Higashijima, T., Uzu, S., Nakajima, T., and Ross, E.M. (1988) Mastoparan, a peptide toxin from wasp venom, mimics receptors by activating GTP-binding regulatory proteins (G proteins). *J. Biol. Chem.* 263:6491-6494.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science.* 275(5306):1649-1652.

- Ito, Y., Kaku, H., and Shibuya, N. (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J.* 12:347-356.
- Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P., Fields, S. (1993) Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8: 1693-1696.
- Jabs, T. (1994) Beteiligung von elicitorresponsiven Ionenkanälen an der Signaltransduktion zur Aktivierung der Pathogenabwehr in Petersilie. Dissertation an der Universität Tübingen.
- Jabs, T., Dietrich, R.A., Dangl, J.L., (1996) Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide. *Science* 273: 1853-1856.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4800-4805.
- Jacobson, M.D., Weil, M., Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell.* 88(3):347-354.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M., Bardwell, J.C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96(3):341-352.
- Kauss, H., Jeblick, W., Domhard, H. (1989) The degree of polymerization and N-acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharantus roseus*. *Planta* 178: 385-392.
- Kawasaki, T., Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., Shimamoto, K., (1999) The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 10922-10926.
- Keller, T., Damude, H.G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) A plant homologue of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell* 10: 255-266.
- Keppler, L.D., Baker, C.J., Atkinson, M.M. (1989) Active oxygen production during a bacteria induced hypersensitive reaction in tobacco suspension cells. *Phytopathology* 79: 974-978.
- Kieffer, F., Simon-Plas, F., Maume, B.F., Blein, J.P. (1997) Tobacco cells contain a protein, immunologically related to the neutrophil small G protein Rac2 and involved in elicitor-induced oxidative burst. *FEBS Lett.* 403(2):149-153.
- Kleinberg, M.E., Mital, D., Rotrosen, D., Malech, H.L. (1992) Characterization of a phagocyte cytochrome b<sub>558</sub> 91-kilodalton subunit functional domain: identification of peptide sequence and amino acids essential for activity. *Biochemistry.* 31(10):2686-2690.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D.A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J.M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(16):8849-8855.
- Klüsener, B., Weiler, E. (1999) Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes *FEBS Lett.* 459(2): 263-266.

- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T., Bokoch, G.M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* 254: 1512-1515.
- Koshkin, V., Pick, E. (1994) Superoxide production by cytochrome  $b_{559}$ . Mechanism of cytosol-independent activation. *FEBS Lett.* 338(3):285-289.
- Kozak, M., (1987a) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-8148.
- Kozak, M., (1987b) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 196(4):947-950.
- Kozak, M., (1991) An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control. *J. Cell Biol.* 115(4):887-903.
- Kretsinger, R.H. (1996) EF-hands reach out. *Nature Struct. Biol.* 3:12-15.
- Kroj, T. (1999) Mitogen-aktivierte Proteinkinasen – neue Signalelemente in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Lacomme, C., Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:7956-7961.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lamb, C., Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48:251-275
- Lambeth, J.D., Cheng, G., Arnold, R.S., Edens, W.A. (2000) Novel homologs of gp91<sup>phox</sup>. *Trends Biochem Sci.* 10 :459-461.
- Lee, J., Klüsener, J., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.C., Panopoulos, N.J. Nöller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield J.W., Nürnberger T. (2001) HrpZ<sup>PspH</sup> from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(1): 289-294.
- Legendre, L., Heinsteins, P.F., and Low, P.S. (1992) Evidence for participation of GTP binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* 267:20140-20147.
- Legendre, L., Rueter, S., Heinsteins, P.F., and Low, P.S. (1993) Characterization of the oligogalacturonide-induced oxidative burst in cultured soybean (*Glycine max*) cells. *Plant Physiol.* 102:233-240.
- Legrain, P., Dokhelar, M.C., Transy, C. (1994) Detection of protein-protein interactions using different vectors in the two-hybrid system. *Nucleic Acids res.* 22, 3241-3242.
- Leto, T.L., Lomax, K.J. Volpp, B.D., Nuno, H., Sechler, J.M., Nauseef, W.M., Clark, R.A., Gallin, J.L., Malech, H.L. (1990) Cloning of a 67-kDa neutrophil oxidase factor with similarity to a noncatalytic region of p60<sup>c-src</sup>. *Science* 248: 727-730.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C., (1994) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583-593.

- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C. (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr. Biol.* 6:427-437.
- Li, Y., Zhu, H., Kuppasamy, P., Roubaud, V., Zweier, J.L., Trush, M.A., (1998) Validation of lucigenin (bis-N-methylacridinium) as a chemilumigenic probe for detection superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. *J. Biol. Chem.* 273:2015-2023.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., and Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276:2054-2057.
- Lineweaver, H., Burk, D. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56: 658-666.
- Liochev, S.I., Benov, L., Touati, D., Fridovich, I. (1999) Induction of the soxRS regulon of *Escherichia coli* by superoxide. *J. Biol. Chem.* 274(14):9479-9481.
- Low, P.S., Merida, J.R. (1996) The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction. *Physiol Plant* 96: 533-542.
- Loyter, A., Scangos, G., Juricek, D., Keene, D., Ruddle, F.H. (1982) Mechanisms of DNA entry into mammalian cells. II. Phagocytosis of calcium phosphate DNA co-precipitate visualized by electron microscopy. *Exp: Cell Res.* 139(1):223-234.
- Lütcke, H.A., Chow, K.C., Mickel, F.S., Moss, K.A., Kern, H.F., Scheele, G.A. (1987) Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *EMBO J.* 6: 43-48.
- Ma, J., Ptashne, M., (1987) A new class of yeast transcriptional activators. *Cell* 51(1):113-119.
- Mano, S., Hayashi, M., Nishimura, M. (1999) Light regulates alternative splicing of hydroxypyruvate reductase in pumpkin. *Plant J.* 3:309-320.
- Martins, L.J., Jensen, L.T., Simon, J.R., Keller, G.L., Winge, D.R., Simons, J.R. (1998) Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273(37):23716-23721.
- May, M.J., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1996) Involvement of reactive oxygen species, glutathione metabolism, and lipid peroxidation in the Cf-gene-dependent defense response of tomato cotyledons induced by race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum*. *Plant Physiol.* 110:1367-1379.
- McDowell, J.M., Dangl, J.F. (2000) Signal transduction in the plant immune response, *Trends in Biochem. Sci* 25 (2): 79-82.
- McGuirl, M.A., Dooley, D.M. (1999) Copper-containing oxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(2):138-144.
- McLusky, S.R., Bennett, M.H., Beale, M.H., Lewis, M.J., Gaskin, P., Mansfield, J.W. (1999) Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarization, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant J.* 17: 523-534.
- Mehdy, M.C. (1994) Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol.* 105:467-472.

- Messerschmidt, A., Huber, R. (1990) The blue oxidases, ascorbate oxidase, laccase and ceruloplasmin. Modelling and structural relationships. *Eur.J.Biochem.* 187(2):341-352.
- Minet, M., Dufour, M.E., Lacroute, F. (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* 3:417-422.
- Mithöfer, A., Daxberger, A., Fromholdt, D., Ebel, J., (1997) Involvement of a NAD(P)H oxidase in the elicitor inducible oxidative burst of soybean. *Phytochem.* 45: 1101-1107.
- Mittler, R., Feng, X., Cohen, M. (1998) Post-Transcriptional Suppression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase Expression during Pathogen-Induced Programmed Cell Death in Tobacco. *Plant Cell* 10: 461-474.
- Mittler, R., Herr, E. H., Orvar, B. L., van Camp, W., Willekens, H., Inzé, D., Ellis, B. E. (1999). Transgenic tobacco plants with reduced capability to detoxify reactive oxygen intermediates are hyperresponsive to pathogen infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 14165-14170.
- Morel, F., Doussiere, J., Vignais, P.V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J- Biochem.* 201(3):523-546.
- Mur, L.A., Brown, I.R., Darby, R.M., Bestwick, C.S., Bi, Y.M., Mansfield, J.W., Draper, J. (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J.* (5):609-21.
- Murphy, T.M., Auh, C.K. (1996) The superoxide synthases of plasma membrane preparations from cultured rose cells. *Plant Physiol* 110: 621-629.
- Nakamura, Y., Ogiwara, S., Ohtaki, S. (1987) Activation by ATP of calcium-dependent NADPH-oxidase generating hydrogen peroxide in thyroid plasma membranes. *J. Biochem. (Tokyo)*102(5):1121-1132.
- Nakamura, Y., Ohtaki, S., Makino, R., Tanaka, T., Ishimura, Y. (1989) Superoxide anion is the initial product in the hydrogen peroxide formation catalyzed by NADPH oxidase in porcine thyroid plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 264(9):4759-4761.
- Nathan, C., Shiloh, M.U. (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97(16):8841-8848.
- Nennstiel, D., Scheel, D., and Nürnberger, T. (1998) Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett.* 431:405-410.
- Nisimoto, Y., Freeman, J.L., Motalebi, S.A., Hirshberg, M., Lambeth, J.D. (1997) Rac binding to p67<sup>phox</sup>. Structural basis for interactions of the Rac1 effector region and insert region with components of the respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* 272(30):18834-18841.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1994a) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449-460.

- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., Scheel, D., (1995) Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(6):2338-2342.
- Nürnberg, T. (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* 55:167-182.
- O'Donnell, B.V., Tew, D.G., Jones, O.T., England, P.J. (1993) Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* 290: 41-49.
- Osbourn, A.E., (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* 8: 1821-1831.
- Otte, O., Barz, W. (1996) The elicitor induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall proteins. *Planta* 176: 75-82.
- Paget, M.S., Kang, J.G., Roe, J.H., Buttner, M.J. (1998)  $\sigma^R$ , an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 1998 17(19):5776-5782.
- Park, J., Choi, H.J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z., Lee, Y. (2000) Rac-related GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells. *Plant Physiol.* 124(2):725-32.
- Parker, J.E., Schulte, W., Hahlbrock, K., Scheel, D. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4:19-27.
- Patel, B.N., David, S. (1997) A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes. *J. Biol. Chem.* 272(32):20185-20190.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E., Schroeder, J. (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* 406(6797):731-734.
- Peng, M., Kuc, J. (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82: 696-699.
- Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E., Harrison, K., Jones, J.D.G., (1998) Rapid, Cf-9- and Avr9-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1155-1166.
- Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C., (1999) Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* 4: 52-58.
- Potikha, T.S., Collins, C.C., Johnson, D.I., Delmer D.P., Levine, A. (1999) The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers. *Plant Physiol.* 119: 849-858.
- Prell, H.H. (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.
- Rajasekhar, V., Lamb, C., Dixon, R.A. (1999) Early Events in the Signal Pathway for the Oxidative Burst in Soybean Cells Exposed to Avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. *Plant Physiol.* 120: 1137-1146.

- Reeves, E.P., Dekker, L.V., Forbes, L.V., Wientjes, F.B., Grogan, A., Pappin, D.J., Segal, A.W. (1999) Direct interaction between p47phox und protein kinase C: evidence for targeting of protein kinase C by p47phox in neutrophils. *Biochem. J.* 344: 859-866.
- Renelt, A., Colling, C., Hahlbrock, K., Nürnberger, T., Parker, J.E., Sacks, W., Scheel, D. (1993) Studies on elicitor recognition and signal transduction in plant defence. *J. Exp. Bot.* 44: 257-268.
- Richberg, M.H., Aviv, D.H., Dangl, J.L. (1998) Dead cells do tell tales. *Curr. Opin. Plant Biol.* (6):480-485.
- Ride, J.P. (1983) Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (Callow, J.A., ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp 215-236.
- Robinson, N.J., Procter, C.M., Connolly, E.L., Guerinot, M.L. (1999) A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. *Nature*. 397(6721):694-7.
- Roman, D.G., Dancis, A., Anderson, G.J., Klausner, R.D. (1993) The fission yeast ferric reductase gene *frp1+* is required for ferric iron uptake and encodes a protein that is homologous to the gp91-phox subunit of the human NADPH phagocyte oxidoreductase. *Mol. Cell. Biol.* 13 (7), 4342-4350.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., Jones, J.D. (1999) Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell*. 1999 2:273-287.
- Romeis, T., Piedras, P., Jones, J.D.G., (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase (CDPK) in the plant defense response. *Plant Cell* 12: 803-815.
- Rossmann, M.G., Argos, P. (1975) A comparison of the heme binding pocket in globins and cytochrome b<sub>5</sub>. *J. Biol. Chem.* 250(18):7525-7532.
- Rotrosen, D., Yeung, C.L., Leto, T.L., Malech, H.L., Kwong, C.H. (1992) Cytochrome b<sub>558</sub>: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 256: 1459-1462.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L.M., Monaco, A.P., Goff, S.C., Newburger, P.E., Baehner, R.L., Cole, F.S., Curnutte, J.T., Orkin, S.H., (1986). Cloning the gene for an inherited human disorder chronic granulomatous disease on the basis of its chromosomal location *Nature*. 322 (6074), 32-38.
- Ryals, J., Uknes, S., Ward, E. (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 104: 4202-4205.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.-Y., and Hunt, M.D. (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 *EMBO* 17: 2596-2606.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Sanmartin, M., Pateraki, I. and Kanellis, A.K. Cloning and expression of two melon ascorbate oxidase genes during fruit development and ripening, and in response to various stress conditions, unpublished
- Sathyamoorthy, M., de Mendez, I., Adams, A.G., Leto, T.L. (1997) p40phox down-regulates NADPH oxidase activity through interactions with its SH3 domain. *J. Biol. Chem.* 272:9141-9146.
- Scheel, D. (1998) Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1:305-310.
- Scheel, D. (2000) Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: *Oxidative Stress in Plants* (Inzé, D., van Montagu, M., eds.), Harwood Academic Publishers, London (im Druck).
- Schiene, K., Puhler, A., Niehaus, K., (2000) Transgenic tobacco plants that express an antisense construct derived from a *Medicago sativa* cDNA encoding a Rac-related small GTP-binding protein fail to develop necrotic lesions upon elicitor infiltration. *Mol. Gen. Genet.* 263(5):761-770.
- Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Van Camp, W., Inzé, D., Langebartels, C., Sandermann, H. (1998) Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *Plant J.* 16(2):235-245.
- Schwacke, R., and Hager, A. (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  and protein-kinase activity. *Planta* 187:136-141.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J.M., Gaymard, F., Grignon, C. (1992) Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science*. 256(5057):663-665.
- Shatwell, K.P., Dancis, A., Cross, A.R., Klausner, R.D., Segal, A.W. (1996) The FRE1 ferric reductase of *Saccharomyces cerevisiae* is a cytochrome b similar to that of NADPH oxidase. *J. Biol. Chem.* 271(24):14240-14244.
- Sherrier, D.J., Prime, T.A., Dupree, P. (1999) Glycosylphosphatidylinositol-anchored cell-surface proteins from *Arabidopsis*. *Electrophoresis*. 20(10):2027-2035.
- Shiloh, M.U., MacMicking, J.D., Nicholson, S., Brause, J.E., Potter, S., Marino, M., Fang, F., Dinauer, M., Nathan, C. (1999) Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide synthase. *Immunity*. 10(1):29-38.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* 9:261-270.
- Skalnik, D.G., Strauss, E.C., Orkin, S.H. (1991) CCAAT displacement protein as a repressor of the myelomonocytic-specific gp91-phox gene promoter. *J. Biol. Chem.* 266(25):16736-16744.
- Solomon, K.R., Rudd, C.E., Finberg, R.W. (1996) The association between glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and heterotrimeric G protein alpha subunits in lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(12):6053-6058.



- Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. (1999) The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell* 11(3):431-444.
- Somssich, I.E., Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defense in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3: 86-90.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griendling, K.K., Lambeth, J.D., (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1 *Nature*. 401 (6748), 79-82.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K., Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270(5234):296-299.
- Sutherland, M.W. (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 39:79-94.
- Sutherland, M.W., Learmonth, B.A. (1997) The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic. Res.* 3: 283-289.
- Swoboda, I., Scheiner, O., Kraft, D., Breitenbach, M., Heberle-Bors, E., Vicente, O. (1994) A birch gene family encoding pollen allergens and pathogenesis-related proteins. *Biochim. Biophys. Acta*. 1219(2):457-464.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M., and Schofield, L. (1997). Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 4022-4027.
- Takahashi, K., Isobe, M., Muto, S. (1998) Mastoparan induces an increase in cytosolic calcium ion concentration and subsequent activation of protein kinases in tobacco suspension culture cells. *Biochim. Biophys. Acta* 5, 1401(3) : 339-346.
- Takos, A.M., Dry, I.B., Soole, K.L. (1997) Detection of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins on the surface of *Nicotiana tabacum* protoplasts. *FEBS Lett.* 405(1):1-4.
- Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P., and Pugin, A. (1995) Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells. *Plant Physiol.* 109:1025-1031.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1995) Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4158-4163.
- Tenhaken, R. und Thulke, O. (1996) Cloning of an enzyme that synthesizes a key nucleotide-sugar precursor of hemicellulose biosynthesis from soybean: UDP-glucose dehydrogenase. *Plant Physiol.* 112:1127-1134.
- Tenhaken, R., Rübel, C. (1998) Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expression screening. *Protoplasma* 205: 21-28.

The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Genome Initiative. Nature. 408(6814):796-815.

Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Penninckx, I.A.M.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P.A., and Broekaert, W.F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct pathogens. Proc. Natl. Acad. Sci. 95:15107-15111.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wie, Y., Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of  $H_2O_2$  in plants:  $H_2O_2$  accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. Plant J 11: 1187-1194.

Tornow, J., Santangelo, G.G. (1990) Efficient expression of *Saccharomyces cerevisiae* glycolytic gene ADH1 is dependent upon a cis-acting regulatory element UAS-PRG found initially in genes encoding ribosomal proteins. Gene. 90, 79-85.

Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1998) Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91<sup>phox</sup>). Plant J. 14:365-370.

Tschöpe M. (1999) Partielle Reinigung, Charakterisierung und Sequenzierung einer  $O_2^-$ -produzierenden NADPH-Oxidase aus *Petersilie*. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., and Ishida, I. (1997) The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 94:1029-1034.

Van Camp, W., Van Montagu, M. (1998)  $H_2O_2$  and NO: redox signals in disease resistance. Trends Plant Sci. 3: 330-333.

Vera-Estrella, R., Blumwald, E., Higgins, V.J. (1992) Effect of specific elicitors of *Cladosporium fulvum* on tomato suspension cells: evidence for the involvement of active oxygen species. Plant Physiol 99: 1208-1215.

Wallach, T.M., and Segal, A.W. (1997) Analysis of glycosylation sites on gp91<sup>phox</sup>, the flavocytochrome of the NADPH oxidase, by site-directed mutagenesis and translation in vitro. Biochem. J. 321:583-585.

Warm, E., Laties, G.G.(1982) Quantifikation of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. Phytochemistry 21: 827-831.

Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A., and Beer, S.V. (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science 257:85-88.

Weise, A., Barker, L., Kühn, C., Lalonde, S., Buschmann, H., Frommer, W.B. , Ward, J.M. (2000) A New Subfamily of Sucrose Transporters, SUT4, with Low Affinity/High Capacity Localized in Eucleate Sieve Elements of Plants. Plant Cell 12: 1345-1356.

Wientjes, F.B., Segal, A.W., Hartwig, J.H. (1997) Immunoelectron microscopy shows a clustered distribution of NADPH oxidase components in the human neutrophil plasma membrane. J. Leukoc. Biol. 61:303-312.

- Wirtz, W. (1993) Isolierung einer cDNA für Bergapto-O-Methyltransferase aus *Petersilie*. Diplomarbeit an der Universität Köln.
- Wojtaszek, P. (1997) Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322:681-692.
- Wu, G., Shortt, B.J., Lawrence, E.B., Levine, E.B., Fitzsimmons, K.C., Shah, D.M. (1995) Disease resistance conferred by expression of a gene encoding H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating glucose oxidase in transgenic potato plants. *Plant Cell.* 1995 9:1357-1368.
- Xing, T., Higgins, V.J., Blumwald, E. (1997) Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells. *Plant Cell* 9: 249-259.
- Yahraus, T., Chandra, S., Legendre, L., Low, P.S. (1995) Evidence for a mechanically induced oxidative burst. *Plant Physiol* 109:1259-1266.
- Yang, F., Naylor, S.L., Lum, J.B., Cutshaw, S., McCombs, J.L., Naberhaus, K.H., McGill, J.R., Adrian, G.S., Moore, C.M., Barnett, D. (1986) Characterization, mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (10), 3257-3261.
- Yang, Y., Shah, J., and Klessig, D.F. (1997) Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* 11:1621-1639.
- Youl, J.J., Bacic, A., Oxley, D. (1998) Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95(14):7921-7926.
- Yu, L., Zhen, L., Dinauer, M.C. (1997) Biosynthesis of the phagocyte NADPH oxidase cytochrome b<sub>558</sub>. Role of heme incorporation and heterodimer formation in maturation and stability of gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> subunits. *J. Biol. Chem.* 272(43):27288-27294.
- Yu, L., De Leo, F.R., Biberstine-Kinkade, K.J., Renee, J., Nauseef, W.M., Dinauer, M.C. (1999) Biosynthesis of flavocytochrome b<sub>558</sub>. gp91<sup>phox</sup> is synthesized as a 65-kDa precursor (p65) in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 274(7):4364-4369.
- Zhang, Z., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. (1995) Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* 8: 139-145.
- Zhou, F., Zhang, Z., Gregersen, P.L., Mikkelsen, J.D., de Neergaard, E., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. (1998) Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 117(1):33-41.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D., (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup> permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 2751-2755.

**Anhang 1: Sequenzen der für PCR-Reaktionen verwendeten Primer.**

NAME	SEQUENZ 5'-3'	BEMERKUNG
Rtaoh4rev2	ATG CCA ACA CCA GTT ACT CTT C	RT-PCR, aoh1
Rtaoh4forw2	GAT TGG TGA TTG GTA CAC TAG C	RT-PCR, aoh1
Rtaoh9forw2	GGC TCG ATA AAT GTG ACT GAT G	RT-PCR, aoh2
Rtrev2	CAT GTG TCA AGG TTC TCT GCT C	RT-PCR, aoh2
Rtox5forw00	GTC TTC TCA CAG CCA AGG GTG CAG	RT-PCR, rboh2
Rtox5rev00	CAC CTA ACT GTC GAA TGT GAA TGC	RT-PCR, rboh2
RT4forwn	ACG GTG ATG GAT GGT CTG AG	RT-PCR, rboh1
RT4revn	TCC TAC TTT CTG TCC CAG AG	RT-PCR, rboh1
18SrRNAfo	GAT GGT AGG ATA GTG GCC TA	RT-PCR, Kontrolle
18SrRNArev	TGG TTG AGA CTA GGA CGA TA	RT-PCR, Kontrolle
5Race2as	CCC TTG GCT GTG AGA AGA CAG TAA CCC	5'RACE, <i>rboh2</i>
5Race1as	TAA TGG CTT GGG CAG CTC CCG AGG CGC	5'RACE, <i>rboh1</i>
Scr5s	ATG CTT AGT GCA TCT GCA A	Herstellung einer rboh2-DIG-Sonde
Scr5as	CTG CTG CAC CCT TGG CTG T	Herstellung einer rboh2-DIG-Sonde
Ox5orfnots	ATT AGC GGC CGC ATG CTT AGT GCA TCT GCA	Subklonierung von rboh2 in pBIB-Pff19
Ox5orfnotas	TAA TGC GGC CGC TTA AAA ATG TTC CTT GTG	Subklonierung von rboh2 in pBIB-Pff19, Rev-Primer
Aoh4pucsts	TAA TGC GGC CGC ATG GCT TCT TTT AGC TCT C	Subklonierung von aoh1 in pBIB-Pff19
Aoh4pucstas	TAA TGC GGC CGC TTA CTG GAA CGT GGA TAC	Subklonierung von aoh1 in pBIB-Pff19, Rev-Primer
pBD-52s	TAT TGA ATT CGA TTT GCT AAA CAG CAT	Subklonierung von rboh2 in pGEX-5x-2 und pBD-HA
pBD-52as	AAT AGT CGA CAA AAT GTT CCT TGT GAA	Subklonierung von rboh2 in pGEX-5x-2 und pBD-HA
pBD-51s	TAT TGA ATT CAT GGA AGA ATT GGA TCC	Subklonierung von rboh2 in pBD-HA
pBD-51as_	ACT TTG TGCAAT AGT CGA CAT AAA CGA	Subklonierung von rboh2 in pBD-HA
PBD-42s	TAT TGA ATT CCT TTA CCA CAT TAA ACA	Subklonierung von rboh1 in pGEX-5x-2 und pBD-HA
PBD-42as	ATA AGT CGA CGA AGT TCT CCT TGT GAA	Subklonierung von rboh1 in pGEX-5x-2 und pBD-HA
Aoh4kpns	TAA TGG TAC CAT GGC TTC TTT TAG CTC TC	Subklonierung von aoh1 in pYES2
Aoh4kpnas	TAA TGG TAC CTT ACT GGA ACG TGG ATA C	Subklonierung von aoh1 in pYES2, Rev-Primer
Aoh4asBamHI	TAA TGG ATT CAT GGC TTC TTT TAG CTC T	Subklonierung von aoh1, rev-Primer
Aoh4asXho	TAA TCT CGA GTT ACT GGA ACG TGG ATA C	Subklonierung von aoh1, rev-Primer
Aoh4sense BamHI	TAA TGG ATT CTT ACT GGA ACG TGG ATA C	Subklonierung von aoh1
Aoh4senseXho	ATT ACT CGA GAT GGC TTC TTT TAG CTC T	Subklonierung von aoh1
Ox5senseBamHI	ATA AGG ATT CTT AAA AAT GTT CCT	Subklonierung von rboh2

	TGT G	
Ox5senseXho	ATT ACT CGA GAT GCT TAG TGC ATC TGC A	Subklonierung von rboh2
Ox5asXho	ATA ACT CGA GTT AAA AAT GTT CCT TGT G	Subklonierung von rboh2, Rev- Primer
Ox5asBamHI	ATA AGG ATT CAA TGG TAC TAC AAG ACG A	Subklonierung von rboh2, Rev- Primer
Ox5orfkpns	ATT AGG TAC CAT GCT TAG TGC ATC TGC A	Subklonierung von rboh2 in pYES2
5forwasppf19 (KpnI)	TAA TGG TAC CAA TGG TAC TAC AAG ACG A	Subklonierung von rboh2 in pYES2, Rev-Primer
Ox5pyesV5rev	AAA ATG TTC CTT GTG AAA TTC	Klonierung von rboh2 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Ox5topokozak	ATA ATG CTT AGT GCA TCT GC	Klonierung von rboh2 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Rboh1toporev	GAA GTT CTC CTT GTG AAA ATC AAA CTT TGT GG	Klonierung von rboh1 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Rboh1topokozak	GAA ATG GAG AAT CAA GAG TCT CAA GTT	Klonierung von rboh1 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Aoh4pyesV5rev	CTG GAA CGT GGA TAC AAA TGC	Klonierung von aoh1 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Aoh4topokozak	GTC ATG GCT TCT TTT AGC TCT C	Klonierung von aoh1 in pYES2.1/V5-His-TOPO und pEF6/V5-His-Topo
Aoh9kpns	GTC ATG GCC TCC TTT ACT TTT CTC TCA CGG TAC	Subklonierung von aoh2
Aoh9kpnas	GTA CGG TAC CTT ACT GGA A AT GGA TAA AAA TGC	Subklonierung von aoh2
g4uTs	CAT CTT GTA TTG GGG GCT CAC	Charakterisierung von <i>rboh1</i>
g4dTs	CTC CCT AGA AAA ACT AGG AAG	Charakterisierung von <i>rboh1</i>
Rtox4revi/e	AGA CTC TTT CAC TCC TAT GC	Charakterisierung von <i>rboh1</i>
Rtox4foe/i	TTG GCA AAT GCA TAG GAG TG	Charakterisierung von <i>rboh1</i>
AOH1s	GTI AT(ACT) TG(CT) GTI ACI ACI AA(CT) AA(CT) AA(CT) GT	Amplifikation von faoh1, 2
AOH2as	TC(AG) AA(CT) TG(AG) TC(CT) TGI GGI GG(CT) TCI GG	Amplifikation von faoh1, 2

**Anhang 2: cDNA-Sequenz von *rboh1* und abgeleitete Aminosäuresequenz**

Die DNA-Sequenz stromaufwärts vom *rboh1*-Translationsstartpunkt ist in Abb. 5 dieser Arbeit angegeben.

atggagaatcaagagtctcaagtgaagattcagaaagccgtggaagctcgaggcgaatc  
M E N Q E S Q V K D S E S R G S S R R I  
gccttttagcgggtccattagtctctagcaagatattatcaggaagcagaagaagtgcagg  
A F S G P L V S S K I L S G S R R S A R  
ttcaaagatgaaacaaacggaaacaatccatacattgaaataacttttagatgttgccaac  
F K D E T N G N N P Y I E I T L D V A N  
gattctttgttggtgcataacataaagggcactcctgatcaagaagctgccttaatagcg  
D S L L V H N I K G T P D Q E A A L I A  
agtcgtctagagaaacatccttcgtctttatctactcagctctcctctaagttgagacag  
S R L E K H P S S L S T Q L S S K L R Q  
atttccagagatataaagaacagcttttcgtctttctaaaagaagtacgcactcgaataac  
I S R D I K N S F S S S K R S T H S N N  
aaggttaatcacagcgcctcgggagctgcccagccattatgggattgaggtttatgcac  
K V N H S A S G A A Q A I M G L R F M H  
aaaaacacggaaaacgggtgatggatgggtctgaggttgaagcaagattcgatcaactttct  
K N T E N G D G W S E V E A R F D Q L S  
gtcgatggccagttgcctagatcttcctttggcaaatgcataggagtgaagagctctgct  
V D G Q L P R S S F G K C I G V K E S A  
gaatttatgggggaactgtttgatgcttttagctcgaagacggggcataaacttcacaaact  
E F M G E L F D A L A R R R G I T S S T  
gttaccaggaatgaattgcgaattctggaacagattacagacacaagttttgctgct  
V T K D Q L H E F W K Q I T D T S F D A  
aggctgcaaactcttcctcgatatgggtggacaaggatgccgatggtagaatcactcaagat  
R L Q T F F D M V D K D A D G R I T Q D  
gaagttaagagatcattacattaagtgtcttctgcaaataagctgacaaaaattgtagag  
E V K E I I T L S A S A N K L T K I V E  
tgcgcggtatgagtatgcagctctgataatggaagaacttgatccaagtaatcttggatat  
C A D E Y A A L I M E E L D P S N L G Y  
gttgagatgtacaatgtggaaatgctactattaagagccccacatgaggcagccttctct  
V E M Y N V E M L L L R A P H E A A F S  
gggacagaaagtaggatgctgagcaatttaataagcgataagcttggtccacaaaagat  
G T E S R M L S N L I S D K L V P P K D  
gaaagcttaatcaaaaagagggtaccggcggaattgggttacttcatacatgacaattggaag  
E S L I K R G Y R R I G Y F I H D N W K  
agactctggattctttgcttgtggcttttaatttgtgtaggcctattcacatggaaattt  
R L W I L C L W L L I C V G L F T W K F  
catcagtacaaggatagagcagtgatcatgtcatgggctactgcgtttgtgttgctaaa  
H Q Y K D R A V Y H V M G Y C V C V A K  
gggtggcgtgagacactgaaattcaacatggctctcattcttctgcctgtttgtagaaac  
G G A E T L K F N M A L I L L P V C R N  
accatcacatggctgaggagcaggactaggttgggacgtattattcctttcgatgataat  
T I T W L R S R T R L G R I I P F D D N  
gtcaatttccacaaggtaattgctactggaattgcaattggagtttgtttacatgtttatc  
V N F H K V I A T G I A I G V C L H V I  
ccacacttaacatgtgacttccctcggctactccattctacagacgaagaatatgttcct  
P H L T C D F P R L L H S T D E E Y V P  
atgaagcgttttttcggtcacacaaagtgaagtactgggtgtttttaagaggcactgag  
M K R F F G H Q P S E Y W W F L R G T E  
ggttggactggcataactatgttgggtgcttatgactatagcatttattttagccaaccca  
G W T G I T M L V L M T I A F I L A N P  
tggttttcgacaaaacaggcttcagctcccaaaaatgattaagcgcctcacaggatataat  
W F R Q N R L Q L P K M I K R L T G Y N  
gcattttgggtactctcaccatttgtttattattgtctatgttctcctcatcatccatgga  
A F W Y S H H L F I I V Y V L L I I H G  
acttttgtttatctttccaaggaatgggtaccataaaacaacatggatgtatgttgctatt  
T F V Y L S K E W Y H K T T W M Y V A I  
ccgatgatcttatatgggtattgaacgatttagttcgagcatttaggtctgggcacagaact

P M I L Y G I E R L V R A F R S G H R T  
 gtggaaattctgaaggttgctgtatacccggaacgtgatgtctttgcaatttactaaa  
 V E I L K V A V Y P G N V M S L Q F T K  
 cctcgaaaatttaaatacactagtgggcagtatatatgttaaactgctcaaaagtttct  
 P R K F K Y T S G Q Y I F V N C S K V S  
 ccagttgaatggcatccattttcactcacttcagctccaccagacgatcatctaagcctc  
 P V E W H P F S L T S A P P D D H L S L  
 catatccgaacagcaggtgactggacatcacagctgaaaacagtttctcccgggcttgcc  
 H I R T A G D W T S Q L K T V S P G L A  
 aaccatcggttagtgatcaaaagcggcctcttaagggcagacattacacaacaaaaccag  
 N H R V V I K S G L L R A D I T Q Q N Q  
 aacataaggttgccaaagctcctaactgatgggtccctatggagctccagcacaagactac  
 N I R L P K L L I D G P Y G A P A Q D Y  
 aaagaatacgaatccctcttctgattggcctcggttggtgcaacccctttaatcagc  
 K E Y D I L F L I G L G I G A T P L I S  
 attgtcaaagatgttctttaccacattaaacaaaagaaagatgaagagtcaggaatgatc  
 I V K D V L Y H I K Q K K D E E S G M I  
 gaaagtgccacaaaaaatcacagaagaaaaagccatttaacactacaaatgcctacttc  
 E S G T K N H K K K K P F N T T N A Y F  
 tactgggtgactcgtgaagaaggctcatttgaatgggttcaaaacgtgatgaatgaggtc  
 Y W V T R E E G S F E W F K N V M N E V  
 gcggaaaaggacacagaacatgtaattgagctgcacaattactgcacaagtgcttatgaa  
 A E K D T E H V I E L H N Y C T S V Y E  
 gaaggcgatgcacgggtccgctttgattgctatgcttcagtccttccagcatgctaaaaat  
 E G D A R S A L I A M L Q S F Q H A K N  
 ggtgtagacattgtatcagggacacgcgttaggacacatttcgctaggcccaattggcgt  
 G V D I V S G T R V R T H F A R P N W R  
 aacgaattcaagcatgttgagtcagtcacacactcctgataaacgagttggagtggtctactgc  
 N E F K H V A V K H P D K R V G V F Y C  
 ggtgctgcagctttaattcctgaactgaggcacttgtcccatgacttctctcggaacaa  
 G A A A L I P E L R H L S H D F S R K T  
 accacaaagtttgattttcacaggagaactttctgaatcactacatatatgaccaaataatg  
 T T K F D F H K E N F -  
 taaaagtacattctatctctacctatatcataatcatgcatgatatagtaatgccatgat  
 atgttttagcttattcatgcttactacaagtgtagccaaaatttggtgtaaaataacttaata  
 tagtattaccttcccatccgtaatgtaccttaacaacagtactgaaatttgcaaattgca  
 atgcagtaattttgagtttaatacgaataaaaaatttcttaagaaaaaaa

### Anhang 3: cDNA-Sequenz von *rboh2* und abgeleitete Aminosäuresequenz

agaactagtggatcccccggtgaggaattcggcacgagaactagtctctctctctttt  
 tattttgttatatacatggtattaaaagaagaagatgtatggaaccttgttttggattt  
 gtgaacgactcaatgttcatgactgcaattgttgccaattgtttattgaatttagtgag  
 agttgataatttctaacttagaaaactttgttggtatcaattttgacattttagatcata  
**atg**cttagtgcatctgcaataagttatcaagattaaaggaacaggctgaggaatatgca  
**M** L S A S A N K L S R L K E Q A E E Y A  
 gctttgattatggaagaattggatcccgaaagactcgggttatattgagttatggcagctg  
 A L I M E E L D P E R L G Y I E L W Q L  
 gaaacattactactacagaaagacacgtatctgaactacagccaagcactaagctacaca  
 E T L L L Q K D T Y L N Y S Q A L S Y T  
 agccaagccctgagccaaaacttagctggcttaagaaagaaaagttctatacaaaaaata  
 S Q A L S Q N L A G L R K K S S I Q K I  
 agcaciaaagttcgtttattatctagaagaaaactggaagagactttgggttctgtgtttc  
 S T K F V Y Y L E E N W K R L W V L C F  
 tggatttaataatggctggtttgtgtacttggagttcctttcagtataaagaaaagaat  
 W I L I M A G L C T T W K F Q Y K E K N  
 gcatacaaagtcattgggttactgtcttctcacagccaaggggtgcagcagagacgctcaa  
 A Y K V M G Y C L L T A K G A A E T L K  
 ttcaatatggcacttatattactgcctgtttgtaggaacattattacttgggttgagatcc  
 F N M A L I L L P V C R N I I T W L R S

accaagttaagttacgttgtgcccctttgacgacaatatcaactttcacaagactattgct  
T K L S Y V V P F D D N I N F H K T I A  
gcagccattgtgattggtgttatactccacgctggcaatcatctcgcatgcgatttccca  
A A I V I G V I L H A G N H L A C D F P  
aggcttataaacgagactgacgatcagttatcgaactatctggttaatgactttggacaa  
R L I N E T D D Q Y S N Y L V N D F G Q  
tataaaccacaagtacatcgaccttgttcgaggagttgaggggtgtgactggagtaattatg  
Y K P K Y I D L V R G V E G V T G V I M  
gtgatcttgatggccattgctttcgtacttgcaacaaaatggttcaggaggagccttggt  
V I L M A I A F V L A T K W F R R S L V  
aagctgcctaaaccatgggacaagctcactggctttaatgccttctactattcgaccac  
K L P K P W D K L T G F N A F Y Y S H H  
ttgtttgtcatagtttatgttttgcctcgtaattcatggcttgttcctctacctagtacat  
L F V I V Y V L L V I H G L F L Y L V H  
aaatgggtactacaagacgacatggatgtatcttggcattcccgttcttctatatgcaggg  
K W Y Y K T T W M Y L A I P V L L Y A G  
gaaagaaccctacgattctttcgatcaggattttcaactgtccatcttctaaaggtcgcc  
E R T L R F F R S G F S T V H L L K V A  
atctatcctggaaatgtactcgcatcgcagatgtccaagcctccacagtttcgctacaga  
I Y P G N V L A L Q M S K P P Q F R Y R  
agtggacagttacatgttcggttcagtggtccagttgtttctccttttgagtggcatccgttt  
S G Q Y M F V Q C P V V S P F E W H P F  
tccattacctcagctcctggagatgactatcttagcattcacattcgacagtttaggtgac  
S I T S A P G D D Y L S I H I R Q L G D  
tggaacacaagaactaaaaagagtattctcagaggcctgcgaacctcctatgggtggtaaa  
W T Q E L K R V F S E A C E P P M G G K  
agtgggctgcttagagctgatgagacaactaagaagagcttgccgaagcttttaatatagat  
S G L D L R A D E T T K K S L P K L L I D  
gggcccctatgggtgctccagcgcaagactacagggaaatatgatgtcttggtgcttggtggga  
G P Y G A P A Q D Y R K Y D V L L L V G  
ctcgggattggagcaacaccttttatcagttatgttgaaggatttgctaaacagcattgtc  
L G I G A T P F I S I L K D L L N S I V  
aaaatggaagagcaggcagaatcatcttcggatgcgagtaggtattctgatcagagtctt  
K M E E Q A E S S S D A S R Y S D Q S L  
gggacctctgattctggctcttttaaataaggttttctccaaaacagaggaaacctttaaaa  
G T S D S G S L N R F S P K Q R K P L K  
accaccaatgcctacttctactgggtcacaaggaggagcaagggttcatttgattgggtcaaa  
T T N A Y F Y W V T R E Q G S F D W F K  
ggcggttatgaatgaagtttctgaactagatcagaggggagttattgagatgcacaactat  
G V M N E V S E L D Q R G V I E M H N Y  
ttgaccagtgtttatgaagaaggagatgcccgttcagcacttatcaccatgggtacaagca  
L T S V Y E E G D A R S A L I T M V Q A  
ctaaacctagccaagaatgggggtgatgttgatctggcacaagggttcgaacacatttt  
L N H A K N G V D V V S G T R V R T H F  
gcaaggcctaattggaagaaagttttctcaagaatttgtagcgaacacgccaataaaaaga  
A R P N W K K V F S R I C T K H A N K R  
ataggggtgttctattgtggggcaccagtccttggctaaagaattaagcaatctctgctat  
I G V F Y C G A P V L A K E L S N L C Y  
gattacaatcaaaaaggcgccacgaaaatttgaatttcacaaggaacattttt**aa**agcaga  
D Y N Q K G A T K F E F H K E H F -  
cgcaggcacatttagtattactgatagtttaggtcacagaaaagcacatgaggatgaagaat  
atgtctagtttagtagtcttttggcctccactgaattatatatgaattaccatatacaaaag  
ttaccacctacatactacgtgataaaagccgtaaccgatatagaaaagcgagttgcatctg  
ttgaagtcatagatcagtgacaatgaaatgcaacattttgttaaacaaaatgcaattccc  
ttcaaatagagtttagtgaatcataattttgttgatattttgtgggagatcgaaaaaaca  
ccaaaatgggtgtattacggccctttggcaccattacaattgcagattgacaagtggcga  
gtgaataggttgacctcaaatggctgtgttagaagaggactgcagattactactaccttg  
atctcttctaaatttctgaagcgagcgagaagatttctcatgaaacgacgctgctgcatg  
agtattgtatagatgtgtatatattttcttctcttataaattacatacacgatagagga  
tggaagtgttaattataaatttatacaattcttataaattaatgaagggttcatactcaaaa  
aaaaaaaa



**Anhang 4: cDNA-Sequenz von *aoh1* und abgeleitete Aminosäuresequenz:**

ctgactgataatgtaaactttaaaaaagctacatTTTTGGTTATTTATCTTCTTCAAGCATC  
aaactttaagtaaattttcatggcttcttttagctctctctcactcctatTTTGTCTGCATT  
M A S F S S L S L L F V C I  
tctatgttctttagactactcttttagccgaagatgcaactattccttataatTTTGTGGTC  
S M F L S Y S L A E D A T I P Y N F V V  
tcttacataactgcctctctcttgggtgttccccaacagggttattgctattaatggcaaa  
S Y I T A S P L G V P Q Q V I A I N G K  
tttccaggccctgtcattaatgttactacaaacaacaatgttgtagttaatgttaagaac  
F P G P V I N V T T N N N V V V N V K N  
aaactagatgaagagctactaatgacttgggctgggtgttcagcagcgacgaacatcctgg  
K L D E E L L M T W A G V Q Q R R T S W  
caagatggagtgcttggcaccaactgtccaattcctccaaagtgggaattggacttacaat  
Q D G V L G T N C P I P P K W N W T Y N  
tttcaagtgaagatcagattgggagtttcttttacttcccttccctcaatTTTCAAAGG  
F Q V K D Q I G S F F Y F P S L N F Q R  
gcgtcgggtggTTTTGGTGGCATTATAATTAATAATCGGGCAGTTATCCCAATCCCTTTT  
A S G G F G G I I I N N R A V I P I P F  
gacccccacatgaagatattccaatcatgattgggtgattggtagactagcaaccatacg  
D T P H E D I P I M I G D W Y T S N H T  
gcactgagaaggacccttaacgggtgggaaagatcttgggtatgcccgatgggtgtacttata  
A L R R T L N G G K D L G M P D G V L I  
aatgggaaaggaccctatagatataatgattcacttgtgcctgatggattgactattta  
N G K G P Y R Y N D S L V P D G I D Y L  
acaatcgacgttcaccctggaaaaacttatcgacttcgtgtcagcaatgtcgggatatcg  
T I D V H P G K T Y R L R V S N V G I S  
actagtttgaacttcagaattcaaggccataacctgctcttagctgaaactgagggatca  
T S L N F R I Q G H N L L L A E T E G S  
tatacagtacaacagaactacactagcttagatattcatgtcgggcaaacatactctttc  
Y T V Q Q N Y T S L D I H V G Q T Y S F  
ttgctaactacggatcagaatgcaagtactgattattacatagtggaagtgaagattc  
L L T T D Q N A S T D Y Y I V A S A R F  
gtaaataaatcagtttggagaagagtaactgggtgttggcatcttacgctattcaattca  
V N E S V W R R V T G V G I L R Y S N S  
aaaggaaaggcatccggggcccttccagaagctccccaagatcaatttgacaaaacattc  
K G K A S G P L P E A P Q D Q F D K T F  
tcgatgaaccaagcaagggtccatcaggtggaatgtgtctgccagtggtgctcgtccaaac  
S M N Q A R S I R W N V S A S G A R P N  
ccacaagggttcatttagatatgggtcaatcaatgtgactgacgtatacgtactgagaaat  
P Q G S F R Y G S I N V T D V Y V L R N  
aagccacctgtgaccattgatggcaaacgacgtacaacacttaatggaatctcatttgtc  
K P P V T I D G K R R T T L N G I S F V  
aatcctcatacaccaatcagacttgcgtgaccggtacaaagtgaagaacgtttacaaggct  
N P H T P I R L A D R Y K V K N V Y K A  
gatttcccctctaggccaattacaggaccaccgaagatggaaacaaagatcattaatggc  
D F P S R R P I T G P P K M E T K I I N G  
acatttagaggatttatggaagtaattttccaaaacaatgacactaagatgcaaagctac  
T F R G F M E V I F Q N N D T K M Q S Y  
cacatggatggatatgcctTTTTGTAGTTGGGATGGATTATGGGGAGTGGTCAGAAAAT  
H M D G Y A F F V V G M D Y G E W S E N  
agtaggggaacatataataagtgggatggaattgctcgcgcaacgacacagggttttcctc  
S R G T N K W D G I A R A T T Q V F P  
ggcgcttggacagccgttttaattctcacttgacaatgttggaatttggaatataagagca  
G A W T A V L I S L D N V G I W N I R A  
gagaaccttgacacatggtatctaggccaagaaacgtatgtaaaggttgtcaatccagaa  
E N L D T W Y L G Q E T Y V K V V N P E  
cctactaacaaaacagagttgcctatccctgagaatgctctattctgtggaactctcagc  
P T N K T E L P I P E N A L F C G T L S  
aaactgcaaaagccgcaagacatttcttcagcaaaatcagtcacaagcaccaagtcaaag  
K L Q K P Q D I S S A K S V T S T K S K  
cttctctttcctctgctagtaatgggtatgtgcatttgtatccacgttccagtaagcaatt  
L L F P L L V M V C A F V S T F Q - A I

tcgaggattacgcaaatt**t**aaagtagcccgcggggtgcattacttgcttaatttggtactt  
S R I T Q I -  
gtgagtgtcaattaggttttaaattgcaggcttgttgatagcaaaacattgattagttct  
ttttgttcccgacttaagctcccggaatctatatatttatctggatgatcattct  
twnnwtatcagaaaaaaaaaaaaaaaaa

## Anhang 5: cDNA-Sequenz von *aoh2* und abgeleitete Aminosäuresequenz

gctcgaaattaacctcactaaggggaacaaaagchggagctcgcgcgcctgcaggctcgac  
actagtggatccaaagaattcggcacctgttctactctccctcctcaactttctctcctg  
ctctctctttttctctgtacttcttttctttctctagcttacttcaatctgataatgtaa  
acttaaaaaaaccaagattttttagttatatatccacttcattcatcaactttaagtaatt  
aac**at**ggcctcctttacttttctctcacttctttttgtgtacatttctcttttcttgagc  
**M** A S F T F L S L L F V Y I S L F L S  
tactcttatgcccgaagatgctactgtcagttatgattttgtggtctcttacatcactgct  
Y S Y A E D A T V S Y D F V V S Y I T A  
tctcctcttggtgttccccaacagggtattgctataaatggaaagtttccaggccctggt  
S P L G V P Q Q V I A I N G K F P G P V  
ataaatgttactacaaacaacaatgttaaagttaatgttaaaaaataaactagatgaagac  
I N V T T N N N V K V N V K N K L D E D  
ctcctaatacttggtggtgttcagcagcggcgcaacttcttggaagatggagtgtc  
L L M T W D G V Q Q R R T S W Q D G V L  
ggtagcaactgtccaatcctccaaagtgggaattggacttacaaattttcaagtaaaagat  
G T N C P I P P K W N W T Y N F Q V K D  
cagattggggagtttcttttacttcccttcgcttaattttcaacgagcctccgggtggtttt  
Q I G S F F Y F P S L N F Q R A S G G F  
ggaggcattattattaataatagagaagtgttgcaattccttttgcaaatccggatgag  
G G I I I N N R E V I A I P F A N P D E  
gatgttccagtcattgattggtgattggtacactagtaaccacacggcactgagaagaacc  
D V P V M I G D W Y T S N H T A L R R T  
cttaacgggtggaaaagatcttggtatgccagatggtgttcttattaatggaaaaggcccg  
L N G G K D L G M P D G V L I N G K G P  
tatagatataatgatacacttgtgcctgagggcattgactatgaaacaattgatgttcac  
Y R Y N D T L V P E G I D Y E T I D V H  
cctgggtaaaacttatcgatttcgtgtcagcaatgtcgggatatcaactagtttaacttc  
P G K T Y R F R V S N V G I S T S L N F  
agaattcagaatcataaccttctatttagcggaaactgagggatcatatacgggtacaacag  
R I Q N H N L L L A E T E G S Y T V Q Q  
aactatactagcttagatatacatgtcggacaaacataactcttttcttggttaacaatggat  
N Y T S L D I H V G Q T Y S F L V T M D  
cagaatgcaagtactgattattacatagtagcaagtgcagatttgtaaatgaatcagtt  
Q N A S T D Y Y I V A S A R F V N E S V  
tggagaagaggttaccgggtgttggtggttttgcgctattcaaattccaaaggaaaggcatct  
W R R V T G V G I L R Y S N S K G K A S  
ggcccccttccggaaccaccacaggatcagtttgacaaaaacatttctcaatgaaccaagca  
G P L P E P P Q D Q F D K T F S M N Q A  
aggtccatcaggtggaatgtgtctgccagtggtgctcgcccaaaccacacaggttctttt  
R S I R W N V S A S G A R P N P Q G S F  
aaatatggctcgataaatgtgactgatgtatacgtattaagaaataagccacctgtaact  
K Y G S I N V T D V Y V L R N K P P V T  
attgatggcaaacgacgtacaacacttaatgggatctcatttgtcaatcctcacacacca  
I D G K R R T T L N G I S F V N P H T P  
atcagacttgctgattgggttcaagggtgaagaatgtatacaaagctgactttcccaaaggg  
I R L A D W F K V K N V Y K A D F P K G  
ccaattactggacctccaaagatggaaacaaacataataaatggcacatttagaggattt  
P I T G P P K M E T N I I N G T F R G F  
atggaagtaataatttcaaaacaatgactccaagatgcaaagctaccacatggatggatat  
M E V I F Q N N D S K M Q S Y H M D G Y  
gcattttttgtagtaggaatggactatggtgagtgagcaataacagtaggggaacatat  
A F F V V G M D Y G E W T N N S R G T Y

aataagtgggatggtattgctcgctccacgacacaggttttccccggagcatggacagcc  
N K W D G I A R S T T Q V F P G A W T A  
gttttaatctcacttgacaatggttggaatatggaatataagagcagagaaccttgacaca  
V L I S L D N V G I W N I R A E N L D T  
tggtatctcggccaagaaaacgtacgtaaagggttgcaatccagaacctaatacaaaaaca  
W Y L G Q E T Y V K V V N P E P T N K T  
gaattgcccattccccgataatgtgctatactgtggcgctctcagcaaacgacaaaagcca  
E L P I P D N V L Y C G A L S K R Q K P  
caagacgtttcttcagcaacgtcggatcatgagccatgagtcgaagattttctttactctg  
Q D V S S A T S V M S H E S K I F F T L  
ctactggatggtgctgcatTTTTATCCATATCCAGTAAgcattttccagcattgatgca  
L L V M C A F L S I F Q -  
aatctgaagtagtgcgaggagcatcacttgcttattttggacttggttagtgggcatctcag  
ttgcgcattttccaggattggtgatagcataacttaatttattaattttcgttcttacatg  
tgctaaaagcycctgattgtcaatttatttggattcttaycctttcagtatacaatttat  
ttattcttgtaatgactawtcttcagatttcaatgcaatatacnnnnatcaacaaaaaaa  
aaaaaaaaaa

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr Dierk Scheel für die Überlassung des interessanten Themas und die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Die richtungsweisende und freundschaftliche Unterstützung, die ich bei der Entstehung der Dissertation erfuhr, waren für das Gelingen ebenso wichtig, wie die Möglichkeit des selbstständigen Arbeitens.

Danken möchte ich natürlich den Kollegen des Institutes, die, sei es durch ihren Rat oder auch nur, indem sie zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen, ihren Anteil an dem Zustandekommen der Arbeit haben.

In diesem Zusammenhang gilt mein Dank den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Signaltransduktion“ und besonders Beatrix Blume und Thomas Kroj, die mit ihren Anregungen viel Hilfe leisteten. Für das angenehme und produktive Arbeitsklima im Labor möchte ich mich auch bei Catherine Kistner, Markus Tschöpe, Franky Terras, Justin Lee, Jason Rudd, Udo Roth, Magda Krzymowska, Anne Varet und Frédérique Brunner bedanken.

Zahlreiche Anregungen für die Arbeiten mit dem Hefe-System erhielt ich von Dr. Stephan Clemens und Dr. Ulrich Eckhardt. Herzlichen Dank!

Bei Frau Helga Nixdorf und Frau Jutta Elster möchte ich mich vor allem für die Hilfe bei der Bereitstellung der Zellkulturen bedanken. Bei Frau Weiß bedanke ich mich für die Sequenzierung vieler Proben.

Dr. Jacek Hennig danke ich für die Überlassung des pBIB-PFF19-Plasmides.

Dr. Dirk Esser danke ich für seine Hilfe und Zusammenarbeit bei der Durchführung der Expressionsversuche in NIH-3T3 Zellen.

---

## Lebenslauf

Name: Heidi Zinecker  
Geburtsdatum: 12.12.67  
Geburtsort: Bahrendorf (Sachsen-Anhalt)  
Wohnort: Beesener Str. 250, 06110 Halle

### Ausbildung:

1974-77	Oberschule Kleinwanzleben
1977-82	44. Oberschule Berlin-Lichtenberg
1982-86	Spezialschule für Fremdsprachen „J.-G.-Herder“ Berlin-Lichtenberg (Abitur im Juli, 1986) Ausbildung als Außenhandelskauffrau im VEB AHB Spielwaren und Sportartikel, Berlin, Facharbeiterprüfung im Mai 1988
1988-91	Chemiestudium an der Martin-Luther-Universität zu Halle
1991-95	Biochemiestudium an der Martin-Luther-Universität zu Halle, Diplomprüfung im Studiengang Biochemie Diplomarbeit im Institut für Mikrobiologie der MLU-Halle, Titel der Arbeit: Isolierung und Charakterisierung der L-Serin-Dehydratase aus <i>Clostridium sticklandii</i> .
1996-00	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale, Abt. Stress- und Entwicklungsbiologie. Anfertigung einer Promotionsarbeit unter der Betreuung von Prof. Dr. Dierk Scheel

---

## **Erklärung**

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

Halle, den 5. Januar 2001

Heidi Zinecker