

# Charakterisierung einer PAMP-induzierten Phosphoinositid-5-Phosphatase aus *Solanum tuberosum*

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
- Biowissenschaften -  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von  
Frau Juliane Rausche

Gutachterinnen und Gutachter:

1. Prof. Dr. Sabine Rosahl, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie
2. Prof. Dr. Ingo Heilmann, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
3. Prof. Dr. Thomas Ott, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15. Dezember 2023



## Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Die Pflanzliche Abwehr.....	1
1.2	Physische Abwehr .....	1
1.3	Durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster aktivierte frühe Immunantwort (PTI).....	1
1.4	Durch intrazelluläre Effektoren-vermittelte Immunantwort .....	3
1.5	Subzelluläre Membrantransportprozesse in der pflanzlichen Abwehr .....	4
1.6	Die <i>Phytophthora infestans</i> - <i>Solanum tuberosum</i> -Interaktion .....	6
1.7	Der Infektionszyklus von <i>P. infestans</i> .....	7
1.8	Das Haustorium .....	8
1.9	PTI in <i>S. tuberosum</i> .....	9
1.10	Ziele von <i>P. infestans</i> Effektoren in <i>Solanaceae</i> .....	10
1.11	Pflanzliche Membranen .....	10
1.12	Phosphoinositide.....	11
1.12.1	Die Biosynthese von Phosphoinositiden .....	11
1.12.2	Die Degradation von Phosphoinositiden.....	13
1.13	Die Subzelluläre Organisation und Funktion von Phosphoinositiden .....	14
1.14	Phosphoinositide und pflanzliche Abwehr.....	15
1.15	Zielstellung .....	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Verwendete Medien, Oligonukleotide, Vektoren .....	18
2.2	Verwendete Chemikalien .....	21
2.3	Verwendete Pflanzen .....	21
2.4	Verwendete <i>P. infestans</i> -Isolate .....	21
2.5	Bakterien .....	21
2.6	Peptide .....	21
2.7	Vermehrung und Anzucht der verwendeten Pflanzen.....	22
2.8	Transformation.....	22
2.8.1	Transformation von Bakterien .....	22
2.8.2	Transformation von <i>N. benthamiana</i> .....	22
2.8.3	<i>Agrobacterium</i> -vermittelte Blattscheibentransformation von <i>S. tuberosum</i> .....	23
2.8.4	Transfektion von <i>A. thaliana</i> -Protoplasten .....	23

---

2.9	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
2.10	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren .....	24
2.11	Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten.....	24
2.12	Klonierung .....	24
2.13	DNA-Isolierung .....	25
2.14	RNA-Isolierung.....	25
2.15	Southern Blot .....	25
2.16	Northern Blot .....	26
2.17	Analyse des Transkriptgehaltes.....	26
2.18	<i>StIPP</i> -Expression in <i>E. coli</i> und Aufbereitung des Lysats für enzymatische Assays 26	
2.19	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	27
2.20	Western Blot .....	27
2.21	Quantifizierung mittels SPL-Kit.....	28
2.22	Strippen der Proteinmembran nach FLS2-Detektion.....	28
2.23	Enzymatische Assays .....	28
2.23.1	Phosphatase-Assay (Dephosphorylierungsassay) .....	28
2.23.2	<i>In vitro</i> Lipid-Kinase-Test (Rephosphorylierungstest) .....	29
2.24	Konfokale Mikroskopie transient transformierter Tabakepidermiszellen.....	29
2.25	Elektronenmikroskopie <i>P. infestans</i> -infizierter <i>S. tuberosum</i> -Blätter .....	29
2.26	Verwundung von Pflanzenzellen.....	30
2.27	<i>P. infestans</i> -Inokulation.....	30
2.28	Elizitierung von Pflanzenzellen mit Pep-13 .....	30
2.29	ROS-Analyse .....	31
3	Ergebnisse .....	33
3.1	Identifizierung Pep-13-aktivierter Vesikeltransport-assoziiertes Gene .....	33
3.2	Dynamische Transkriptgehalte des <i>StIPP</i> -Gens.....	36
3.2.1	Transkriptgehalte nach Pep13-Infiltration .....	36
3.2.2	Transkriptgehalte nach Infektion mit <i>P. infestans</i> .....	38
3.2.3	Transkriptgehalte nach Verwundung .....	38
3.3	Enzymatische Aktivität des <i>StIPP</i> -Genproduktes .....	39
3.4	Identifizierung putativer löslicher Substrate.....	40
3.5	Identifizierung putativer PI-Substrate.....	42

---

3.6	Identifizierung des Reaktionsproduktes .....	43
3.7	Phylogenetische Analyse .....	44
3.8	Analyse transgener <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen mit modifizierter <i>StIPP</i> -Expression.....	46
3.8.1	Generierung von <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen mit verringerter oder erhöhter <i>StIPP</i> -Expression .....	46
3.8.2	Einfluss der <i>StIPP</i> -Überexpression auf Bildung callosehaltiger Papillen um <i>P. infestans</i> -Haustorien .....	48
3.8.3	Einfluss der veränderten <i>StIPP</i> -Expression auf die <i>P. infestans</i> -Biomasse in <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen .....	50
3.8.4	Einfluss der veränderten <i>StIPP</i> -Expression auf die PAMP-abhängige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies .....	53
3.9	Transiente <i>StIPP</i> -Expression.....	62
3.10	Transiente <i>StIPP</i> -Expression in <i>N. benthamiana</i> -Blättern .....	62
3.11	<i>In vivo</i> Effekte der <i>StIPP-GFP</i> -Expression auf die Abundanz von PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> und PtdIns4P .....	67
3.12	<i>StIPP</i> -Überexpression beeinflusst die Abundanz des FLS2-Rezeptors in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten .....	70
4	Diskussion.....	73
4.1	Eine PM-lokalisierte Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat-Phosphatase wird im Rahmen der Abwehrantwort aktiviert .....	73
4.2	<i>StIPP</i> lokalisiert an den Haustorien in <i>P. infestans</i> -infizierten Pflanzen .....	75
4.3	<i>S. tuberosum</i> -Pflanzen mit veränderter <i>StIPP</i> -Expression zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Suszeptibilität, Callose-Sekretion oder ROS-Produktion im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen .....	76
4.3.1	Callose in <i>P. infestans</i> -infizierten <i>StIPP</i> -überexprimierenden Pflanzen.....	77
4.3.2	ROS-Produktion nach PAMP-Behandlung.....	79
4.4	FLS2 akkumuliert bei Überexpression der <i>StIPP</i> in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten.....	81
5	Zusammenfassung.....	85
6	Anhang .....	86
7	Abbildungsverzeichnis.....	97
8	Tabellenverzeichnis.....	99
9	Literaturverzeichnis.....	100



---

## Abkürzungsverzeichnis

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CaMV 35S	Blumenkohlmosaikvirus ( <i>cauliflower mosaic virus</i> )
CME	Clathrin-vermittelte Endozytose ( <i>clathrin-mediated endocytosis</i> )
DAG	Diacylglycerol
DAMP	Schaden-assoziiertes molekulares Muster ( <i>damage associated molecular pattern</i> )
DGK	Diacylglycerolkinase
dpi	Tage nach Inokulation/Infiltration ( <i>days post inoculation/infiltration</i> )
EHM	Extrahaustorielle Membran
ETI	Effektor-vermittelte Immunität
ETS	Effektor-vermittelte Suszeptibilität
EV	Leervektor ( <i>empty vector</i> )
Exp.	Experimente
FLS2	Flagellin-sensitiv 2
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
h	Stunden
hpw	Stunden nach Verwundung ( <i>hours post wounding</i> )
hpi	Stunden nach Infektion/Infiltration ( <i>hours post infection/infiltration</i> )
JA	Jasmonsäure ( <i>jasmonic acid</i> )
K	Kontrolle
LRR	Leucin-reiche Wiederholung ( <i>leucine rich repeat</i> )
MAMP	Mikroben -assoziierte molekulare Muster
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Min	Minuten
n	Gesamtzahl der Replikate
<i>N. benthamiana</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PI	Phosphoinositide
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>

---

PM	Plasmamembran
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns4P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PtdIns(4,5)P <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PtdIns5P	Phosphatidylinositol-5-Phosphat
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
RbohD	<i>Respiratory Burst Oxidase Homolog D</i>
RFP	rot-fluoreszierendes Protein
RLK	Rezeptor-ähnliche Kinasen ( <i>receptor like kinase</i> )
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	Interferenz-RNA
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
StIPP	<i>Solanum tuberosum</i> Inositolpolyphosphat-phosphatase
<i>S. tuberosum</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
vs.	versus

# 1. Einleitung

Pflanzen befinden sich in einem ständigen Austausch mit ihrer Umwelt. Dabei bestimmen nicht nur abiotische Faktoren, wie zum Beispiel Temperatur oder die Verfügbarkeit von Licht und Wasser, die pflanzliche Entwicklung, sondern maßgeblich auch biotische Faktoren. Eine besondere Art der biotischen Wechselbeziehung ist die Interaktion von Pflanzen mit Mikroorganismen, wie z. B. Bakterien, Pilzen oder Oomyceten. Handelt es sich bei den Mikroorganismen um Pathogene, kann diese Interaktion von besonderer Bedeutung sein, da Pflanzen-Krankheiten direkt oder indirekt die Verfügbarkeit und Sicherheit der menschlichen Hauptnahrungsgrundlage gefährden. So haben Pflanzen einen Anteil von über 80 % an menschlichen Nahrungsmitteln und stellen die primäre Nahrungsquelle in der Viehwirtschaft dar (Rizzo *et al.*, 2021).

## 1.1 Die Pflanzliche Abwehr

In den letzten Jahrzehnten wurden Aspekte der pflanzlichen Abwehr immer besser verstanden. Dabei stammt ein großer Teil des Wissens über pflanzliche Abwehrreaktionen von Arbeiten mit dem Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, aber auch aus Studien mit verschiedenen Nutzpflanzen wie Mais (*Zea mays*) oder Kartoffel (*Solanum tuberosum*).

Aufgrund des Fehlens eines adaptiven Immunsystems mit beweglichen Immunzellen, beruht die pflanzliche Abwehr auf dem sogenannten angeborenen Immunsystem (Nürnberger *et al.*, 2004). Dabei lassen sich die komplexen Prozesse der pflanzlichen Abwehr in mehrere Ebenen unterteilen, auf welche nachfolgend genauer eingegangen wird.

## 1.2 Physische Abwehr

Die erste Ebene bildet die konstitutiv vorhandene physische Barriere bestehend aus epidermaler Kutikula sowie der Zellwand. Gemeinsam mit in der Zellwand akkumulierten Sekundärmetaboliten erschwert diese Barriere das Eindringen und die Vermehrung pathogener Mikroorganismen. Jedoch haben einige solcher Pathogene im Zuge der Ko-Evolution Mechanismen entwickelt, diese physische Barriere zu überwinden. Dazu gehört die Sekretion zellwandabbauender Enzyme. Ein Beispiel für ein solches sezerniertes Enzym aus *Phytophthora*-Species ist die Xyloglucan-spezifische Endo-beta-1,4-glucanase 1 (XEG1), ein Mitglied der Glycosidhydrolase-Familie 12 (Ma *et al.*, 2015). Die von XEG1 hervorgerufene Beschädigung der pflanzlichen Zelle setzt sogenannte DAMPs (*damage associated molecular patterns*) frei. Diese DAMPs können durch pflanzliche membranständige Mustererkennungs-Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) erkannt werden und nachfolgend eine Abwehrantwort auslösen (Bacete *et al.*, 2018). Damit spielt die Zellwand nicht nur eine Rolle als physische Barriere, sondern auch als Signalgeber bei der Aktivierung von Abwehrantworten gegen invasive Pathogene.

## 1.3 Durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster aktivierte frühe Immunantwort (PTI)

Die direkte Erkennung von Pathogenen erfolgt anhand spezifischer und hochkonservierter Strukturen, sogenannter Pathogen- bzw. Mikroben-assoziiierter molekularer Muster

(*pathogen/microbe-associated molecular patterns*, PAMPs/MAMPs, nachfolgend als PAMPs bezeichnet). PAMPs können sich, wie z. B. Chitin oder Flagellin, in oder auf der Pathogenoberfläche befinden und Teil konservierter Moleküle, wie XEG1, sein und werden analog zu DAMPs durch PRRs erkannt (Chinchilla *et al.*, 2006, Miya *et al.*, 2007, Petutschnig *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2018). PRRs besitzen als membranständige Rezeptoren eine Transmembrandomäne und eine Ektodomäne, über die die Ligandbindung erfolgt. Die PRRs können in Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs, receptor-like kinases) und Rezeptor-ähnliche Proteine (RLPs, receptor-like Proteins) unterschieden werden, wobei RLKs sich durch eine zusätzliche zytoplasmatische Kinase-Domäne auszeichnen, welche bei RLPs fehlt (Boutrot and Zipfel, 2017). Eine weitere Klassifizierung der PRRs ist entsprechend der Struktur ihrer Ektodomäne möglich, so können Leucine-rich repeat (LRR)-, Lysin-Motiv (LysM)-, Lectin- und Epidermaler Wachstumsfaktor- (epidermal growth factor, EGF-) ähnliche Domänen unterschieden werden (Bentham *et al.*, 2020). LRR-Domänen-enthaltende PRRs binden hauptsächlich Peptid- oder Protein-Liganden, während EGF-ähnliche, LysM- und Lectin-Domänen Kohlehydrate bzw. nicht proteinartige Liganden binden (Bentham *et al.*, 2020). Die Aktivität und Verfügbarkeit inaktiver und aktivierter Rezeptoren an der Zelloberfläche werden durch verschiedene Prozesse streng reguliert. Zum einen erfolgt dies durch Kontrolle der posttranslationalen Modifizierungen, wie Phosphorylierungen, Glykosylierungen und Ubiquitinierungen der Rezeptoren selbst oder interagierender Kinasen, zum anderen über die Kontrolle ihres Transports und der Membraninsertion durch Vesikeltransportprozesse (vergleiche Kapitel 1.2.4) (Beck *et al.*, 2012, Ben Khaled *et al.*, 2015, Mbengue *et al.*, 2016, Trempel *et al.*, 2016, Bentham *et al.*, 2020).

Für die Perzeption und Signalweiterleitung durch PRRs werden häufig weitere Proteine benötigt, die als Co-Rezeptoren bezeichnet werden (Macho and Zipfel, 2014, Bentham *et al.*, 2020). Dazu gehören Vertreter der Klasse der SERKs (*somatic embryogenesis receptor kinases*) wie BAK1 (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1-assoziierte Rezeptor Kinase 1*)/SERK3 (Chinchilla *et al.*, 2009, Roux *et al.*, 2011). BAK1 bildet Heterokomplexe sowohl mit LRR-RLKs als auch mit LRR-RLPs, wobei einige LRR-RLPs zusätzlich noch die Anwesenheit der LRR-RLK SOBIR1 (suppressor of Bir 1-1) für die Signalweiterleitung erfordern (Schellenberger *et al.*, 2019, van der Burgh *et al.*, 2019, Bentham *et al.*, 2020). Für Chitin-bindende LysM-RLKs und -RLPs ist bekannt, dass diese Rezeptoren Homodimere oder Heterodimere mit anderen LysM-RLKs bilden (Bentham *et al.*, 2020). Zu den besonders gut erforschten Ligand-Rezeptor-Paaren gehören als Ligand flg22, ein konserviertes, 22 Aminosäuren-langes Epitop des bakteriellen Flagellins, und die korrespondierende LRR-RLK *Flagellin-Sensitive 2* (FLS2) (Boller and Felix, 2009, Ben Khaled *et al.*, 2015). FLS2 bildet nach Ligandbindung einen Heterokomplex mit dem Co-Rezeptor BAK1, was zu verschiedenen cis- und trans-Phosphorylierungsereignissen und zur Aktivierung einer mehrteiligen zellulären Signalkaskade führt, die einen weiteren Infektionsverlauf durch nicht-adaptierte Pathogene stoppt (Bentham *et al.*, 2020). Dies wird als PAMP-vermittelte Immunität (PTI, *PAMP-triggered immunity*) bezeichnet.

Eine der frühesten Reaktionen auf wahrgenommenen Pathogenbefall umfasst die Aktivierung von Ionen-Kanälen und -Pumpen, die unter anderem einen raschen Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Zytoplasma zur Folge hat. (Blume *et al.*, 2000, Ranf *et al.*, 2011, Yuan *et al.*, 2017). Fast ebenso schnell erfolgt die

Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Chinchilla *et al.*, 2007, Nietzschmann *et al.*, 2019). Die apoplastische ROS-Produktion während der Pflanzen-Pathogen-Interaktion in Arabidopsis dient einerseits der direkten Abwehr gegen Pathogene, andererseits der Signalübertragung und erfolgt hauptsächlich durch die NADPH-Oxidase *Respiratory Burst Oxidase Homolog D* (RbohD), und zum geringeren Maß auch durch ihr Isoenzym RBOHF (Torres, 2010, Qi *et al.*, 2017). Beide NADPH-Oxidasen werden nach PRR-Aktivierung durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige und -unabhängige Phosphorylierung sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung synergistisch aktiviert (Qi *et al.*, 2017). Gleichzeitig werden auch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Proteinkinasen (*Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinases*, CDPKs) und Mitogen-aktivierte Protein- (MAP) Kinase-Kaskaden aktiviert, in dessen Folge es zu einer transkriptionelle Umprogrammierung kommt (Liese and Romeis, 2013, Bentham *et al.*, 2020). Zeitlich nachgeordnet erfolgen die Schließung von Stomata, eine Reorganisation des Actin-Zytoskeletts und der Anordnung von Zellorganellen, eine Verstärkung der Zellwand und vermehrte gerichtete Sekretion von Callose und antimikrobiellen Molekülen (Bednarek *et al.*, 2010, Ben Khaled *et al.*, 2015, Boevink *et al.*, 2020). Neben den genannten Rezeptor-vermittelten Signalleitungsprozessen wird die Abwehrantwort weiterhin durch die pflanzlichen Hormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) gesteuert, wobei sich die Beteiligung der Hormone je nach Lebensweise und Besiedlungsstrategie der anwesenden Pathogene unterscheidet. Bei der Besiedlungsform können biotrophe und nekrotrophe Organismen unterschieden werden. Während die Wirtszellen bei der Besiedelung durch biotrophe Pathogene vital bleiben, induzieren nekrotrophe Pathogene den Tod der Wirtszellen, um an Nährstoffe zu gelangen. Hemibiotrophe Mikroorganismen induzieren nach einer biotrophen Phase ebenfalls den Wirtszelltod und schalten so während späterer Infektionsstadien auf eine nekrotrophe Phase um (Horbach *et al.*, 2011). In Arabidopsis ist die durch biotrophe Pathogene hervorgerufene Abwehrantwort von SA und die von nekrotrophen Organismen von JA abhängig.

#### 1.4 Durch intrazelluläre Effektoren-vermittelte Immunantwort

Um den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Abwehrantworten entgegenzuwirken, bilden bakterielle und filamentös wachsende Pathogene Effektoren. Diese Proteine oder andere kleinen Moleküle, wie z. B. sRNAs (*small RNAs*), werden über verschiedene Mechanismen in den Apoplasten oder die Wirtszelle transloziert, um die Abwehrmechanismen der Wirtszelle zu stören, was zur Effektor-vermittelten Suszeptibilität (ETS, *effector-triggered susceptibility*) führt (Dodds *et al.*, 2009, Macho and Zipfel, 2015, Collemare *et al.*, 2019). Effektoren binden oder verändern Proteine der pflanzlichen Abwehrmaschinerie und beeinflussen so deren Struktur und zelluläre Funktion (Hogenhout *et al.*, 2009, Petre *et al.*, 2021). Effektoren werden daher auch als Virulenzfaktoren bezeichnet. Im Zuge der Ko-Evolution haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, auch solche Effektoren/Virulenzfaktoren im Rahmen ihrer Immunantwort mittels zytoplasmatischer Nukleotid-bindender LLR-RPs (*nucleotid-binding, leucine-rich repeat receptor proteins*, NLRs) wahrzunehmen und eine erweiterte Abwehrreaktion auszulösen. NLRs können in zwei große Gruppen kategorisiert werden: TNLs enthalten eine Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Resistenz-Domäne und CNLs eine *coiled-coil*-Domäne (Dongus and Parker, 2021). Diese können Effektoren direkt über eine integrierte Domäne, die einem Effektor-

Ziel ähnelt erkennen (Le Roux *et al.*, 2015, Sarris *et al.*, 2015, Ortiz *et al.*, 2017). Indirekt können Effektoren anhand ihrer Wirkung auf Ziel- oder Köder-Proteine, die Ziel-Proteinen ähneln aber keine weitere Funktion innehaben, erkannt werden (Bentham *et al.*, 2020). Die NLRs wirken dabei als sogenannte Wächter („guards“). Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Erkennung der Effektor-Wirkung auf das membranständige RPM1 (*resistance to Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* 1)-interagierendem Protein 4 (RIN4). Dieser negative Regulator der Immunantwort ist Ziel mehrerer Effektoren verschiedener Pathogene und wird dadurch von verschiedenen NLRs bewacht (Mukhtar *et al.*, 2011, Bentham *et al.*, 2020). Die direkte oder indirekte Erkennung der Effektoren führt zu Veränderungen der Rezeptorkonformation. Dabei kann es sich um Veränderungen in der Domänenanordnung oder wie kürzlich herausgefunden Oligomerisierungen handeln (Bentham *et al.*, 2020, Dongus and Parker, 2021). Kryoelektronenmikroskopische Aufnahmen zweier Effektor-aktivierter TNL-Rezeptorkomplexe aus Arabidopsis zeigen, dass diese Komplexe stabile Tetramere und damit aktive NADase Holoenzyme bilden, die NAD<sup>+</sup> hydrolysieren können (Ma *et al.*, 2020). Es wird vermutet, dass die Hydrolyseprodukte die Signalweiterleitung vermitteln (Dongus and Parker, 2021). Aktuelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass der Arabidopsis-CNL-Rezeptor ZAR1 ein pentamerer Resistosom in der Plasmamembran (PM) bildet und als Ca<sup>2+</sup>-permeabler Kationenkanal wirkt (Bi *et al.*, 2021). Die Funktion als Ionen-Kanal ist notwendig für die Initiierung des Zelltods und der Immunantwort (Bi *et al.*, 2021).

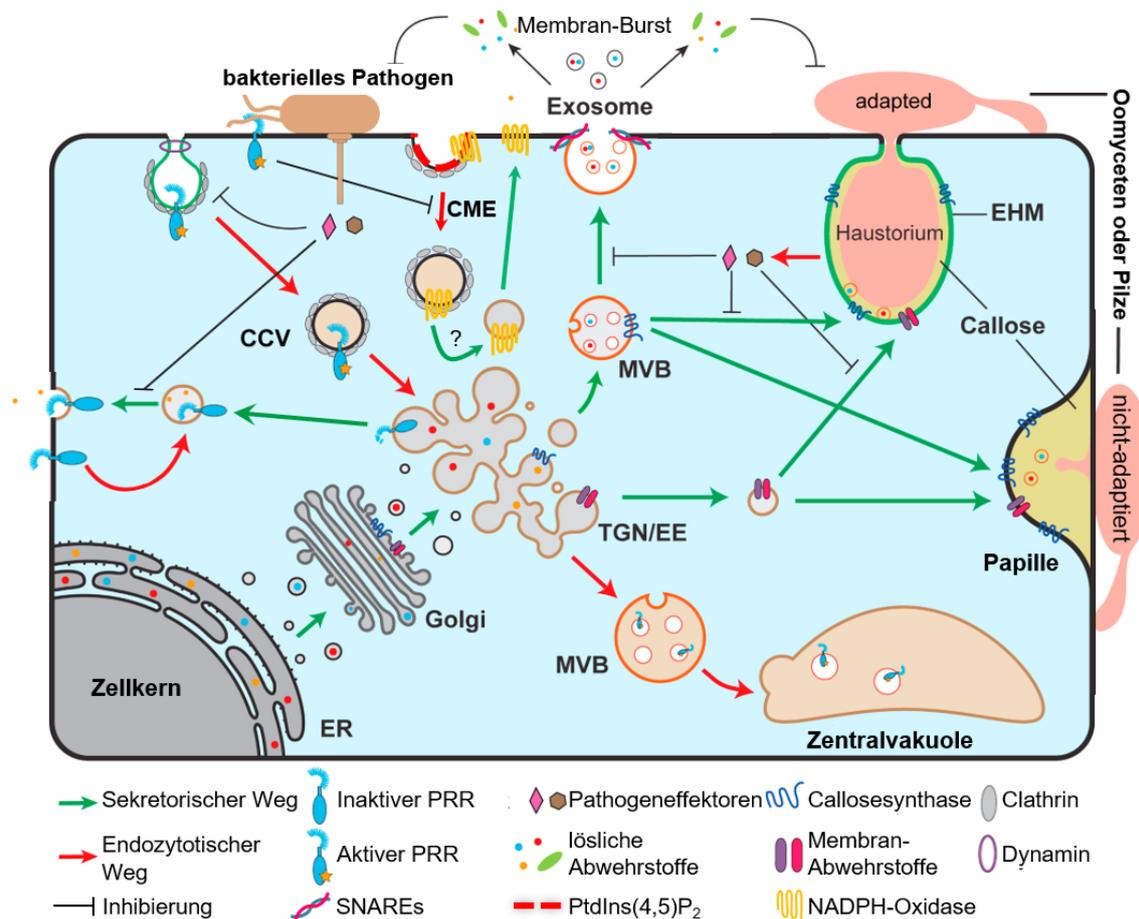
Die Kartoffel *S. tuberosum* ist weltweit ein wichtiges Grundnahrungsmittel, doch hat die langjährige Züchtung auf hohen Ertrag die Resistenzkapazität der Pflanzen beeinträchtigt. In wilden *Solanum*-Arten wurden bis heute mehr als 20 sogenannte Resistenz-gegen-*P. infestans* (*Rpi*)-Gene identifiziert, die für NLR-Proteine codieren (Monino-Lopez *et al.*, 2021). Diesen *Rpi*-Gene sollen in neueren Züchtungs-Strategien zur Erzeugung *Phytophthora*-resistenter Kartoffelsorten zum Einsatz kommen und so Ernteverluste und Kosten senken (Ghislain *et al.*, 2019).

Die durch NLRs vermittelte sogenannte Effektor-vermittelte Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) ähnelt in ihren Komponenten der PTI. So werden u. a. auch CDPKs und MAPKKs aktiviert, es kommt zum Ca<sup>2+</sup>-Einstrom und zur ROS-Produktion und zur transkriptionellen Umprogrammierung (Cui *et al.*, 2015, Peng *et al.*, 2018, Bi *et al.*, 2021). Jüngere Ergebnisse deuten sogar auf eine Wechselwirkung zwischen PTI und ETI hin (Dongus and Parker, 2021, Nguyen *et al.*, 2021).

## 1.5 Subzelluläre Membrantransportprozesse in der pflanzlichen Abwehr

Gerichtete Vesikeltransportprozesse sind maßgeblich in der pflanzlichen Immunantwort beteiligt (Ben Khaled *et al.*, 2015). Die molekulare Zusammensetzung zellulärer Membranen unterliegt einer ständigen Dynamik. Bereits vor Pathogenkontakt wird die Verfügbarkeit von in der Immunantwort involvierten Membranproteinen, wie PRRs, durch exo- und endozytische Prozesse gesteuert (Abb. 1.1) (Ben Khaled *et al.*, 2015). Im endoplasmatischen Retikulum neu synthetisierte Rezeptoren, wie FLS2, gelangen über sekretorische Prozesse zur PM (Ben Khaled *et al.*, 2015). Nicht aktivierte FLS2-Rezeptoren befinden sich in einem ständigen Recycling-Prozess zwischen der PM und frühen endosomalen Kompartimenten (Beck *et al.*, 2012). Jüngere Untersuchungen zeigen, dass ein Teil nicht-aktivierter FLS2-Rezeptoren über Orosomuroid (ORM)-Protein-abhängige

selektive Autophagie abgebaut wird (Yang *et al.*, 2019). Ähnlich dem FLS2-Recycling-Prozess scheint das Gleichgewicht der verfügbaren NADPH-Oxidase RbohD an der PM durch einen konstitutiven Clathrin-abhängigen endozytotischen Umsatz reguliert zu sein (Hao *et al.*, 2014).



**Abbildung 1.1: Membrantransport während der pflanzlichen Immunantwort.**

Abwehrproteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und über den Golgi-Apparat zur zentralen Verteilungsstelle aus Transgolginetzwerk (TGN) und frühen Endosomen (EE) transportiert. Daraus hervorgehende Vesikel, inklusive multivesikulärer Körper (MVBs), fusionieren mit der Plasmamembran (PM) bzw. extrahaustoriellen Membran (EHM), um lösliche Abwehrstoffe in den Apoplasten und membranständige Abwehrkomponenten zur PM/EHM zu transportieren. MVBs tragen neben Exocyst-positiven Organellen zur Akkumulation von Exosomen bei, deren Membranen im extrazellulären Bereich platzen und so Metaboliten mit antimikrobieller Wirkung freisetzen. Pathogene sekretieren in die Wirtszelle Effektoren, die verschiedenen Stellen des sekretorischen Transportweges inhibieren, um die Abwehrantwort zu blockieren. PM-ständige Immunrezeptoren, wie Mustererkennungsrezeptoren (PRRs), unterliegen vor ihrer Aktivierung einem konstitutiven Endozytose-Prozess. Nach Aktivierung werden diese Rezeptoren über Clathrin-ummantelte Vesikel (CCVs) internalisiert und über Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) über das TGN/EE und MVBs Richtung Zentralvakuole sortiert. Die Aktivierung von PRRs führt zur Stabilisierung der NADPH-Oxidase an der PM, vermutlich durch Inhibierung der CME der NADPH-Oxidase. Sowohl konstitutive Endozytose als auch CME tragen zur basalen Immunität bei und sind Ziele verschiedener pathogener Effektoren. Die Pfeile symbolisieren Teile des sekretorischen (grün) und endozytotischen (rot) Signalweges (verändert nach Gu *et al.*, 2017).

Die Erkennung von Pathogenen durch PRRs und die damit verbundene Aktivierung des Immunsystems umfasst eine Vielzahl weiterer Membrantransportprozesse. So werden in der frühen Immunantwort aktivierte PRRs über Clathrin-vermittelte Endozytose (CME) internalisiert

und gelangen über subzelluläre Transportprozesse zur Vakuole, wo sie letztlich degradiert werden (Spallek *et al.*, 2013, Mbengue *et al.*, 2016). Die für die ROS-Produktion in der Immunantwort hauptverantwortliche NADPH-Oxidase RbohD zeigt nach flg22-Behandlung eine beschleunigte laterale Mobilität, eine höhere Fluoreszenzintensität und eine höhere Anzahl von Clustern an der PM (Hao *et al.*, 2014). Menzel *et al.* (2019) schlugen vor, dass dies aus einer Stabilisierung von RbohD an der PM resultiert, die mit der Abundanz regulatorischer Membranlipide zusammenhängt, die die CME steuern (Zhao *et al.*, 2010, Ischebeck *et al.*, 2013). Mikroskopische Analysen mit *A. thaliana*-Protoplastenzellen ergaben zum Beispiel, dass eine Störung Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)-abhängiger Membrantransport-Prozesse wie der CME von Proteinen, die für die Abwehrantwort relevant sind, zu einer Reduktion der Endozytose eines RbohD-EYFP-Fusionsproteins führt (Menzel *et al.*, 2019). Diese Reduktion der RbohD-EYFP-Endozytose korreliert mit vermehrter flg22-induzierter ROS-Bildung (Menzel *et al.*, 2019).

Während späterer Immunantwortprozesse erfolgt die Sekretion von Callose und antimikrobiellen Substanzen (Underwood and Somerville, 2008). Eschen-Lippold *et al.* (2012a) zeigten, dass in mit *P. infestans*-infizierten *S. tuberosum*-Pflanzen die Bildung callosehaltiger Papillen an den Infektionsstellen von *StSYR1* (*SYNTAXIN-RELATED 1*) abhängig ist. SYR1 gehört zu den membranständigen SNARE-Proteinen (SOLUBLE N-ETHYLMALIMIDE SENSITIVE FACTOR ATTACHMENT PROTEIN RECEPTOR), welche die selektive Fusion von Transportvesikeln mit der jeweiligen Zielmembran vermitteln (Lipka *et al.*, 2007). Ein der SNARE-vermittelten Membranfusion vorgelagerter Prozess ist das Anbinden („*tethering*“) der Vesikel an die Zielmembran über den Exocyst-Komplex. Du *et al.* (2015, 2018) zeigten, dass einige Exocyst-Untereinheiten, wie z. B. Sec5 und Exo70B, bei der Abwehr von *Nicotiana benthamiana* gegen *P. infestans* sowie bei der Ablagerung von Callose nach Infektion von *N. benthamiana* mit *Pseudomonas syringae* eine Rolle spielen.

Eine Beteiligung verschiedener vesikulärer Prozesse zeigt sich auch bei der Etablierung der extrahaustorielle Membran (EHM) von mit filamentös wachsenden Pathogenen infizierten Pflanzen (Bozkurt and Kamoun, 2020). So zeigten Bozkurt *et al.* (2015), dass während der Infektion von *N. benthamiana* mit *P. infestans* späte Endosomen (*late endosomes*, LEs), die durch die Rab7 GTPase RabG3c markiert sind, zur EHM hin umgeleitet werden. Untersuchungen mit Fluoreszenzmarkierten Proteinen zeigten, dass nach Infektion mit *P. infestans* die regulatorischen LRR-RLKs *StSERK3* und BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (*BRI1*) an den EHM umgebenden Endosomen akkumulierten (Bozkurt *et al.*, 2015).

## 1.6 Die *Phytophthora infestans* - *Solanum tuberosum*-Interaktion

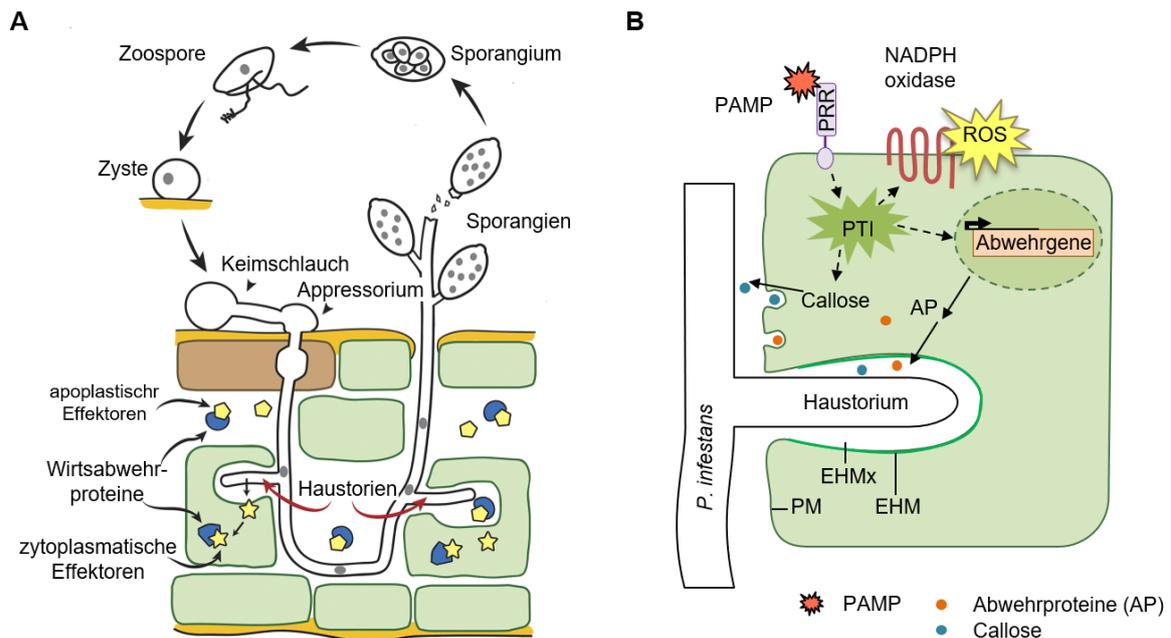
Der aus Zentralmexiko stammende (Goss *et al.*, 2014) hemibiotrophe Oomycet *Phytophthora infestans* ist Mitglied einer Gattung von pflanzenpathogenen Mikroorganismen, die Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) befällt (Kroon *et al.*, 2012). Infektionsanfälligkeit und -verlauf sind abhängig von *P. infestans*-Isolat und Pflanzenkultivar (Becktell *et al.*, 2006). Die zwei wirtschaftlich bedeutsamsten Wirte sind die Nutzpflanzen Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Kartoffel (*S. tuberosum*), bei denen der Oomycet die verheerende Braun- bzw. Kraut- und Knollenfäule verursacht. Dadurch gilt *P. infestans* als das Pathogen, welches im

Kartoffelpflanzenanbau die höchsten monetären Schäden verursacht. Diese wurden in der Vergangenheit in Europa auf über eine Milliarde € und global auf über \$6 Milliarden jährlich beziffert (Haverkort *et al.*, 2008). Durch das Aufkommen neuer aggressiver *P. infestans*-Stämme, sowie vermehrter Fungizid-Resistenzen wird der Kartoffelanbau zunehmend gefordert (Fry *et al.*, 2015).

### 1.7 Der Infektionszyklus von *P. infestans*

Die Infektion anfälliger Pflanzensorten durch *P. infestans* erfolgt in der Regel durch deren asexuelle Sporangien, die je nach Witterung direkt auf der Pflanze auskeimen und über Keimschläuche in das lebende Gewebe eindringen oder bewegliche Zoosporen freisetzen (Judelson and Ah-Fong, 2019). An geeigneter Infektionsstelle bildet die Zoospore zunächst eine Zyste, welche auskeimt und entweder direkt durch natürliche Öffnungen (wie z.B. die Stomata oder Lentizellen) in das pflanzliche Gewebe eindringt oder ein Appressorium ausbildet (Abb. 1.2 A). Das Appressorium dient dazu, die pflanzliche Epidermis zu durchbrechen. Dieser Vorgang wird bei verschiedenen *Phytophthora*-Spezies durch zellwandabbauende Enzyme unterstützt (Blackman *et al.*, 2015).

Ausgehend von einem primären Infektionsvesikel setzen die *P. infestans*-Hyphen nach erfolgreicher Penetration ihr Wachstum ähnlich der vom Sporangium ausgehenden Hyphe innerhalb des lebenden pflanzlichen Gewebes fort. Von diesen interzellulär wachsenden Hyphen werden Ernährungsstrukturen, sogenannte Haustorien, ausgebildet, die die PM der pflanzlichen Zellen einstülpen, so ins Volumen der Zellen reichen und dort einen engen Kontakt mit Strukturen der Wirtszellen ermöglichen. Obwohl die PM dabei nicht durchbrochen wird und die Wirtszellen intakt bleiben, führt diese Interaktion zu umfassenden strukturellen Veränderungen der betroffenen Wirts-PM (siehe 1.2.2 Haustorium), um den Austausch von Nährstoffen und Signalmolekülen zu ermöglichen (Dodds *et al.*, 2009, Lu *et al.*, 2012, Bozkurt *et al.*, 2015). Bereits drei bis vier Tage nach Infektion kann es bei günstigen Witterungsbedingungen zur Sporulation kommen. Dabei werden an den Enden der Hyphen, welche aus dem Blattgewebe durch die Öffnungen der Stomata herauswachsen, Sporangien ausgebildet (Judelson and Blanco, 2005). Diese Krankheitsphase ist als weißer Flaum auf der Blattunterseite sichtbar und mit der Nekrose des Wirtsgewebes assoziiert. Die Sporangien können dann erneut in Abhängigkeit von Wind und Luftfeuchte verbreitet werden und einen neuen Infektionszyklus starten (Granke *et al.*, 2009).



**Abbildung 1.2: Schemata der Interaktion zwischen *P. infestans* und Wirtspflanze**

A) Aus Sporangien freigesetzte Zoosporen bilden an geeigneter Infektionsstelle eine Zyste, welche auskeimt und ein Appressorium ausbildet. Von interzellulär wachsenden Hyphen dringen Haustorien in die Zellen durch Invagination der Zellmembran ein. *P. infestans* sekretiert Effektoren, die mit Wirtsabwehrproteinen interagieren (verändert nach Leesutthiphonchai *et al.*, 2018). B) Ausgehend von interzellulär wachsenden Hyphen bilden sich Haustorien. Die Wirtsmembran liegt invaginiert vor und bildet die extrahaustorielle Membran (EHM), welche sich in ihrer Zusammensetzung von der übrigen Plasmamembran (PM) unterscheidet. Der Bereich zwischen EHM und Haustorium wird als extrahaustorielle Matrix (EHMx) bezeichnet. Die Erkennung der Infektion erfolgt durch Aktivierung von Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) durch pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs). Dies löst eine Immunantwort aus (*PAMP-triggered Immunity*, PTI), welche zur Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch NADPH-Oxidasen, zur Expression und Sekretion von Abwehrproteinen (AP) sowie zur Sekretion von Callose führt.

## 1.8 Das Haustorium

Der Austausch von Signalmolekülen und vermutlich auch die Nährstoffaufnahme erfolgt bei einigen filamentös wachsenden Pathogenen, wie Oomyceten oder Pilzen, über spezielle Strukturen, sogenannte Haustorien, die während der Infektion ausgebildet werden (Bozkurt and Kamoun, 2020). Die von den interzellulär wachsenden Hyphen abzweigenden Haustorien sind umgeben von der Pathogen-eigenen haustoriellen Membran. Die pflanzliche PM liegt dabei invaginiert vor und bildet die sogenannte extrahaustorielle Membran (EHM), welche vom Haustorium durch die extrahaustorielle Matrix (EHMx) getrennt ist (Abb. 1.2 B) (Dodds *et al.*, 2009). Die Anzahl der je Zelle enthaltenen Haustorien variiert (Bozkurt and Kamoun, 2020). Die Zusammensetzung sowie die Mechanismen der Biogenese der EHM sind noch wenig verstanden. Untersuchungen an infizierten Arabidopsis- oder *N. benthamiana*-Pflanzen zeigen, dass sich die Zusammensetzung der in der EHM enthaltenen Proteine von der restlichen PM unterscheidet (Lu *et al.*, 2012, Bozkurt *et al.*, 2014, Bozkurt *et al.*, 2015). So lokalisieren in mit *P. infestans* infizierten *N. benthamiana*-Zellen die PRRs FLS2 (FLAGELLIN SENSITIVE2) und EFR (*elongation factor thermal unstable (EF-Tu) receptor*),

das Aquaporin PIP1;4 sowie die Calcium-ATPase ACA8 in der PM, jedoch nicht in der EHM (Lu *et al.*, 2012, Bozkurt *et al.*, 2015). Erst nach Aktivierung durch flg22 relokalisiert FLS2 zur EHM-Grenzfläche (Bozkurt *et al.*, 2015). In unmittelbarer Nähe der Haustorien lokalisieren Vesikel des sekretorischen und endozytotischen Signalweges (Lu *et al.*, 2012). Inhalt solcher Vesikel können Callosesynthaseproteine sein, dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass ein Teil der *P. infestans*-Haustorien in *N. benthamiana* eine partielle Umhüllung durch Callose aufweisen (Bozkurt *et al.*, 2014, Wang *et al.*, 2021). Auch *P. infestans*-Haustorien in *S. tuberosum* können von callosehaltigen Papillen umgeben sein (Eschen-Lippold *et al.*, 2012a).

Nachdem wenig über die Lipidzusammensetzung der EHM bekannt ist, berichteten kürzlich Qin *et al.* (2020), dass nach Infektion von *A. thaliana* mit dem Pilz *Erysiphe cichoracearum* eine Zunahme von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) in der Wirts-PM und noch stärker in der EHM zu beobachten ist. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> gehört zu einer kleinen Klasse von Membranlipiden, die wichtige regulatorische Rollen bei der Membranrekrutierung von Proteine spielen und so Prozesse der pflanzlichen Entwicklung und der Antwort auf Umweltfaktoren steuern (vergleiche Kapitel 1.11; Heilmann and Heilmann, 2022). Dabei zeigte sich, dass die Akkumulation von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in der EHM über einen Brefeldin A (BFA)-insensitiven, aber Aktin-abhängigen Transportweg zu erfolgen scheint (Qin *et al.*, 2020). Dies passt zu dem sich entwickelnden Paradigma, dass die EHM-Biogenese und -Reifung durch Umleiten verschiedener Stress-abhängiger Endomembran-Transportwege erfolgt (Bozkurt and Kamoun, 2020).

## 1.9 PTI in *S. tuberosum*

Das *Phytophthora*-Oligopeptid Pep-13 wurde als notwendig und ausreichend für die Aktivierung von Abwehrantworten zunächst in kultivierten Petersilienzellen identifiziert (Nürnberg *et al.*, 1994). Das dreizehn Aminosäuren lange Peptid (VWNQPVRGFKVYE) leitet sich aus der Sequenz der extrazellulären Transglutaminase GP42 ab und ist innerhalb verschiedener *Phytophthora*-Arten hochkonserviert (Brunner *et al.*, 2002).

Studien mit Petersilienzellen lassen vermuten, dass die Erkennung dieses Peptids über einen noch unbekanntem membranständigen Rezeptor erfolgt (Nürnberg, 1994, Nietzschmann, 2019). Die Erkennung von Pep-13 löst in *S. tuberosum* eine umfassende Abwehrantwort aus, die in Kartoffel der Akkumulation von sowohl SA als auch JA bedarf. Es kommt zur Bildung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Aktivierung von MAP-Kinasen, sowie der Induktion spezifischer Abwehrgene (Halim *et al.*, 2009, Landgraf *et al.*, 2014, Nietzschmann *et al.*, 2019). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Pep-13-Perzeption und Aktivierung früher Immunantwort-Prozesse, wie ROS-Produktion und Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade von den Co-Rezeptoren SERK3A/B (*somatic embryogenesis receptor kinase 3A/B*) abhängig ist (Nietzschmann *et al.*, 2019). Die Induktion verschiedener Abwehrgene wie z.B. *StPR1* erwies sich als unabhängig von *StSERK3A/B* (Nietzschmann *et al.*, 2019).

Bemerkenswerterweise führt eine Vorbehandlung von Kartoffelpflanzen mit Pep-13 zu einer erhöhten systemischen Resistenz gegenüber nachfolgender *P. infestans*-Infektion (Halim, 2006). In einem Kandidatengen-Ansatz konnten weitere an der Abwehrantwort beteiligte Faktoren identifiziert und die Beteiligung sekretorischer Prozesse gezeigt werden (Eschen-Lippold *et al.*, 2012a). Nach Pep-13-Perzeption akkumulieren Syntaxin-related 1 (SYR1)-Transkripte. SYR1 codiert

für Syntaxine, die an der Vesikelfusion beteiligt sind. Eschen-Lippold *et al.* (2012a) zeigten, dass Membrantransport und die Abwehrantwort auf *P. infestans*-Infektion in *S. tuberosum*-Pflanzen mit verringerter *SYR1*-Expression verändert sind und die Bildung callosehaltiger Papillen an den Infektionsstellen reduziert ist.

### 1.10 Ziele von *P. infestans* Effektoren in *Solanaceae*

Eine gut untersuchte Klasse von Effektoren aus Oomyceten wie *P. infestans* ist die der nach einem charakteristischen Sequenzmotiv benannten RXLR-Effektoren, welche vermutlich mittels Haustorien in die Wirtszelle gelangen (Bozkurt *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2017). Viele dieser Effektoren zielen auf Komponenten von Vesikeltransport- und Exozytoseprozessen (Petre *et al.*, 2021). Beispielsweise inhibiert der *P. infestans*-RXLR-Effektor AVRblb2, der an der EHM lokalisiert, die Sekretion der pflanzlichen Papain-ähnlichen Zystein-Protease C14 und erhöht so die Suszeptibilität der Wirtspflanze *N. benthamiana* (Bozkurt *et al.*, 2011). Der *P. infestans* RXLR-Effektor AVR1 interagiert mit Sec5, einer Untereinheit des Exocyst-Komplexes, in Kartoffel und unterdrückt dadurch die Wirtsabwehr (Du *et al.*, 2015). Der multifunktionelle Effektor AVR3a aus *P. infestans* stabilisiert und inhibiert die U-box E3-Ligase CMPG1, die für den Infestin 1 (INF1)-vermittelten Zelltod notwendig ist (Bos *et al.*, 2010). Außerdem assoziiert AVR3a mit dem Dynamin-verwandten Protein 2 (*Dynamin-Related Protein 2*, DRP2), das eine Rolle bei den finalen Schritten der CME hat. Ein Ausschalten von DRP2 führt zur Beeinträchtigung der Ligand-induzierten FLS2-Endocytose in Tabak-Zellen (Chaparro-Garcia *et al.*, 2015).

### 1.11 Pflanzliche Membranen

Die PM stellt als äußerste physiologische Barriere den Kontakt zur Umwelt jeder Pflanzenzelle und somit auch zu vorhandenen pathogenen Mikroorganismen dar. Es ist daher wichtig, physiologische Abwehrprozesse zu verstehen, die an der PM ablaufen. Pflanzliche Membranen bestehen, wie alle eukaryotischen Membranen, aus einer Lipiddoppelschicht, die als hydrophobe Barriere das Zytoplasma vom extrazellulären Apoplasten oder dem Inhalt anderer Zellkompartimente abgrenzt (Jaillais and Ott, 2020). Die Membranen sind asymmetrisch aufgebaut und enthalten eine Vielzahl von Membranproteinen, welche einen selektiven Stoff und Informationsaustausch zwischen über die Barriere hinweg vermitteln (Taiz and Zeiger, 2006). Die Eigenschaften dieser Proteine sowie die Zusammensetzung des Lipidanteils variiert zwischen verschiedenen zellulären Membranen (Taiz and Zeiger, 2006). Eine Kompartimentalisierung der Membranproteine in Subdomänen (Nanodomänen oder größere polare Domänen) gewährleistet und beeinflusst lokal spezifische Funktionen der Membran, beispielsweise in der Vermittlung von Oberflächensignalen ins Zellinnere (Jaillais and Ott, 2020).

Mit Ausnahme der inneren Plastidmembranen und Thylakoiden, die fast ausschließlich Glykosylglyceride enthalten, bestehen Zellmembranen aus verschiedenen Klassen amphiphiler Lipide. Eine wichtige Gruppe membranbildender Lipide ist die der Phosphoglyceride. Phosphoglyceride enthalten als hydrophoben Anteil zwei Fettsäuren, welche an das Glycerolrückgrat verestert sind. Über einen Phosphatrest können verschiedene hydrophile Kopfgruppen am Glycerin verestert sein, wie bspw. Serin, Ethanolamin, Cholin oder Inositol. Das

Vorhandensein hydrophober und hydrophiler Bereiche verleiht den Phospholipiden insgesamt amphiphile Eigenschaften (Taiz and Zeiger, 2006). Weitere Membranlipide sind Sphingolipide, die ebenfalls zu den Phospholipiden gehören, sowie Sterol-basierte Lipide (Gerth et al. 2017).

## 1.12 Phosphoinositide

Einen geringen Anteil der Phosphoglyceride, bildet die Gruppe der Phosphoinositide (PI; Thole and Nielsen, 2008). PIs leiten sich vom Phosphoglycerid Phosphatidylinositol (PtdIns) ab, welches über D-myo-Inositol als hydrophile Kopfgruppe verfügt. D-myo-Inositol besitzt Hydroxylgruppen, die in verschiedenen Kombinationen phosphoryliert vorliegen können. Die so vom PtdIns abgeleiteten Lipid-Derivate werden als Phosphoinositide bezeichnet und besitzen regulatorische Funktion.

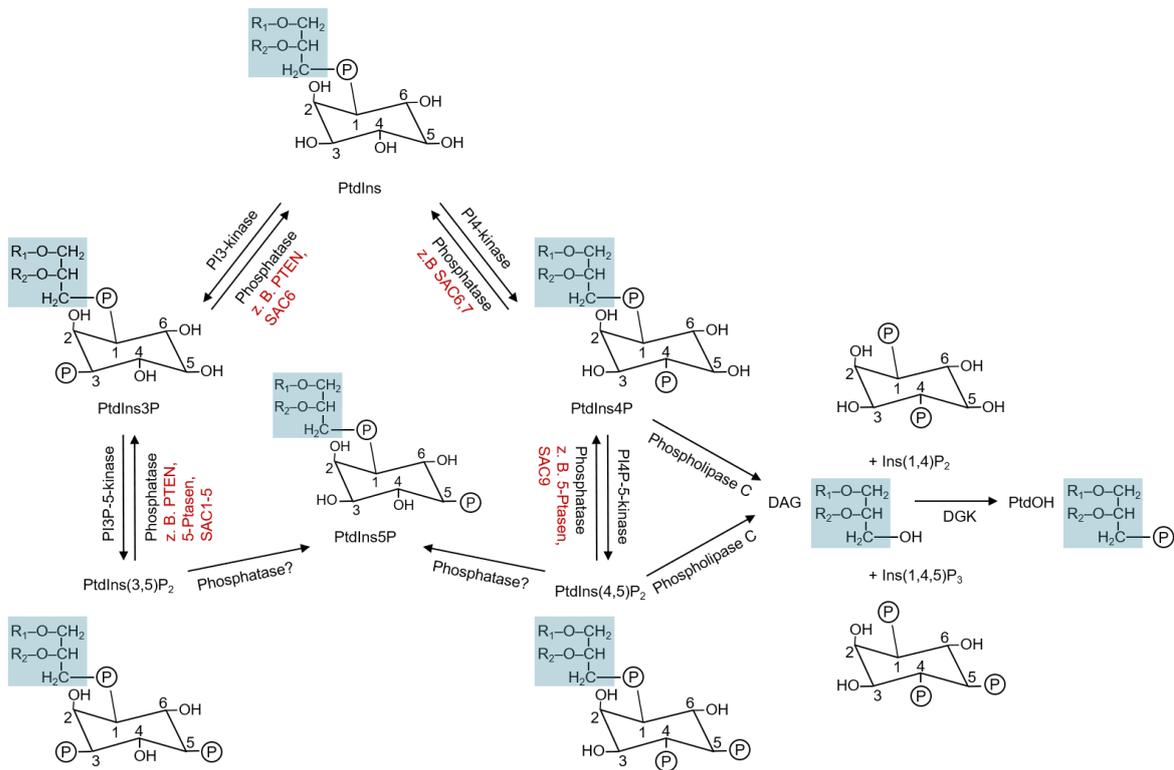
### 1.12.1 Die Biosynthese von Phosphoinositiden

Über PIs und die an ihrer Biosynthese beteiligte Enzyme ist in *S. tuberosum* wenig bekannt. Die Biosynthese pflanzlicher PIs und die an ihr beteiligten Enzyme sind am Besten in *A. thaliana* verstanden.

PtdIns wird *de novo* in der zytosolischen Membranhälfte des endoplasmatischen Retikulums durch Kondensation der Substrate D-myo-Inositol und Cytidindiphosphat-Diacylglycerol (CDP-DAG) gebildet. Die Reaktion wird durch die Phosphatidylinositol-Synthase (PIS) katalysiert. In *A. thaliana* konnten zwei PIS-Isoformen (PIS1, PIS2) identifiziert werden (Löpfke et al., 2008).

PtdIns bildet das Ausgangsmolekül für alle weiteren PIs, welche durch sukzessive Phosphorylierungs und De-phosphorylierungsereignisse durch Kinasen und/oder Phosphatasen gebildet werden. Die Phosphorylierung der D-myo-Inositol Kopfgruppe des PtdIns ist vermutlich aufgrund sterischer Effekte nur an den Positionen D3, D4 und D5 möglich (Abb. 1.3) (Gerth et al., 2017). Drei PtdIns-Monophosphate (PtdIns3P, PtdIns4P, PtdIns5P) und drei PtdIns-Bisphosphate (PtdIns(3,4)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) konnten bisher in Pflanzen detektiert werden, wobei ein pflanzliches Vorkommen von PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> bisher nur für *Spirodela polyrhiza* berichtet wurde und die Existenz in anderen Pflanzen weiterhin diskutiert wird (Brearley and Hanke, 1993, Meijer and Munnik, 2003, Heilmann and Heilmann, 2015). Das PtdIns-Trisphosphat (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) konnte bisher trotz intensiver Forschungsaktivität nicht in pflanzlichen Zellen nachgewiesen werden (Mueller-Roeber and Pical, 2002, Meijer and Munnik, 2003, Gerth et al., 2017). Insgesamt machen die mono- und bisphosphorylierten Derivate des PtdIns einen Anteil von weniger als 1% der gesamten Membranlipide aus (van Leeuwen et al., 2004).

Die Biosynthese von PtdIns3P erfolgt durch die Phosphorylierung von PtdIns an der D3-Position der Inositol-Kopfgruppe (Abb. 1.3). In Pflanzen wird diese Reaktion einzig durch PtdIns3-Kinasen der Klasse III katalysiert (Heilmann et al., 2000, Mueller-Roeber and Pical, 2002, Reidick et al., 2017). Durch sequentielle Phosphorylierung an Position D5 kann PtdIns3P weiter zu PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> phosphoryliert werden (Mueller-Roeber and Pical, 2002). PtdIns4P ist die häufigste Form phosphorylierter PtdIns (Boss and Im, 2012). Die Synthese wird von PtdIns4-Kinasen katalysiert. In Arabidopsis konnten vier Isoformen von PtdIns4-Kinasen (PI4K $\alpha$ 1/2 und PI4K $\beta$ 1/2) identifiziert werden (Mueller-Roeber and Pical, 2002). Obwohl PtdIns5P in Pflanzen nachgewiesen wurde, ist seine Synthese bisher ungeklärt (Meijer et al., 2001, Gerth et al., 2017) und resultiert vermutlich aus der Dephosphorylierung eines PtdIns-Bisphosphates (Heilmann and Heilmann, 2015).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Biosynthese und Degradation von Phosphatidylinositolen**

Ausgehend von Phosphatidylinositol (PtdIns) wird durch PtdIns3-kinase bzw. PtdIns4-kinase die Phosphorylierung an Position D3 bzw. D4 der Inositolkopfgruppe katalysiert. Das entstehende PtdIns3P respektive PtdIns4P kann als Substrat für PtdIns3P-5-kinase (PI3P-5-kinase) bzw. PtdIns4P-5-kinase (PI4P-5-kinase) dienen, PtdIns3P wird zu PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> phosphoryliert. Beide Bisphosphate werden als mögliche Vorstufen von PtdIns5P diskutiert. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> können durch Phospholipase C zu Diacylglycerol (DAG) und lösliches Ins(1,4)P<sub>2</sub> bzw. Ins(2,4,5)P<sub>3</sub> hydrolysiert werden. DAG kann subsequent durch DAG-Kinase (DGK) zu PtdOH phosphoryliert werden. (nach Krishnamoorthy et al., 2014, und Gerth et al., 2017).

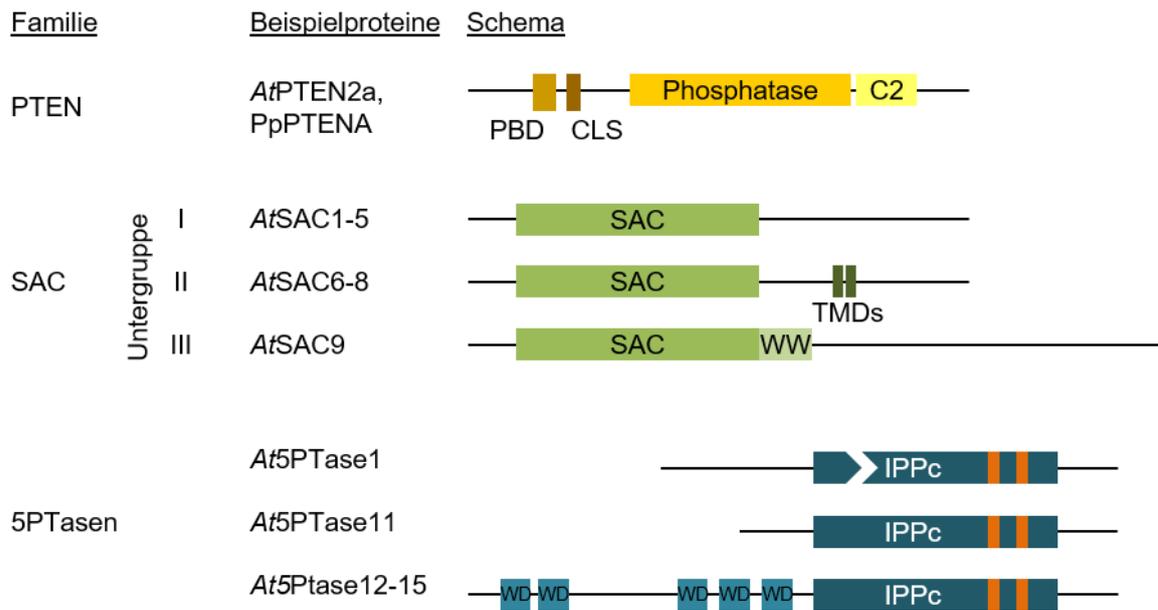
Durch Phosphorylierung der PtdIns-Monophosphate PtdIns3P und PtdIns4P entstehen die PtdIns-Bisphosphate PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. In Arabidopsis gibt es vier Isoformen der PtdIns3P-5-Kinase. Für eine dieser konnte die katalytische Aktivität gegen PtdIns3P *in vitro* nachgewiesen werden, wobei eine Promiskuitivität bezüglich weiterer PtdIns-Substrate nicht ausgeschlossen werden kann (Bak *et al.*, 2013). Die Zahl der bekannten PtdIns4P-5-Kinasen, die die Phosphorylierung an der D5-Position des Inositolrings von PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> katalysieren, unterscheidet sich zwischen verschiedenen pflanzlichen Organismen. In Arabidopsis sind 11 Kinasen bekannt, in dem Kleinen Blasenmützenmoos *Physcomitrium patens* konnten nur zwei Isoformen identifiziert werden (Mueller-Roeber and Pical, 2002, Saavedra *et al.*, 2009, Ischebeck *et al.*, 2010a). Für einige Vertreter dieser Enzyme konnte *in vitro* zusätzlich eine geringe Kinase-Aktivität gegenüber PtdIns3P festgestellt werden (Ischebeck *et al.*, 2008, Stenzel *et al.*, 2008, Ischebeck *et al.*, 2011).

### 1.12.2 Die Degradation von Phosphoinositiden

Im Vergleich zur Biosynthese ist der Abbau von PtdIns-mono- und -bisphosphaten weniger gut erforscht. Phosphatasen, die PtdIns-Phosphate dephosphorylieren, sind zahlreich und können in mindestens vier Familien unterteilt werden (Abb. 1.4), deren Mitglieder teilweise Substrat-Promiskuität aufweisen (Gerth *et al.*, 2017).

Die erste Familie der SAC (*suppressor of actin*)-Phosphatasen zeichnet sich durch das Vorhandensein der SAC-Domäne bei allen Mitgliedern aus. Die bisher untersuchten Vertreter aus Arabidopsis und Reis (*Oryza sativa*) zeigten Aktivität gegenüber PtdIns4P, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> oder PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (Abb. 1.3; Williams *et al.*, 2005, Zhong *et al.*, 2005, Thole *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2020, Song *et al.*, 2021). Eine weitere Familie ist die der PTEN (*phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten*) -Phosphatasen. Untersuchte Vertreter aus Arabidopsis und *P. patens* hydrolysierten bevorzugt Phosphat an der D3-Position von 3-phosphorylierten PtdIns-Mono- und -Bisphosphaten (Abb. 1.3) (Pribat *et al.*, 2012, Saavedra *et al.*, 2015). Eine dritte Gruppe von Enzymen sind die Myotubularine, eine kleine Familie von PI-Phosphatasen, die bislang nur schlecht untersucht sind (Gerth *et al.*, 2017). Eine vierte große Familie bilden die 5-Phosphatasen (5PTasen). In Arabidopsis gibt es 15 Mitglieder, von denen einige hinsichtlich ihrer Substratspezifität näher charakterisiert wurden (Mueller-Roeber and Pical, 2002). Die meisten untersuchten Vertreter zeigten in *in vitro*-Experimenten Aktivität gegenüber PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, aber auch gegen 5-phosphorylierte PIs (Abb. 1.3) und lösliche Inositolphosphate (Berdy *et al.*, 2001, Ercetin and Gillaspay, 2004, Zhong and Ye, 2004, Kaye *et al.*, 2011, Golani *et al.*, 2013). So zeigt die 5-Phosphatase 11 aus *A. thaliana* *in vitro* Aktivität sowohl gegenüber PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als auch gegenüber PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Ercetin and Gillaspay, 2004). Diese promiskuitive Aktivität ist auch für 5-Phosphatasen aus tierischen Organismen bekannt (Majerus *et al.*, 1999). Die Mitglieder der 5PTase-Familie weisen eine hohe Variabilität hinsichtlich der Länge der AS-Sequenzen auf, enthalten jedoch alle eine konservierte, katalytische, als IPPc bezeichnete Domäne (*inositol polyphosphate phosphatase catalytic*, IPPc) 5PTase-Domäne (Abb. 1.4). Anhand von Sequenzvergleichen von 5PTasen verschiedener Organismen konnten innerhalb dieser Domäne zwei hoch konservierte, für die 5-PTase-Aktivität notwendige katalytische Motive identifiziert werden: (F/I)WXGD<sub>X</sub>N(F/Y)R und (R/N)XP(S/A)(W/Y)(C/T)DR(I/V)(L/I) (Communi and Erneux, 1996, Communi *et al.*, 1996, Majerus *et al.*, 1999). Eine Besonderheit einiger pflanzlicher 5PTasen, wie AtPTase12 - 15, ist das Vorhandensein einer zusätzlichen WD-Wiederholungs-Domäne (Zhong and Ye, 2004). Diese Domäne findet sich nicht in 5PTasen tierischer Organismen oder von *Saccharomyces cerevisiae* (Zhong and Ye, 2004).

Die Degradation der PIs erfolgt nicht nur durch Phosphatasen, sondern auch durch Phospholipasen. PtdIns4P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> können durch Phospholipase C zu Diacylglycerol (DAG) und die löslichen Inositolphosphate Ins(1,4)P<sub>2</sub> bzw. Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> gespalten werden, welche als Substrate für Inositolphosphat-Kinasen bzw. -Phosphatasen dienen können (Munnik and Nielsen, 2011). DAG kann mittels Diacylglycerol-kinase (DGK) zu Phosphatidylsäure (*phosphatidic acid*, PtdOH) phosphoryliert werden (Munnik, 2001).



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung bekannter pflanzlicher Phosphatidylinositolphosphatase-Familien**

Vertreter der Familie der PTEN-Phosphatasen enthalten eine Phosphatase- und eine C2-Domäne, sowie zusätzlich eine PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindedomäne (PBD) und ein Cytosolisches Signal (CLS) (nach Saavedra *et al.*, 2015). SAC-Phosphatasen sind durch eine SAC-Domäne gekennzeichnet. Zusätzliche Domänen, wie Transmembrandomänen (TMDs) oder eine WW-Domäne (WW), eine Domäne mit zwei konservierten Tryptophan-Resten, können enthalten sein (nach Zhong and Ye, 2003). Die 5PTasen besitzen eine katalytische Inositolpolyphosphat-Phosphatase (*inositol polyphosphate phosphatase catalytic*, IPPc)-Domäne, die wie bei At5PTase1 durch einen Bereich nicht-konservierter Aminosäurereste unterbrochen sein kann und zwei hoch konservierte katalytischen Motive enthält (orange Balken). Einige Vertreter der 5PTasen besitzen zusätzlich WD-Wiederholungsdomänen (WD) (nach Ercetin and Gillaspay, 2004, und Zhong and Ye, 2004). Die Darstellung ist nicht maßstabsgerecht und die Aminosäurelänge der einzelnen Proteine variiert.

### 1.13 Die Subzelluläre Organisation und Funktion von Phosphoinositiden

Als wenig abundante Membranlipide mit regulatorischer Funktion ermöglichen PIs die Interaktion mit spezifischen Proteinen und koordinieren somit direkt oder indirekt die zeitliche und räumliche Aktivität von Proteinen, die an membranbasierten Prozessen beteiligt sind (Gerth *et al.*, 2017). Die Interaktion kann über PI-spezifische Lipidbindedomänen von Partnerproteinen erfolgen (van Leeuwen *et al.*, 2004). Basierend auf mikroskopischen Untersuchungen lebender Zellen mit Hilfe Fluoreszenz-markierter Biosensoren für PIs und fluoreszierender Fusionen zugehöriger Enzyme konnte die subzelluläre Verteilung des pflanzlichen PI-Systems visualisiert und besser verstanden werden. Dabei zeigt sich eine in verschiedenen Membranen differenzierte Lokalisation der Lipide und ihrer Enzyme, was vermutlich zur biochemischen Identität der jeweiligen Membranen beiträgt (Gerth *et al.*, 2017). PIs sind dabei grundsätzlich auf der cytosolischen Seite der Membran-Doppelschichten zu finden (Gerth *et al.*, 2017). PtdIns4P besetzt Membranen des Golgi-Apparates, des trans-Golgi-Netzwerks, der späten Endosomen (*late endosomes* LEs) sowie die PM; PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> dagegen ist hauptsächlich in der PM zu detektieren (van Leeuwen *et al.*, 2007, Vermeer *et al.*, 2009, Simon *et al.*, 2014, Simon *et al.*, 2016). Anhand der Untersuchungen mit Fluoreszenzreportern zeigt sich auch, dass die Verteilung innerhalb der Membran nicht gleichmäßig sein muss, sondern eine Organisation in Membran-Subdomänen möglich ist. Im zellulären Maßstab

lokalisieren PtdIns4P, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und die zugehörigen Biosyntheseenzyme hauptsächlich in einer polaren Membrandomäne der subapikalen PM polar wachsender Pollenschläuche oder Wurzelhaare (Ischebeck *et al.*, 2008, Sousa *et al.*, 2008, Stenzel *et al.*, 2008, Ischebeck *et al.*, 2011, Stenzel *et al.*, 2020). Auch in Wurzelzellen von *Arabidopsis* zeigen sich PtdIns4P, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und Enzyme ihrer Biosynthese in apikalen und basalen polaren Membrandomänen (Ischebeck *et al.*, 2013, Tejos *et al.*, 2014) Im Nano-Maßstab bilden Pls sogenannte Nanodomänen mit Durchmessern weit unterhalb von 1 µm, die dynamisch erscheinen und auch innerhalb der größeren polaren Domänen vorkommen können (Fratini *et al.*, 2021). Wie genau die Verteilung von Pls etabliert und reguliert wird ist weiterhin unklar, jedoch ermöglicht die Organisation in polare Domänen und Nanodomänen die asymmetrische Verteilung zellulärer Komponenten sowie die spezifische Rekrutierung von Proteinen an bestimmte Membranregionen (Gerth *et al.*, 2017).

Pls nehmen über ihren Einfluss auf Membranprozesse eine zentrale Rolle bei der Regulation der pflanzlichen Physiologie ein. Neben dem polaren Spitzenwachstums von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren sind Pls auch in der polaren Verteilung der Auxin-Efflux-Carrier der PIN-FORMED (PIN)-Familie in *Arabidopsis* beteiligt (Ischebeck *et al.*, 2013, Tejos *et al.*, 2014, Gerth *et al.*, 2017). Die asymmetrische Verteilung von Zellkomponenten kann durch die Koordinierung verschiedener Endomembrantransportprozesse, wie Exo- und Endozytose, erreicht werden. So wird die polare Verteilung der PIN-Proteine durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängige CME beeinflusst (Ischebeck *et al.*, 2013). Eine reduzierte Expression der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinasen PIP5K1 und PIP5K2 resultierten in einer gestörten Verteilung der Fluoreszenzprotein-markierten leichten Clathrin-Untereinheit 2 (*clathrin light chain*, CLC2) in größere aber weniger membranassoziierte Nanodomänen (Ischebeck *et al.*, 2013).

In Studien zum polaren Spitzenwachstum wurde PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auch mit sekretorischen Prozessen in Verbindung gebracht (Ischebeck *et al.*, 2008). Dabei führte eine Überexpression der Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase-Gene *PIP5K4* und *PIP5K5* zu einer erhöhten Aktin-unabhängigen Sekretion der Zellwandkomponente Pektin (Ischebeck *et al.*, 2008). Aber auch Aktin-abhängige Membrantransportprozesse können durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> koordiniert werden (Krishnamoorthy *et al.*, 2014). Untersuchungen in *Arabidopsis* weisen darauf hin, dass Pls durch Interaktion mit den Exocyst-Untereinheiten SEC3 bzw. EXO70 zur Lokalisation des Exocyst-Komplexes an die PM beitragen (Bloch *et al.*, 2016, Synek *et al.*, 2021). Synek *et al.* (2021) vermuten, dass im Gegensatz zu anderen eukaryotischen Organismen die Bindung verschiedener Exocyst 70-Untereinheiten (EXO70) an die PM vielmehr durch PtdIns4P und PtdOH als durch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> vermittelt wird und dies als Teil einer Koinzidenzerkennung erfolgt.

## 1.14 Phosphoinositide und pflanzliche Abwehr

In den letzten Jahren zeigt sich für Pls und an ihrer Modifikation beteiligte Enzyme zunehmend eine Rolle in der pflanzlichen Abwehr. So wird der *P. infestans*-Effektor AVR3a durch Bindung an PtdIns-Monophosphate stabilisiert (Yaeno *et al.*, 2011). Eine Mutation der PtdIns-Monophosphat-Bindestelle und damit Beeinträchtigung der Bindung reduziert die Fähigkeit des Rezeptors den INF1-vermittelten Zelltod zu unterdrücken (Yaeno *et al.*, 2011).

Hung *et al.* (2014) berichteten, dass die heterologe Überexpression einer humanen Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase und daraus folgenden reduzierten Inositol-(1,4,5)-triphosphat-Gehalten eine erhöhte Suszeptibilität von Arabidopsis gegenüber *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 zur Folge hatte. Hingegen wurden die Arabidopsis-PtdIns4-Kinasen PI4K $\beta$ 1 und PI4K $\beta$ 2 als negative Regulatoren der SA-abhängigen Abwehr gegen *Pst* DC3000 beschrieben (Antignani *et al.*, 2015). In der Arabidopsis *pi4k $\beta$ 1/pi4k $\beta$ 2*-Doppelmutante ist der Signalweg stromaufwärts von EDS1, einem lipase-ähnlichem Protein sowie wichtigem Regulator von ETI und basaler Immunität, dereprimiert (Sasek *et al.*, 2014). Dadurch sind in diesen Pflanzen die Expression des SA-Synthesegens Isochorismat-Synthase 1 (ICS1) und nachfolgend die SA-Produktion erhöht, was zu einer erhöhten Expression SA-abhängiger PR-Gene sowie verstärkter ROS-Produktion, und letztlich erhöhter Resistenz gegen gegenüber *Pst* DC3000 und *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 führt (Sasek *et al.*, 2014, Antignani *et al.*, 2015). Antignani *et al.* (2015) schlagen vor, dass dies aus einer veränderten subzellulären Verteilung inaktiver oder aktivierter FLS2-Rezeptoren resultiert. Wichtige Regulatoren des Vesikeltransportes sind Mitglieder der Rab-GTPase-Familie, die je nach Bindung von GTP oder GDP aktiv oder respektive inaktiv sind. Aktive Rab-Proteine wirken durch Interaktion mit anderen Proteinen, sogenannten Rab-Effektoren (Antignani *et al.*, 2015). Die durch die Rab (*Ras-related in brain*)-GTPase RabA4B rekrutierten PI 4-Kinasen reichern Golgi-assoziierte Trans-Golgi-Netzwerk-Kompartimente mit PtdIns4P an und tragen so zur Rekrutierung weiterer Proteine, wie der pflanzlichen U-Box (PUB) E3-Ligase PUB13, die in die Sortierung und Aktivität von FLS2 und anderer SA-abhängiger Abwehr-Komponenten beteiligt ist, bei (Antignani *et al.*, 2015). Arabidopsis-Pflanzen, die mit dem hemibiotrophen Pilz *Colletotrichum higginsianum* (*Ch.*) infiziert wurden, zeigten eine starke Anreicherung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> sowie Akkumulation der PtdIns4P-5-Kinase 3 (PIP5K3) an der extra-invasiven hyphalen Membrane (EIH) (Shimada *et al.*, 2019). Überexpression der PI4P 5-Kinase *PIP5K3* führte zu erhöhter *Ch.*-Infektionsrate von *A. thaliana*-Kotyledonen (Shimada *et al.*, 2019). In ähnlicher Weise konnte nach Infektion von *A. thaliana* mit dem biotrophen Pilz *E. cichoracearum* eine verstärkte Akkumulation von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> in der EHM im Vergleich zur PM beobachtet werden (Qin *et al.*, 2020). Untersuchungen an der Arabidopsis-Doppelmutante *pip5k1 pip5k2*, in der die am stärksten exprimierten PIP5-Kinasen ausgeschaltet wurden, zeigten eine geringere Suszeptibilität dieser Mutante gegenüber *E. cichoracearum* und *Albugo candida* (Qin *et al.*, 2020).

Eine weitere PI4P 5-Kinase, PIP5K6, wurde kürzlich in Zusammenhang mit der Regulation PAMP-vermittelter Abwehrprozesse gebracht (Menzel *et al.*, 2019). In Arabidopsis wird PIP5K6 innerhalb der flg22-induzierten Abwehrantwort durch die MAP-Kinase 6 (MPK6) phosphoryliert (Hempel *et al.*, 2017, Menzel *et al.*, 2019). Dies resultierte in einer verringerten Aktivität von PIP5K6, was mit reduzierten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalten und einer verminderten CME der NADPH-Oxidase RbohD (*Respiratory burst oxidase homolog D*) korreliert (Menzel *et al.*, 2019). Die Autoren schlagen vor, dass eine transiente Stabilisierung von RbohD an der PM einen positiven Effekt auf die flg22-induzierte ROS-Produktion hat (Menzel *et al.*, 2019).

Darüber hinaus wurde in früheren Studien berichtet, dass die Behandlung mit verschiedenen PAMPs oder Elicitoren zur Induktion der PLC-Expression oder zum Anstieg der PLC-Aktivität oder des PtdOH-Gehaltes, eines Produkts der sequentiellen Aktivität von PLC und DGK bzw. der

Phospholipase D (PLD)-Aktivität, führt (van der Luit *et al.*, 2000, de Jong *et al.*, 2004, Yamaguchi *et al.*, 2005). Die Behandlung kultivierter Petersilienzellen mit Pep-13 führt ebenso zum transienten Anstieg von PtdOH. Dabei geht der Hauptteil des PtdOH-Anstiegs aus dem PLC- und DGK-abhängigen Signalweg hervor (unpubliziert, persönliche Mitteilung Prof. Dr. Dierk Scheel). Aus PLC-Aktivität stammendes PtdOH wurde als positiver Regulator in der Abwehr von *S. lycopersicum* gegen *Cladosporium fulvum* beschrieben (Vossen *et al.*, 2010). PLD-abstammendes PtdOH interagiert mit RbohD und steigert die ROS-Produktion (Zhang *et al.*, 2009). PtdOH kann weiterhin auch die Aktivität von PI4P 5-Kinasen steigern und somit die PI-Bildung regulieren (Im *et al.*, 2007). Ein Bezug des pflanzlichen PI-Systems zu Abwehrreaktionen gegen pathogene Mikroorganismen ist somit ein Gegenstand aktueller Forschung. Die vorliegende Arbeit befasst sich in diesem Rahmen mit der Charakterisierung eines neuen PI-modifizierenden Enzyms aus Kartoffel, das bei Stimulation durch das von *P. infestans* abgeleitete PAMP Pep-13 transkriptionell induziert wird.

### 1.15 Zielstellung

Grundlage für den Schutz der Nutzpflanze Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und die Züchtung neuer resistenter Sorten stellt die Erforschung der molekularen Mechanismen der Wirt-Pathogen-Interaktion dar. Eine Strategie bietet dabei die Erforschung der Rolle verschiedener genetischer Faktoren, die auf Wirtsseite zu dieser Interaktion beitragen. In vorausgegangenen Studien konnten in einem Kandidatengenansatz Gene der Kartoffelpflanzen identifiziert werden, die bei der Abwehr von *P. infestans* eine Rolle spielen können (Eschen-Lippold *et al.*, 2012a, Nietzsche *et al.*, 2019). Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung eines dieser Kandidatengene, das für eine putative Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase kodiert, sowie die Erforschung der Rolle des Genprodukts in der Abwehr gegen den Erreger der Kraut- und Knollenfäule (*P. infestans*).

Zunächst sollte die enzymatische Aktivität und Substratspezifität des kodierten Proteins biochemisch untersucht werden.

Darauf aufbauend sollte die subzelluläre Lokalisation der putativen Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase sowie ihrer Substrate und Reaktionsprodukte erfolgen.

Um die Funktion im Abwehrstoffwechsel zu untersuchen, sollten *S. tuberosum*-Pflanzen mit veränderter Expression des Kandidatengens hinsichtlich möglicher Veränderungen in der Abwehrantwort nach PAMP-Behandlung oder Infektion mit *P. infestans* untersucht werden.

Zusätzliche Untersuchungen in heterologen Systemen sollten weiteren Aufschluss über die mögliche biologische Funktion des Kandidatengens geben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Medien, Oligonukleotide, Vektoren

**Tabelle 2.1: Verwendete Medien**

<p><b>2MS-Medium</b>            4,41 % MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL)            6 % (w/v) <i>plant agar</i>            20 % (w/v) Saccharose            pH 5,0</p>	<p><b>3MS-Medium</b>            4,41 g/l MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL)            (6 % (w/v) <i>plant agar</i>)            0,5 g/l MES            30 g/l Saccharose            pH 5,8</p>
<p><b>GMS-Medium</b>            16 g/l Glucose            0,5 g/l MES            4,41 g/l MS-Salze (Duchefa)            pH 5,8            (6 g/l <i>plant agar</i>)</p>	<p><b>Vitaminlösung</b>            5 % (w/v) Nicotinsäure            5 % (w/v) Pyridoxin-HCl            10 % (w/v) Thiamin-HCl            20 % (w/v) Glycin</p>
<p><b>GC75-Medium</b>            1% Vitaminlsg. (s. o.)            0,25 g/l Carbenicillin            0,002 g/l Zeatinriboside            0,02 mg/l NAA            0,02 mg/l GA3            in GMS (s. o.)            0,05 g/l Kanamycin</p>	<p><b>GC76-Medium</b>            1% (v/v) Vitaminlsg. (s. o.)            0,1 g/l Carbenicillin            0,1 mg/l BAP            5 mg/l NAA            in GMS (s. o.)</p>
<p><b>Hafer-Bohne-Medium</b>            3,4 % (w/v) Bohnenmehl            1,7 % (w/v) Hafermehl            0,85 % (w/v) Saccharose            1,5 % (w/v) Agar</p>	<p><b>LB-Medium</b>            10 g/l Bacto-Trypton            5 g/l Bacto-Yeast Extract            5 g/l NaCl            (15 g/l Agar)</p>
<p><b>YEB-Medium</b>            5 g/l Bacto-Beef Extrakt            1 g/l Hefe-Extrakt            5 g/l Bacto-Peptide            5 g/l Saccharose            2 mM MgSO<sub>4</sub>            (15 g/l Agar)</p>	

Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Gen	Verwendungsziel
StIPP_fw_1	CACCATGGAGGGACTATGTGTAAAG C	<i>StIPP</i>	Klonierung in pENTR™/D-TOPO®
StIPP_rev_1	GGAATATGAATACCAATTATTTGTTTC	<i>StIPP</i>	
StIPP_oS_fw	ATGGAGGGACTATGTGTAAAGC	<i>StIPP</i>	Klonierung in
StIPP_oS_rev	TTTGTTC AATTTTAAGCATAGATG	<i>StIPP</i>	pCR™8/GW/TOPO®
StIPP-RNAi_F	CACCAACTTCGTCTCATCTTTGCATC	<i>StIPP</i>	Klonierung in pENTR™/D-
StIPP-RNAi_R	CTTCTGATTAACCAACCCAATC	<i>StIPP</i>	TOPO®
StIPP_F_qRT	GGATTGGGTTGGTTAATCAGAA	<i>StIPP</i>	In Kombination mit Sonde #68
StIPP_R_qRT	AACCATTTGTATGCCTTTGTAGC	<i>StIPP</i>	(Roche) Transkriptgehaltbe- stimmung von <i>StIPP</i>
mCH_F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG		Klonierung in pCR™8/GW/TOPO®
mCH_R	T TACTTGTACAGCTCGTCCATGCCG		Klonierung in pCR™8/GW/TOPO®
mCH_FAPP_R	TTACAGAGCGACCAGCCACCTC		Klonierung in pCR™8/GW/TOPO®
PH_linker_F	gtggagctggagctgcaggaGATGAGGAT CTACAGGCGCT		Klonierung in pCR™8/GW/TOPO®
mCH_PH_R	TTAGATCTTGTGCAGCCCCAGCAC		Klonierung in pCR™8/GW/TOPO®
StEF1α_RT_5	CACTGCCAGGTCATCATC	<i>StEF1</i> <i>α</i>	In Kombination mit Sonde #162
StEF1α_RT_3	GTCGAGCACTGGTGCATATC	<i>StEF1</i> <i>α</i>	(Roche) Transkriptgehaltbe- stimmung von <i>EF1α</i> (Referenz- gen)

Tabelle 2.3: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendete Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
<i>pENTR™/D-TOPO®</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Kan <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific
<i>pCR™8/GW/TOPO®</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Spec <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific
<i>pCR™8-StIPP_oS</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Spec <sup>R</sup> , <i>StIPP</i> -Gen ohne StOPP-Codon	diese Arbeit
<i>pCR™8-mCherryFAPP1-PH</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Spec <sup>R</sup> , <i>FAPP1-PH</i> -Gen mit N-term <i>mCherry</i> -Fusion	diese Arbeit
<i>pCR™8-mCherryPLC-PH</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Spec <sup>R</sup> , <i>PLC-PH</i> -Gen mit N-term <i>mCherry</i> -Fusion	diese Arbeit
<i>pCR™8-mCherry</i>	Gateway®-Entry-Vektor: attL1, attL2, Spec <sup>R</sup> , <i>mCherry</i> -Gen	diese Arbeit

<b><i>pDest-N112</i></b>	attB1, attB2, T7-Promotor, N-terminale His <sub>10x</sub> -MBP-Markierung; Carb <sup>R</sup>	Dyson <i>et al.</i> (2004)
<b><i>pDest-N112-StIPP</i></b>	attB1, attB2, T7-Promotor, N-terminal His <sub>(10)</sub> -MBP-fusioniertes <i>StIPP</i> -Gen; Carb <sup>R</sup>	kloniert durch R. Stauder
<b><i>pHellsgate12</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; 2x: attP1, attP2; <i>ccdB</i> -Gen; Cam <sup>R</sup>	(Wesley <i>et al.</i> , 2001)
<b><i>pHellsgate12-StIPP-RNAi</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; <i>StIPP-RNAi</i> -Sequenz; Cam <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b><i>pENTRY D-FAPP-mc</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>FAPP1-PH</i> mit N-terminaler <i>mCherry</i> -Markierung; attR1, attR2; Carb <sup>R</sup>	Dr. I. Stenzel (Abt. Pflanzenbiochemie, MLU)
<b><i>pCambia- PLCδ-PH-dsRed</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>PLC-PH</i> mit N-terminaler <i>dsRed</i> -Markierung; attR1, attR2; Kan <sup>R</sup>	Dr. I. Stenzel (Abt. Pflanzenbiochemie, MLU)
<b><i>pGWB14</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , mit C-terminaler HA <sub>(3)</sub> -Markierung; attR1, attR2; Kan <sup>R</sup>	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
<b><i>pGWB14-mcFAPP</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>mCherry-FAPP1-PH</i> -Fusion; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b><i>pGWB14-mcPH</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>mCherry-PLC-PH</i> -Fusion; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b><i>pGWB14-mCherry</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>mCherry</i> ; Kan <sup>R</sup>	diese Arbeit
<b><i>pB7FWG2</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; attR1, attR2; Amp <sup>R</sup> ; C-terminales HA <sub>(3)</sub> -Markierung	Karimi <i>et al.</i> (2002)
<b><i>pB7FWG2-StIPP_oS (StIPP-GFP)</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>StIPP</i> -Gen mit C-terminaler GFP-Markierung	diese Arbeit
<b><i>pAGM32381</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> , <i>StIPP</i> -Gen mit C-terminaler <i>mCherry</i> Markierung	Dr. S. Marillonnet (IPB, Halle (Saale))
<b><i>pAGM32224</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; Leervektor	Dr. S. Marillonnet (IPB, Halle (Saale))
<b><i>pGWB555 RFP:Avrblb2</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; <i>RFP-Avrblb2</i> -Fusion; Spec <sup>R</sup>	Yasin Dagdas (GMI, Wien, Österreich)
<b><i>pUGW14</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; attR1, attR2; Amp <sup>R</sup> ; C-terminales HA <sub>(3)</sub> -Markierung	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2007)
<b><i>pUGW14-StIPP_oS</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i> ; Amp <sup>R</sup> ; <i>StIPP</i> -Gen mit C-terminaler HA <sub>(3)</sub> -Markierung	diese Arbeit
<b><i>pUGW15-CFP</i></b>	<i>pCaMV35S-Promotor</i>	AG Lee (IPB, Halle (Saale))

## 2.2 Verwendete Chemikalien

Wenn nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien von Appllichem GmbH, Carl Roth, Merck oder SIGMA Aldrich verwendet. Die Phosphoinositide für die enzymatischen Tests stammten von Avanti Polar Lipids; die Enzyme Cellulase R10 und Macerozyme™ R10 von Yakult Pharmaceuticals.

## 2.3 Verwendete Pflanzen

Allen in dieser Arbeit verwendeten Kartoffelpflanzen liegt der Wildtyp *S. tuberosum* L. cv. Désirée zugrunde. Zusätzlich zum WT standen drei verschiedene mit einem Leervektor (EV, *empty vector*) transformierte Kartoffel-Linien zur Verfügung: die mit dem Leervektor pGPTV transformierte Linie B2, die mit dem Leervektor pHellgate 8 (pHG8) transformierte Linie j3 sowie die mit dem Leervektor pAGM32224 transformierte Linie L.

Die Kartoffelzellkulturen wurden auf Basis der *S. tuberosum* L. cv. Désirée WT-Pflanzen freundlicherweise von Frau. S. Krüger (IPB, Halle (Saale)) erzeugt.

## 2.4 Verwendete *P. infestans*-Isolate

Bei den verwendeten Isolaten handelte es sich um *P. infestans* CRA 208m2 (freundlicherweise von F. Mauch, Universität Fribourg, Schweiz zur Verfügung gestellt), welcher GFP (*green fluorescent protein*) exprimiert (Si-Ammour *et al.*, 2003) sowie das *P. infestans*-Isolat 88069 (van West *et al.*, 1998). Das Isolat CRA 208m2 wurde freundlicherweise von F. Mauch (Universität Fribourg, Schweiz) und das Isolat 88069 wurde freundlicherweise von Yasin Dagdas (Gregor Mendel Institut für Molekulare Pflanzenbiologie, Wien, Österreich) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der *P. infestans*-Isolate erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (Tabelle 2.1).

## 2.5 Bakterien

Für Klonierungsarbeiten wurden chemokompetente *Escherichia coli* DH5α und One Shot™ TOP10 *E. coli*-Zellen (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Expression des *StIPP*-Gens als N-terminales His-MBP-Fusionskonstrukt (*MBP-StIPP*) erfolgte in *Escherichia coli*-Rosetta gami-Zellen, die zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung standen.

Für die Agrobakterium-vermittelte Transformation von *S. tuberosum* wurde der *A. tumefaciens*-Stamm AGL0 (Lazo *et al.* 1991), für die transiente Transformation von *N. benthamiana* der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 verwendet.

Kompetente *E. coli* DH5α-Zellen sowie *A. tumefaciens*-Zellen wurden freundlicherweise durch Fr. U. Smolka (IPB Halle (Saale)) zur Verfügung gestellt.

## 2.6 Peptide

Das Peptid Pep-13 (VWNQPVRGFKVYE) sowie das inaktive Analogon W2A (VANQPVRGFKVYE) wurden von S. Krüger, das Peptid flg22 von P. Majovsky hausintern mittels Festphasensynthese mit einem Economy Peptide Synthesizer EPS221 (Abimed) hergestellt.

## 2.7 Vermehrung und Anzucht der verwendeten Pflanzen

Die Vermehrung der Kartoffellinien erfolgte als sterile Meristemkultur auf 2MS-Medium (Tabelle 2.1) in der Phytokammer (16 h Licht bei  $\sim 140 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ /8 h Dunkelheit, 22 °C). Diesem wurden gegebenenfalls entsprechende Selektions-Antibiotika zugefügt. Die weitere Anzucht in der Phytokammer erfolgte auf einem 1:1-Gemisch aus gedämpfter Erde (ED 73) und gedämpften Sand in 11 x 11 cm-Plastiktöpfen unter Langtagbedingungen (16 h Licht  $\sim 140 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ /8 h Dunkelheit, 60 % rel. Luftfeuchte, 20 °C) für drei bis vier Wochen.

Die Anzucht von Kartoffelzellkulturen erfolgte in Dunkelheit unter ständigem Schwenken bei 120 rpm und 22 °C. Die Zellkulturen wurden wöchentlich umgesetzt. Die Elizitierung mit Peptiden fand fünf Tage nach Umsetzen statt.

Für transiente Assays standen *N. benthamiana*-Pflanzen sowie *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) zur Verfügung. *N. benthamiana*-Pflanzen wurden auf CL Ton Kokos-Substrat (gedämpft) im Gewächshaus bzw. für die Infektionsexperimente in der Phytokammer Langtagbedingungen (16 h Licht  $\sim 140 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ /8 h Dunkelheit, 60 % rel. Luftfeuchte, 20 °C) angezogen. Die Anzucht der *A. thaliana*-Pflanzen des Ökotyps Columbia-0 (Col-0) für die Protoplastengenerierung erfolgte auf einem Gemisch aus dampfsterilisierten Einheitserde-Vermiculit (im Verhältnis 3:1) in Phytokammern unter Kurztagbedingungen (8 h Licht  $\sim 150 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ /16 h Dunkelheit, 60 % rel. Luftfeuchte) bei 22 °C.

## 2.8 Transformation

### 2.8.1 Transformation von Bakterien

Die Transformation chemokompetenter *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ - und TOP10 Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen durch die Hitzeschockmethode. Dazu wurden die kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, Plasmid-DNA hinzugefügt und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 sec. Wieder auf Eis wurde zur Bakteriensuspension 200  $\mu\text{l}$  LB-Medium (Tabelle 2.1) hinzugefügt und diese bei 37 °C für 1 h bei 120 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde auf LB-Platten (LB-Medium, 1,5 % Agar), die entsprechende Selektionsantibiotika enthielten ausplattiert und ü. N. bei 37 °C inkubiert.

Die Transformation von *A. tumefaciens*-Zellen der Stämme AGL-0 bzw. GV3101 erfolgte in Anlehnung an Hofgen and Willmitzer (1988) unter sterilen Bedingungen. 200  $\mu\text{l}$  kompetente Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 0,5 – 1,0  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließender Zugabe von 1 ml YEB-Medium (Tabelle 2.1) erfolgte die Inkubation für 2 - 4 h bei 28 °C und 120 rpm. Von dieser Kultur wurden 200  $\mu\text{l}$  und 500  $\mu\text{l}$  zur Selektion auf YEB-Agar-Platten (YEB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar) unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums ausplattiert und für 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Im Anschluss konnten einzelne Kolonien weiter auf erfolgreiche Transformation analysiert werden.

### 2.8.2 Transformation von *N. benthamiana*

Die transiente Transformation von *N. benthamiana* erfolgte entsprechend Bozkurt *et al.* (2015).

### 2.8.3 *Agrobacterium*-vermittelte Blattscheibentransformation von *S. tuberosum*

Für die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation von Kartoffelpflanzen wurde die entsprechende *A. tumefaciens*-Kultur in 20 ml YEB-Flüssigmedium unter Verwendung des entsprechenden Antibiotikums über Nacht bei 28 und 120 rpm im Schüttelinkubator angezogen. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min bei 4000 g und 8 °C pelletiert, danach in 20 ml 10 mM MgCl<sub>2</sub> vorsichtig durch Schwenken resuspendiert und erneut wie beschrieben pelletiert. Das Pellet wurde in 10 ml 3MS-Medium erneut vorsichtig resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Von Pflanzen aus der Meristemkultur wurden unter sterilen Bedingungen Blätter abgeschnitten, mittels eines Skalpell mehrfach eingeritzt und mit der Oberseite nach unten in einer Petrischale auf 10 ml 3MS-Medium, welches 100 µl der fertigen *A. tumefaciens*-Suspension enthielt, im Dunkeln für zwei Tage bei 22 °C schwimmend inkubiert. Anschließend wurden die Blätter unter sterilen Bedingungen zur Entfernung überschüssigen Transformationsmediums auf Filterpapier abgelegt und dann, weiterhin mit der Oberseite nach unten, auf CG76-Medium, welches entsprechende Antibiotika enthielt, zur Kallusinduktion transferiert. Nach einwöchiger Inkubation in der Phytokammer (16 h Licht bei ~140 µE s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup>/8 h Dunkelheit, 22 °C) die Blätter auf CG75-Medium mit entsprechenden Antibiotika umgesetzt. Anschließend erfolgt das Umsetzen aller 14 Tage bis die aus den Kalli wachsenden Pflanzen groß genug sind. Die gebildeten Pflanzensprosse werden unter sterilen Bedingungen abgeschnitten und auf 2MS-Medium inklusive entsprechender Antibiotika umgesetzt. Die weitere Vermehrung erfolgt wie unter Punkt 2.7 beschrieben.

### 2.8.4 Transfektion von *A. thaliana*-Protoplasten

Arabidopsis-Protoplasten wurden in Anlehnung an Yoo *et al.* (2007) aus voll ausgebildeten Blättern vier Wochen alter *A. thaliana*-Pflanzen angefertigt. Dabei wurden folgende Änderungen vorgenommen. Nach Infiltration der Blattstreifen mit der Enzymlösung erfolgte die Inkubation für 3 h bei 18 °C im Dunkeln. Die anschließenden Waschschrte erfolgten auf Eis. Die Transfektion der Zellen erfolgte unter Verwendung von 10 µg pUGW14-STIPPoS- bzw. 1 µg pUGW15-CFP-Plasmid-DNA je 100 µl Protoplastensuspension. Nach Transfektion wurden die Protoplasten aliquotiert (je 300 µl) und für 14 -16 h bei 18 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zelle für die weitere Proteinanalyse pelletiert, der Überstand vorsichtig entfernt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Vor Analyse im Western Blot wurden die Proben mit 4x Ladepuffer versetzt und die Proben für die Analyse der FLS2-Abundanz 10 min bei 65 °C inkubiert.

## 2.9 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde das nachfolgend aufgeführte Standardprotokoll verwendet. Die in Tabelle 2.4 aufgeführten Komponenten wurden entsprechend der Volumenangaben zusammengeführt. Dieser Ansatz wurde anschließend

entsprechend des in Tabelle 2.5 aufgeführten Thermalprofils im Thermocycler inkubiert. Das erhaltene Amplifikat wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf korrekte Länge geprüft.

**Tabelle 2.4: Standardzusammensetzung PCR-Ansatz**

Komponente	Volumen in $\mu\text{l}$	Endkonzentration
Template-DNA	1	10 pg - 1 $\mu\text{g}$
H <sub>2</sub> O <sub>tridest</sub>	ad 50 $\mu\text{l}$	-
10x-Dream Taq-PCR-Puffer	5	1x
2 mM dNTPs	5	250 $\mu\text{M}$
100 $\mu\text{M}$ Primer <sub>forward</sub>	0,5	1 $\mu\text{M}$
100 $\mu\text{M}$ Primer <sub>reverse</sub>	0,5	1 $\mu\text{M}$
Dream-Taq-Polymerase (5U/ $\mu\text{l}$ )	0,5	0,05 U/ $\mu\text{l}$

H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> – 3-fach destilliertes Wasser

**Tabelle 2.5: Standard-Thermalprofil im Thermocycler für PCR mit DreamTaq-DNA-Polymerase (Fermentas Thermo Scientific)**

PCR-Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Zeit	Zyklus
Initialdenaturierung	95	2 Min.	1
Denaturierung	95	20 Sek.	} 30 - 40
Annealing	$T_{m\text{Primer}} - 5$	30 Sek.	
Verlängerung	72	1 Min./kb	
End-Verlängerung	72	7	

$T_{m\text{Primer}}$  – Schmelztemperatur der Primer, Min. – Minute, Sek. – Sekunde, kb - Kilobasen

## 2.10 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Auftrennung von Nukleotidfragmenten erfolgte entsprechend der berechneten Fragmentgrößen in 1 bis 2 %-igen (w/v) Agarose-Gelen (Biozym LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA).

Als Marker für die Southern Blot- und Northern Blot-Analysen wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst*I verdaute  $\lambda$ -Phagen-DNA (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) verwendet.

## 2.11 Aufreinigung von Nukleinsäurefragmenten

Zur Aufreinigung von PCR-Amplikons wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung Gelstücke, die das gewünschte Fragment enthielten unter UV-Licht ausgeschnitten und anschließend mit dem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit (QIAGEN, Hilden) entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt.

## 2.12 Klonierung

Die kodierende Sequenz von StIPP (Sotub04g033080.1.1) wurde wie in Eschen-Lippold et al. (2010) beschrieben unter der Verwendung der genspezifischen Oligonukleotide StIPP\_fws\_1 und StIPP\_rev\_1 (Tabelle 2.2) durch R. Stauder vor Beginn dieser Arbeit amplifiziert, zunächst in den

Vektor pENTR™/D-TOPO® entsprechend der Herstellerangaben kloniert und anschließend mittels LR-Rekombination in den Vektor pDEST-N112 (Dyson et al., 2004) kloniert. Der resultierende Vektor pDEST-N112-StIPP diente zur bakteriellen Expression der StIPP als Fusionsprotein mit N-terminalen His(10x)-MBP-Tag. Die Amplifikation der cDNA ohne Stopcodon erfolgte unter Verwendung der Dream Taq-Polymerase (5 U/μl) (Thermo Fischer Scientific) und des Oligonukleotidpaares StIPP\_oS\_fw und StIPP\_oS\_rev (Tabelle 2.2) Das resultierende Amplikon wurde in den Vektor pCR™8/GW/TOPO® (Thermo Fisher Scientific) entsprechend der Herstellerangaben und mittels LR-Rekombination in den Vektor pB7FWG2 (Karimi et al., 2002) kloniert. Die Nukleotidsequenzen von mCherry, mCherry-PLCδ1-PH und mCherry-FAPP1-PH wurden anhand von Dr. I. Stenzel (Abteilung Pflanzenbiochemie, MLU Halle-Wittenberg) zur Verfügung gestellten Plasmide unter Verwendung genspezifischer Oligonukleotidpaare (Tabelle 2.2) amplifiziert, in den Vektor pCR™8/GW/TOPO™ und anschließend mittels LR-Rekombination in den Vektor pGWB14 (Tabelle 2.3) kloniert. Die generierten Vektoren pB7FWG2-StIPP\_oS, pGWB14-mCherry, pGWB14-mCherry-PLCδ1-PH und pGWB14-mCherry-FAPP1-PH dienten der transienten pflanzlichen Expression.

Ein 312 bp-langes *StIPP*-RNAi-Fragment wurde unter Verwendung der Primer StIPP-RNAi-F und StIPP-RNAi-R amplifiziert, in den Vektor pENTR™/D-TOPO® und anschließend in den binären Vektor pHellsgate12 (Wesley et al., 2001) mittels LR-Rekombination kloniert. Der generierte Vektor wurde zur Agrobakterien-vermittelten Transformation von *S. tuberosum* verwendet.

## 2.13 DNA-Isolierung

Blattmaterial wurde in Form von zwei bis drei kleinen Sterilkultur-Blättern in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert, mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1.5 % SDS) versetzt, gemischt und für 10 min bei 65 °C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 300 μl 5 M-Kaliumacetat-Lösung erfolgte eine 10 Min. Inkubation im Eisbad. Anschließend wurden die Proben für 10 Min. bei 15 000 Rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit 800 μl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt, vorsichtig gemischt und für 15 min bis 60 min geschwenkt. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 12000 Rpm wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit 800 μl Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugation für 10 min bei 15000 Rpm wurde die DNA pelletiert. Dieses Pellet wurde anschließend mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in 15 μl Wasser gelöst.

## 2.14 RNA-Isolierung

Die Isolierung der gesamt RNA erfolgte mittels TRIZOL entsprechend der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop™ 8000 Spektralphotometer (Thermo Fischer Scientific).

## 2.15 Southern Blot

Für die Southern-Blot-Analyse wurde die geschnittene genomische DNA gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarose-Gel zur Markierung der DNA-Fragmente 10 Min. im Ethidium-Bromit-Bad inkubiert und zur Dokumentation im Transiluminator unter Verwendung

eines Lineals fotografiert. Nachfolgend wurde das Gel für 45 min in einer Denaturierungslösung inkubiert, zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen, 45 min in einer Neutralisierungslösung inkubiert und erneut zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Das eigentliche Blotten erfolgte dann nach Angaben von (Schmidt *et al.*, 1999)

## 2.16 Northern Blot

Die Northern-Blot-Analyse erfolgte entsprechend (Geerts *et al.*, 1994; Lehrach *et al.*, 1977).

## 2.17 Analyse des Transkriptgehaltes

Zwei µg der RNA wurden mittels DNaseI (RNase-free DNase Set, Qiagen) entsprechend Herstellerangaben verdaut und anschließend für eine cDNA-Synthese mittels des RevertAid H Minus First Strand CDNA Synthesis-Kits (Thermo Scientific™) entsprechend der Herstellerangabe und unter Verwendung der Oligo-dT-Primer eingesetzt. Die Transkriptmengenbestimmung erfolgte mittels quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (*quantitative real time-PCR*, qRT-PCR) und unter Verwendung von spezifischen TaqMan-Sonden (Roche Universal Probe Library) und Oligonukleotiden (Tabelle 2.6). Hierfür wurden 3 µl der 1:10-verdünnten cDNA mit 17 µl des Maxima Probe qPCR Master Mixes (Thermo Scientific™) entsprechend der Herstellerangaben versetzt. Die Amplifikation und Messung der cDNA-Proben erfolgte mit dem Mx3005P qPCR System (Agilent). Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens EF1α.

**Tabelle 2.6: Verwendete Sonden und Oligonukleotide für die Transkriptbestimmung mittels qRT-PCR**

<sup>1</sup>Für Oligonukleotidsequenzen siehe Tabelle 2.2

Gen	Sonde	Oligonukleotidpaar <sup>1</sup>	
StIPP	68	StIPP_F_qRT	StIPP_R_qRT
EF1α	208	StEF1α_RT_5	StEF1α_RT_3

## 2.18 *StIPP*-Expression in *E. coli* und Aufbereitung des Lysats für enzymatische Assays

Für die Expression wurden *pDEST-N112-StIPP* oder der Leervektor, welcher nur die Sequenz für das Maltosebindeprotein enthielt, in *Escherichia coli* Rosetta gami-Zellen transferiert. Die transferierten Zellen wurden in LB-Medium unter Anwesenheit entsprechender Antibiotika über Nacht bei 37 °C und 120 rpm kultiviert. Mit diesen Vorkulturen wurden Hauptkulturen auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 angeimpft und diese bei 37 °C und 120 rpm. Die Proteinbiosynthese wurde bei einer OD<sub>600</sub> = 0,4 mit 1 mM IPTG induziert. Zwei Stunden nach Induktion wurden die Zellen bei 4 °C und 5000 rpm für 20 min geerntet. Das gewonnene Pellet wurde bis zum weiteren Gebrauch kurzfristig bei -20 °C gelagert. Zur Proteinextraktion wurden die Pellets auf Eis aufgetaut und in Lysispuffer (50 mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-Puffer pH 8,0, 300 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1x Halt™ Proteaseinhibitor-Cocktail (Thermo Scientific), 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid and 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert. Die Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert und 6-mal für 5 Sekunden mit 10 sek Pause sonifiziert. Anschließend

wurden 2,73 Kuniz units DNaseI (Qiagen) hinzugefügt und für 12 min auf Eis inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann 20 min bei 10 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand enthielt alle löslichen Enzyme inklusive der rekombinanten StIPP- bzw. des MBP-Proteins. Diese gereinigte Lysat wurde für die enzymatischen Analysen verwendet.

## 2.19 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Vor Analyse im Western Blot wurden die Proteinproben mit 4x Ladepuffer versetzt und, wenn nicht anders für 3 min bei 95 °C inkubiert. Die Proben für die Analyse der FLS2-Abundanz wurden 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Auftrennung der vorbereiteten Proteinproben erfolgte mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter Verwendung von 10 %igen Trenngelen (10 % Acrylamid/Bis-acrylamid (37.5:1); 0.375 M Tris/HCl pH 8,8; 0,1 % SDS; 0,04 % TEMED; 0,1 % APS), 5 %igen Sammelgelen (5 % Acrylamid/Bis-acrylamid (37.5:1); 0.125 M Tris/HCl pH 6,8; 0,1 % SDS; 0,1 % TEMED; 0,1 % APS) und einfachem Laufpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 0,1% SDS). Als Marker diente der SERVA Triple Color Protein-Standard III (SERVA Electrophoresis GmbH). Anschließend wurde das Trenngel mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran (Parablot NCL, Macherey-Nagel) transferiert. Die Proteine für die Quantifizierung der FLS2-Abundanz mittels SPL-Kit (siehe 2.21) wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert.

## 2.20 Western Blot

**Tabelle 2.7 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper**

Antikörper (AK)	Typ	Wirt	Verdünnung	Quelle
anti-His	primärer AK	Maus	1:6 000	Sigma-Aldrich
anti-HA	primärer AK	Maus	1: 10 000	BIOZOL
anti-RFP (6g6)	primärer AK	Maus	1:1 000	ChromoTek
anti-FLS2	primärer AK	Kaninchen	1:500	Prof Dr. Trujillo, RWTH Aachen University
anti-PIN1 (C2)	primärer AK	Kaninchen	1:500	Abiocode
anti-Maus-HRP	sekundärer AK	Ziege	1:25 000	Sigma-Aldrich
anti-Kaninchen-HRP	sekundärer AK	Ziege	1:20 000	Agrisera
IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG	sekundärer AK	Ziege	1:10 000	Li-COR

Der Proteintransfer aus dem SDS-Gel auf Nitrozellulosemembran erfolgte im Halbtrocken-(*semi dry*) Verfahren in Transferpuffer (20 % MeOH, 25 mM Tris, 15 mM Glycin, 1% SDS) für 60 min bei 1 mA pro cm<sup>2</sup> Membranfläche. Der Transfer auf die PVDF-Membran erfolgte im Wet-Blot-Verfahren unter Verwendung der Mini Trans-Blot® elektrophoretischen Transferkammer (Bio-Rad Laboratories, Inc.) und Transferpuffer ohne SDS (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol) entsprechend der Herstellerangaben für 1,5 h bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche. Nach Transfer wurden die Membran für 1 h in 5 %iger Blockier-Lösung (5 % Milchpulver in 1x TBS-T (50 mM Tris/HCl pH

7.6; 150 mM NaCl; 0.1 % Tween 20)) bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Anschließend erfolgte die Antikörperinkubation entsprechend der in Tabelle 2.7 angegebenen Verdünnungen in 3 %iger Blockier-Lösung (3 % Milchpulver in 1x TBS-T) entweder über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT auf dem Rollschüttler. Die Detektion erfolgte entweder mittels ECL Prime-Kit (Amersham) oder SuperSignal™ West Femto Substrat (Thermo Scientific™) entsprechend der Herstellerangaben.

## 2.21 Quantifizierung mittels SPL-Kit

Zur Quantifizierung der FLS2-Mengen innerhalb der Protoplastenproben wurde das SPL-Kit der Firma DyeAgnostics verwendet. Die Markierung des Gesamtproteins und die Verwendung des internen Standards erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Detektion der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte mittels Typhoon™ FLA 9500 (GE Healthcare, München, Deutschland). Der FLS2-Rezeptor wurde mit Hilfe eines FLS2-Antikörpers, (Verdünnung 1:500, freundlicherweise von Prof. Dr. Trujillo, (RWTH Aachen University) zur Verfügung gestellt) entsprechend des Protokolls der Firma LiCOR detektiert. Dafür wurde als sekundärer Antikörper der IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG entsprechend der Angaben zur Verdünnung in Tabelle 2.7 verwendet.

## 2.22 Strippen der Proteinmembran nach FLS2-Detektion

Nach Detektion des FLS2-Proteins wurden die Antikörper und Detektionslösungen von der Proteinmembran durch 30-minütige Inkubation in Stripping-Puffers (0,2 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 2,0, 100 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol) bei RT unter Schwenken entfernt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit reichlich H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> und einmal mit 1x TBST für jeweils 10 min bei RT gewaschen. Nach 1 h Inkubation in 5-%iger Blockierlösung stand die Membran für die Detektion mit weiteren Antikörpern zur Verfügung.

## 2.23 Enzymatische Assays

Um die Substratspezifität zu bestimmen wurden verschiedene putative Substrate mit dem rekombinanten StIPP-Protein (siehe 2.18) inkubiert und mittels Dünnschichtchromatographie untersucht.

### 2.23.1 Phosphatase-Assay (Dephosphorylierungsassay)

Die enzymatische Aktivität der StIPP wurde gegenüber verschiedenen Phosphoinositiden und Inositolphosphaten untersucht. Die Phosphoinositide (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)) PtdIns3P (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-myo-inositol-3'-phosphat), PtdIns4P (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-1'-myo-inositol-4'-phosphat), PtdIns5P (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-1'-myo-inositol-5'-phosphat), PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-1'-myo-inositol-3',5'-bisphosphat) und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (L- $\alpha$ -phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat aus Schweinehirn) wurden jeweils in 5  $\mu$ l einer 2 %igen TritonX-100 in H<sub>2</sub>O gelöst und für 10 min auf Eis sonifiziert. Pro Reaktion wurden 3-5  $\mu$ g Lipid gelöst und mit 12,5  $\mu$ l des Lipidassay-Puffers (50 mM HEPES, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 7,5) (Ercetin and Gillaspay, 2004) und 7,5  $\mu$ l des MBP- oder StIPP-enthaltenden Lysats gemixt. Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Lipide wie von Cho *et al.* (1992) beschrieben extrahiert und in einer DC mittels

Chloroform:Methanol:Ammoniumhydroxid:Wasser (50:50:4:11 (v/v/v/v)) als Laufmittel auf HPTLC Silica S60 Platten (Merck, Darmstadt, Germany) aufgetrennt. Die aufgetrennten Lipide wurden wie in König *et al.* (2008) beschrieben sichtbar gemacht.

Die löslichen Inositolphosphaten [Ins(1,3,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub>] (Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA)) wurden als 10 mM Stocklösung in H<sub>2</sub>O bei -20 °C gelagert. Zur Überprüfung der Aktivität wurden 0,4 mM Substrat unter gleichen Bedingungen wie die Lipide (25 mM HEPES, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, pH 7,5) mit dem enzymhaltigen Lysat für 2 h bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Ansätze mit Reaktionspuffer im Verhältnis 1:2 verdünnt und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Mögliche Reaktionsprodukte wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Nutzung eines Dionex Ultimate 3000 Systems ausgestattet mit einer starken Anionenaustausch (SAX)-Säule (Dionex/Thermo, Darmstadt, Germany), wie durch Stevenson-Paulik *et al.* (2005) beschrieben, freundlicherweise von Dr. Tobias Heinz detektiert.

### 2.23.2 *In vitro* Lipid-Kinase-Test (Rephosphorylierungstest)

Um zu testen, ob das StIPP-Reaktionsprodukt an bestimmten Positionen des Inositol-Ringes rephosphoryliert werden kann, wurden die extrahierten Lipide in 10 µl 2 %-TritonX-100 gelöst und zu 30 µl Reaktionsansatz (37,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 mM NaMoO<sub>4</sub>; 2,5 mM ATP; und 1 µl [ $\gamma$ <sup>33</sup>P]-ATP; 3 mM Tris, pH 7,5) hinzugefügt. Dieser Mix wurde in zwei Teile geteilt und jeder Teil zu einer 30 µl Enzymlösung, welche 0,15 µg Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-Kinase 2 alpha (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland) bzw. 0,2 µg Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase 1 alpha (Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Deutschland), in 30 mM Tris, pH 7,5 enthielt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT, wurden die Lipide wie oben beschrieben extrahiert, gelöst und mittels DC auf Silica S60 Platten (Merck, 237 Darmstadt, Germany) separiert. Der <sup>33</sup>P-Einbau wurde mittels Phosphor-Imager-Systems (BAS-1500, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) und sensitiven Imager Screens (BAS-MP 2040s, Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland) visualisiert.

### 2.24 Konfokale Mikroskopie transient transformierter Tabakepidermiszellen

Die mikroskopische Untersuchung transient transformierter *N. benthamiana*-Epidermiszellen erfolgte mittels Laser Scanning Mikroskop LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) oder LSM780 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) unter Verwendung der Objektive 20x, 40x oder 63x. Folgende Wellenlängen wurden für die Anregung mittels Laser und die Emission eingestellt: GFP – Anregung 488 nm, Emission 495–550 nm, mCherry and RFP – Anregung 561 nm, Emission 571–624 nm). Bei Co-Lokalisationsstudien erfolgte die Untersuchung durch sequentielles Scannen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der IMAGEJ-Software (1.49b).

### 2.25 Elektronenmikroskopie *P. infestans*-infizierter *S. tuberosum*-Blätter

Die Fixierung der *P. infestans*-infizierten *S. tuberosum*-Blätter, die weitere Probenvorbereitung sowie die Mikroskopie erfolgten wie in Eschen-Lippold *et al.* (2012a) beschrieben durch Dr. Gerd Hause (Biozentrum, MLU Halle-Witteberg). Eine Immunogoldfärbung zur Detektion von Callose unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers gegen  $\beta$ -1,3-Glucan erfolgte nur im ersten Experiment entsprechend (Eschen-Lippold *et al.*, 2012a).

## 2.26 Verwundung von Pflanzenzellen

Zur Analyse der Genexpression nach Verwundung wurden zwei Blätter der vierten Blatttage von drei Wochen alten *S. tuberosum*-Pflanzen mittels gezahnter Pinzette zwei Mal von jeder Seite quer über die Mittelrippe gequetscht. Nach Ernte der verwundeten Blätter wurden diese unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.27 *P. infestans*-Inokulation

*P. infestans* stand als Dauerkultur, überschichtet mit einer 50 %-igen (v/v) Glycerin-Lösung, zur Verfügung. Mit dieser wurde Hafer-Bohne-Medium angeimpft und 11 bis 14 Tage bei 18 °C in Dunkelheit inkubiert. Davon wurden etwa 0,5 cm x 0,5 cm große mit jungem Mycel bewachsene Stücke auf Hafer-Bohne-Medium in Erlenmeyerkolben transferiert. Nach 11 Tagen Wachstum bei 18 °C in Dunkelheit wurde das Mycel mit jeweils 5 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub> abgeschwemmt und bei 4 °C für 3,5 h im Kühlraum inkubiert. Anschließend wurde die vereinigten Sporensuspensionen aus den Kolben mittels einer doppelt gelegten feinmaschigen Gaze (PE-Gewebe, 20 µm) auf Eis filtriert. Das Einstellen der Sporenkonzentration erfolgt mittels Fuchs-Rosenthal-Zählkammer oder einem Luna-Zellzählgerät (logos biosystems, Annandale, VA, USA) auf 1 x 10<sup>5</sup> Sporen/ml unter Verwendung von sterilem H<sub>2</sub>O<sub>tridest</sub>. Die Inokulation von drei Blättern der dritten vierten Blatttage je Pflanze (3 bis 4 Wochen alt) erfolgte auf der Blattunterseite mit 10 µl-Tropfen (8 bis 12 Stück) der zuvor vorbereiteten Sporensuspension. Anschließend wurden die Blätter mit transparenten Kordelzugbeuteln (160 x 240 mm, 50 µm Materialstärke; Roth) überzogen, um die notwendige hohe Luftfeuchte für die Sporenkeimung zu gewährleisten. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte mit einem Korkbohrer. Die Proben wurden unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

## 2.28 Elizitierung von Pflanzenzellen mit Pep-13

Für die Elizitierung von Kartoffelzellen wurden Blätter der dritten und vierten Blatttage von drei bis vier Wochen alten *S. tuberosum*-Pflanzen gewählt und mittels stumpfer Spritze mit Pep-13 oder W2A infiltriert.

Kartoffelzellkulturen wurden mit 10 µM Diphenyliodoniumchlorid (DPI, Sigma-Aldrich) vorbehandelt. Fünf Minuten darauf erfolgte die Elizitierung mit 10 nM Pep-13 bzw. W2A. Dabei wurde das Schwenken der Kartoffelzellkulturen nur wenige Sekunden unterbrochen. Vier Stunden nach Elizitierung erfolgte die Ernte unter Verwendung eines Büchnertrichters, der auf eine Vakuum-Pumpen-gekoppelte Saugflasche aufgesetzt wurde. In den Büchnertrichter wurde steriles Filterpapier gelegt und auf dieses vorsichtig die Zellkultursuspension bei anliegendem Vakuum gekippt. Anschließend wurde die Zellmasse in Alufolie gewickelt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Für die RNA-Isolation mittels Trizol-Methode wurde die Zellmasse mittels Mörser und Stößel unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zermahlen.

## 2.29 ROS-Analyse

Für die ROS-Analyse wurden in Anlehnung an Trujillo (2016) Blattscheiben von 3 bis 4 Wochen alten *S. tuberosum*-Pflanzen mittels eines Einweg-Biopsiestanzers links und rechts der Mittelrippe ausgestochen und vorsichtig jeweils in die mit 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{tridest}}$  befüllte Vertiefungen einer 96-Loch-Platte überführt. Abweichend zum Protokoll von Trujillo (2016) enthielt jede Vertiefung 200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  mit 5  $\mu\text{M}$  Luminol L-012 (Wako Chemicals), 2  $\mu\text{g}$  Meerrettich-Peroxidase (Fluka) und 10 nM Pep-13- oder W2A-Peptid oder 50 nM flg22-Peptid. Die Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism Version 6.07 für Windows (GraphPad Software, San Diego, California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com))



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung Pep-13-aktivierter Vesikeltransport-assoziiierter Gene

In vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, dass eine funktionierende Fusion von Vesikeln eine wichtige Rolle für die Abwehr von *S. tuberosum* gegen *P. infestans* einnimmt. So resultiert eine verminderte Expression des Pep-13-induzierten Syntaxins *StSYR1* in der reduzierten Bildung von Callose-enhaltenden Papillen an den *P. infestans*-Penetrationsstellen (Eschen-Lippold *et al.*, 2012a).

Vesikeltransport und -fusionsprozesse erfordern neben Syntaxinen der SNARE-Komplexe noch eine Reihe weiterer zellulärer Komponenten. Zu solchen Regulatoren gehören auch kleine GTPasen, Vesikel-Tethering-Faktoren wie der Exocyst-Komplex, sowie Komponenten des PI-Metabolismus (Krishnamoorthy *et al.*, 2014, Gu *et al.*, 2017, Noack and Jaillais, 2017). Zu Beginn dieser Arbeit standen Transkriptom-Micro-Array-Daten zur Identifizierung Pep-13-regulierter Kartoffel-Gene zur Verfügung (Altmann, 2009). Anhand dieser Daten wurde das Gen PGSC0003DMG400016891 zur genaueren Charakterisierung ausgewählt und dessen cDNA aus Kartoffelblättern (Abb. 6.1 Anhang) von Ron Stauder im Rahmen seiner Diplomarbeit kloniert und mehrfach sequenziert. Der kodierende Bereich der cDNA hat eine Länge von 1017 bp und codiert für ein Protein von 338 Aminosäuren (ca. 38,5 kDa). *In silico*-Analysen dieser cDNA-Sequenz zeigten eine hohe Ähnlichkeit zu Inositolpolyphosphat-5-Phosphatasen auf, weswegen im weiteren Verlauf der Arbeit das Gen als *StIPP* (*Solanum tuberosum* Inositolpolyphosphat-Phosphatase) bezeichnet werden wird.

Neuere RNAseq-Daten (persönliche Mitteilung von U. Smolka, IPB Halle (Saale)) bestätigten die Microarray-Ergebnisse hinsichtlich der Pep-13-abhängigen Aktivierung des Gens PGSC0003DMG400016891. Dabei handelt es sich um das einzige identifizierte aktivierte Gen, für welches eine putative 5-Phosphatase (5PTase) annotiert wurde (Tabelle 3.1). Eine weitere putative 5PTase ist 12 h nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zu W2A reprimiert. Den anderen regulierten putativen Inositol-Phosphatase-Genen fehlen Sequenzbereiche für die 5PTase-typischen katalytischen Motive (Majerus *et al.*, 1999). Weitere regulierte Gene für andere Komponenten des PI-Metabolismus ließen sich ebenfalls finden. Darunter befanden sich auch einige, die in die Synthese und den Abbau von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, einem putativen *StIPP*-Substrat, involviert sein könnten. Dazu gehörten putative PI4P 5-Kinasen und Phospholipasen C (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1: Für die Synthese und Degradation von Phosphoinositiden annotierte Gene in *S. tuberosum* L. cv. Désirée WT.**

Die Gen-ID entspricht der Annotationen des PGSC. Angegeben ist der binäre Logarithmus des Verhältnisses der Transkriptgehalte des jeweiligen Gens ( $\log_2(\text{FC})$ ) nach Pep-13-Infiltration versus W2A-Behandlung (Pep13 vs. W2A) 4 bzw. 12 Stunden nach Infiltration (hpi, *hours post infiltration*). Negative Werte repräsentieren eine Herunterregulation nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zur W2A-Behandlung. FC – *fold change*, *p*-Wert – *Wahrscheinlichkeit, mit der der zugehörige  $\log_2(\text{FC})$ -Wert zufällig gemessen wurde*. Die Durchführung der Experimente erfolgte durch U. Smolka, IPB Halle (Saale) (3 Exp.  $N \geq 2$ ). Die bioinformatische Auswertung der Rohdaten durch Dr. Benedikt Athmer, IPB Halle (Saale).

Gen-ID	putative Annotierung	P13 vs. W2A 4 hpi		P13 vs. W2A 12 hpi	
		$\log_2(\text{FC})$	bereinigter p-Wert	$\log_2(\text{FC})$	bereinigter p-Wert
PGSC0003DMG401014852	Phosphatidylinositol-Synthase	0,35	0,71	<b>1,20</b>	$1,4 \cdot 10^{-3}$
PGSC0003DMG401025397	Phosphatidylinositol-Transferprotein	1,04	0,25	<b>1,82</b>	$4,3 \cdot 10^{-4}$
<b>Kinasen</b>					
PGSC0003DMG400000114	Phosphatidylinositol-3,4-Kinase-Familie	0,59	0,48	<b>1,21</b>	$4,2 \cdot 10^{-3}$
PGSC0003DMG400014228	Inositolpolyphosphat-Multikinase	1,03	0,26	<b>2,81</b>	$3,2 \cdot 10^{-8}$
PGSC0003DMG400017560	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase	0,98	0,32	<b>1,36</b>	$1,3 \cdot 10^{-2}$
PGSC0003DMG400026126	Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase	-0,42	0,58	<b>-1,30</b>	$7,3 \cdot 10^{-4}$
PGSC0003DMG400026481	Inositolpolyphosphat-Kinase	-0,01	1,00	<b>2,23</b>	$1,3 \cdot 10^{-7}$
PGSC0003DMG401011539	Inositoltetrakisphosphat-1-Kinase	<b>-1,37</b>	0,01	-0,77	$1,3 \cdot 10^{-1}$
<b>Phosphatasen</b>					
PGSC0003DMG400016891	Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase	0,90	0,60	<b>3,28</b>	$1,9 \cdot 10^{-5}$
PGSC0003DMG400019319	Type I Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase	0,14	0,96	<b>-4,77</b>	$6,2 \cdot 10^{-8}$
PGSC0003DMG400027120	Multiple Inositolpolyphosphat-Phosphatase 1	0,24	0,83	<b>1,05</b>	$7,6 \cdot 10^{-3}$
PGSC0003DMG401023603	Inositol-monophosphatase 1	-0,20	0,90	<b>-1,02</b>	$4,9 \cdot 10^{-2}$
<b>Pyrophosphatasen</b>					
PGSC0003DMG400023697	Diphosphoinositol-polyphosphat-Phosphohydrolase (NUDIX hydrolase)	0,48	0,75	<b>1,48</b>	$1,0 \cdot 10^{-2}$
<b>Phospholipasen C</b>					
PGSC0003DMG400006622	Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C	0,81	0,24	<b>1,75</b>	
PGSC0003DMG400023210	Phospholipase C	1,71	>0,05	<b>1,21</b>	$1,3 \cdot 10^{-5}$
PGSC0003DMG400023211	Phospholipase C	-0,71	0,51	<b>-3,01</b>	$1,5 \cdot 10^{-2}$
<b>DAG-Kinasen</b>					
PGSC0003DMG401018380	Diacylglycerol-Kinase Variante A	<b>1,35</b>	0,03	<b>1,58</b>	$6,3 \cdot 10^{-7}$
PGSC0003DMG402018380	Diacylglycerol-Kinase	0,86	0,29	<b>1,50</b>	$2,2 \cdot 10^{-4}$

Die deduzierte Sequenz der klonierten *StIPP*-cDNA weicht im N-terminalen Bereich von der PGSC0003DMG400016891-zugehörigen Aminosäuresequenz PGSC0003DMP400029519 ab (Abb. 3.1). Die verwendeten Sequenzen beruhen auf den Annotationen des Genoms eines doppelt monoploiden Klons der *S. tuberosum*-Gruppe Phureja durch das „*Potato Genome Sequencing Consortiums*“ (PGSC) aus dem Jahr 2011 (Potato Genome Sequencing *et al.*, 2011). Die dem Sotub04g033080.1.1-Gen zugehörige Proteinsequenz aus jüngeren Annotationen des Genoms von *S. tuberosum* Phureja durch das „*International Tomato Annotation Group*“ (ITAG)-Konsortium (Hirsch *et al.*, 2014) zeigt hingegen eine fast vollständige Übereinstimmung mit der *StIPP*-Aminosäuresequenz. Beide Sequenzen unterscheiden sich im Vorhandensein eines zusätzlichen Serins innerhalb der *StIPP*-Sequenz. Auf Transkriptebene stimmen die Nukleotidsequenz von *StIPP* und *Sotub04g033080.1.1* mit neun Nukleotidaustauschen zu 99 % überein (Abb. 6.2 Anhang).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90
StIPP      MEGLCVKLF EASRKYMKRHKAE AIGMVDSFEASHEG IKTVDIQRC EFSGTS S HLCIYFVTW NMGQVPC EDIAKLVG EDRKYDLLVMG
Sotub04g033080.1.1 MEGLCVKLF EASRKYMKRHKAE AIGMVDSFEASHEG IKTVDIQRC EFSGTS S HLCIYFVTW NMGQVPC EDIAKLVG EDRKYDLLVMG
PGSC0003DMP4000295 -----MKRHKAE AIGMVDSFEASHEG IKTVDIQRC EFSGTS S HLCIYFVTW NMGQVPC EDIAKLVG EDRKYDLLVMG

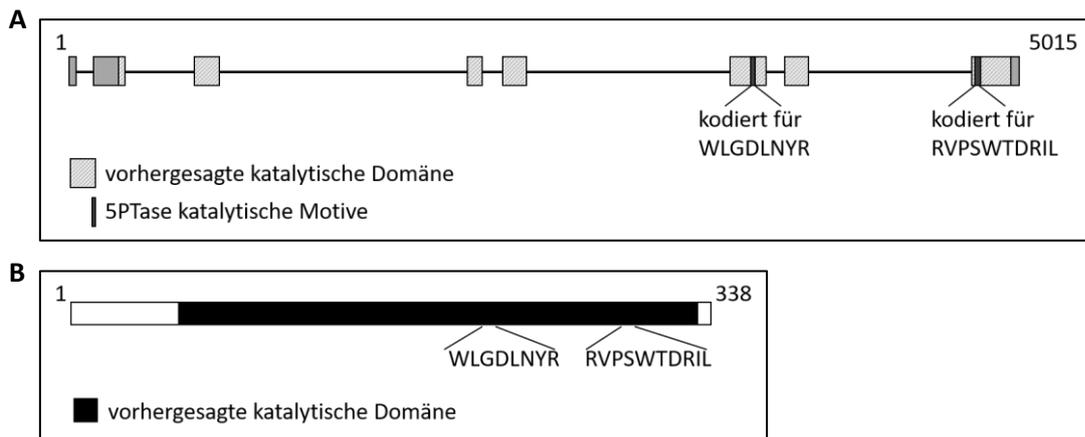
      100     110     120     130     140     150     160     170     180
StIPP      LQEA PRNNICKLLKNTLADTHMLLGKSVMSVQLYVFGPKNSEQFTREV KVDKHEVGG LGWLIRRRKGAVAIKISYKGIQMVFI SCHLSA
Sotub04g033080.1.1 LQEA PRNNICKLLKNTLADTHMLLGKSVMSVQLYVFGPKNSEQFTREV KVDKHEVGG LGWLIRRRKGAVAIKISYKGIQMVFI SCHLSA
PGSC0003DMP4000295 LQEA PRNNICKLLKNTLADTHMLLGKSVMSVQLYVFGPKNSEQFTREV KVDKHEVGG LGWLIRRRKGAVAIKISYKGIQMVFI SCHLSA

      190     200     210     220     230     240     250     260     270
StIPP      HARNVEERNLQFKHISNSLFSKRNRPYAKSAQLTVWLGDLNYRLQGINSYPARDLIHG N LHQMLTSKDQLLQEAERGEIFNGYCEGALDF
Sotub04g033080.1.1 HARNVEERNLQFKHISNSLFSKRNRPYAKSAQLTVWLGDLNYRLQGINSYPARDLIHG N LHQMLTSKDQLLQEAERGEIFNGYCEGALDF
PGSC0003DMP4000295 HARNVEERNLQFKHISNSLFSKRNRPYAKSAQLTVWLGDLNYRLQGINSYPARDLIHG N LHQMLTSKDQLLQEAERGEIFNGYCEGALDF

      280     290     300     310     320     330
StIPP      KPTYKYDIGSSSYDTS HRVRFPSWTRILFKIDSNNINATLHSYEAIESIQSSD HKFVK AHLCLKLNK
Sotub04g033080.1.1 KPTYKYDIGSSSYDTS HRVRFPSWTRILFKIDSNNINATLHSYEAIESIQSSD HKFVK AHLCLKLNK
PGSC0003DMP4000295 KPTYKYDIGSSSYDTS HRVRFPSWTRILFKIDSNNINATLHSYEAIESIQSSD HKFVK AHLCLKLNK
    
```

**Abbildung 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der StIPP gegen die Sequenz aus *S. tuberosum* Phureja**  
 Für die Analyse wurde die translatierte Sequenz der *StIPP*-cDNA mit der Proteinsequenz PGSC0003DMP400029519 entsprechend der Annotation des PGSC-Genmodells bzw. mit der Proteinsequenz des Sotub04g033080.1.1-Gens entsprechend der Annotation des ITAG-Genmodells verwendet. Der multiple Sequenzvergleich erfolgte mittels Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) innerhalb der Bioedit-Software (Bootstrap 1000, *gap penalty*: Voreinstellung). Sequenzunterschiede wurden schwarz unterlegt.

Anhand von Sequenzvergleichen der klonierten *StIPP*-cDNA aus *S. tuberosum* Sorte Désirée mit der Genomsequenz von *S. tuberosum* Phureja ergibt sich eine putative Genstruktur mit 8 Exons und 7 Introns. Die vorhergesagte katalytische Inositolpolyphosphat-5-Phosphatase (IPP)-Domäne erstreckt sich dabei von Exon 2 bis 8 mit den katalytischen Motiven WLGDLYNR und RVPWTRIL (Majerus *et al.*, 1999) auf Exon 6 und 8 (Abb. 3.2 A). Einige weitere 5-Phosphatasen aus Arabidopsis, wie die SAC-Phosphatasen und 5PTase12-15, besitzen zusätzliche Domänen; diese fehlen hier. Mit 338 Aminosäuren zählt das *StIPP*-Protein zu den kleinsten bekannten 5-Phosphatasen (Abb. 3.2 B), (Berdy *et al.*, 2001). Die vorhergesagte katalytische Domäne erstreckt sich dabei fast über die gesamte Aminosäuresequenz der *StIPP*.



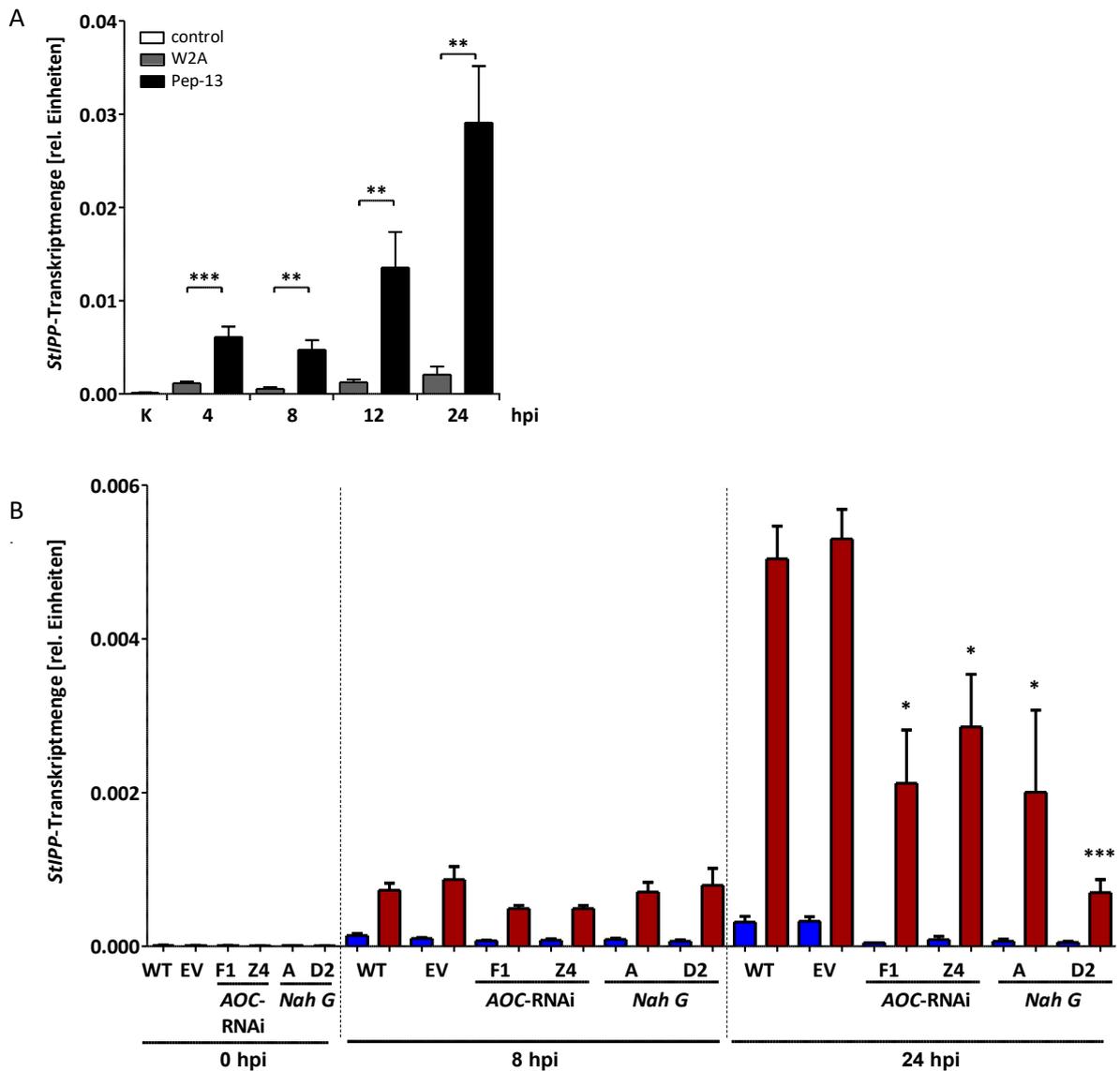
**Abbildung 3.2: Putative Gen- und Proteinorganisation der StIPP**  
 A) Dargestellt ist die Verteilung der Exons (dargestellt durch Kästchen) innerhalb der genomischen Sequenz aus *S. tuberosum* Phureja ausgehend vom Startcodon (Nukleotid 1) bis zum Stopcodon (Nukleotid 5015) sowie die kodierende Region für die katalytischen Motive. Die zugehörige Aminosäuresequenz ist unter der jeweiligen Region angegeben. B) Aus der Aminosäuresequenz abgeleitete schematische Proteinstruktur der *StIPP* mit vorhergesagter katalytischer Domäne sowie Lage der katalytischen Motive.

## 3.2 Dynamische Transkriptgehalte des *StIPP*-Gens

### 3.2.1 Transkriptgehalte nach Pep13-Infiltration

Zur Verifizierung der Microarray-Daten wurden mittels qRT-PCR die Transkriptgehalte von *StIPP* nach Infiltration mit 100  $\mu$ M Pep-13 in Kartoffelblättern überprüft. Als Negativkontrolle diente das nahezu inaktive Pep-13-Derivat W2A, in dessen Peptidsequenz die zweite Aminosäure Tryptophan gegen ein Alanin ausgetauscht ist (VANQPVRGFKVYE; Brunner *et al.*, 2002). In unbehandelten Pflanzen (K) konnte nur eine geringe *StIPP*-Expression detektiert werden (Abb. 3.3. A). Hingegen war 4 Stunden nach Infiltration (hpi) eine signifikante Induktion der *StIPP*-Expression im Vergleich zur Kontrolle K feststellbar. Diese unterschied sich in den Pep-13-behandelten Proben signifikant von der der W2A-behandelten Proben. Während der Transkriptgehalt in den W2A-behandelten Proben im Verlauf der Kinetik relativ konstant blieb, stieg er in den Pep-13-behandelten Proben noch weiter an, bis das Experiment 24 h nach Infiltration beendet wurde.

In weiterführende Analysen wurde die Abhängigkeit der *StIPP*-Expression von Jasmonsäure und Salizylsäure nach Pep-13-Behandlung untersucht. Dazu wurden *S. tuberosum*-Pflanzen mit verringerter Expression des Gens für die Allenoxydyclase (*AOC*-RNAi), einem Enzym, das einen Zwischenschritt der Jasmonsäurebiosynthese katalysiert, verwendet. Diese Pflanzen sind nicht in der Lage Jasmonsäure zu akkumulieren (Halim *et al.*, 2009). In gleicher Weise erfolgte die Inokulation und Analyse von *S. tuberosum*-Pflanzen, die das bakterielle *NahG*-Gen, welches für eine Salizylhydroxylase kodiert, exprimieren und dadurch nicht mehr in der Lage sind Salizylsäure zu akkumulieren (Halim *et al.*, 2004, Halim, 2006). Zusätzlich zeichnen sich diese Pflanzen durch Ausbleiben der Akkumulation von Jasmonsäure nach Pep-13-Behandlung aus (Halim *et al.*, 2004). In allen untersuchten Pflanzenlinien ist die *StIPP*-Expression in unbehandelten Linien (Abb. 3.3 B; 0 hpi) kaum detektierbar. Jedoch zeigt sich 8 hpi nach Pep-13-Behandlung ein signifikanter Anstieg der Expression im Vergleich zu unbehandelten und W2A-behandelten Pflanzen. Die Expressionslevel der Wildtyp (WT) und Leervektor (EV)-Linien unterscheiden sich nicht von denen der *AOC*-RNAi und *NahG*-Pflanzen und ist zu diesem Zeitpunkt somit weder von Jasmonsäure, noch von Salizylsäure abhängig. Jedoch zeigt sich 24 hpi eine hormonabhängige Verringerung des *StIPP*-Transkriptgehaltes nach Pep-13-Infiltration im Vergleich zum WT und zur EV- Kontrolllinie.

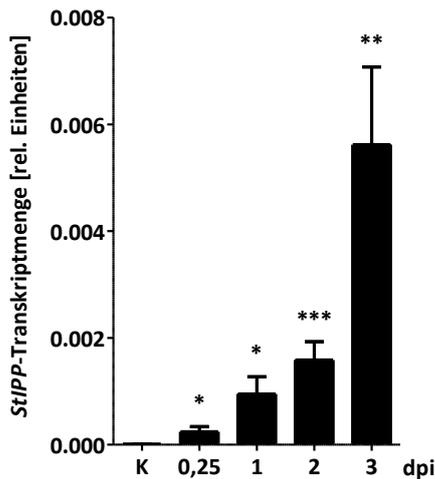


**Abbildung 3.3: Kinetik der relativen Transkriptgehalte des *StIPP*-Gens nach Pep-13- und W2A-Infiltration von *S. tuberosum*-Pflanzen**

A) qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus Blattmaterial von Wildtyp-Kartoffelpflanzen isoliert wurde. Die Pflanzen waren entweder unbehandelt (K) oder mit 100  $\mu$ M W2A (graue Balken) bzw. Pep-13 (schwarze Balken) infiltriert. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1 $\alpha$* . hpi – Stunden nach Infiltration (*hours post infiltration*). 3 Exp.  $n \geq 6$ , dargestellt sind MW und SEM, die statistische Analyse der Pep-13-induzierten Expression gegenüber W2A-Behandlung erfolgte mittels Student's T-Test, \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . B) qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus Blattmaterial von Kontroll- (WT, EV) und transgenen Kartoffelpflanzen mit reduzierter Expression eines Jasmonsäurebiosynthesegens (AOC-RNAi Linien F1 und Z4) oder heterologer Expression einer bakteriellen Salizylhydroylases (*NahG* Linien A und D2) isoliert wurde. Die Kartoffelpflanzen waren entweder unbehandelt (0 hpi) oder mit 100  $\mu$ M W2A (blaue Balken) bzw. Pep-13 (rote Balken) infiltriert. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1 $\alpha$* . hpi – Stunden nach Infiltration (*hours post infiltration*). 2 Exp.  $n = 4$ , dargestellt sind MW und SEM, die statistische Analyse Pep-13-behandelter AOC-RNAi-Linien sowie *NahG*-Expressionslinien mit den WT- und EV-Kontrolllinien erfolgte mittels Student's T-Test, \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  für Linien die gegen beide Kontrolllinien einen signifikanten Unterschied aufwiesen.

### 3.2.2 Transkriptgehalte nach Infektion mit *P. infestans*

In weiterführenden Analysen wurden die *StIPP*-Transkriptgehalte nach Infektion mit *P. infestans* untersucht. Bereits sechs Stunden nach Infektion war ein signifikanter Anstieg des Transkriptgehaltes im infizierten Gewebe detektierbar. Dieser stieg im Verlauf des Experiments weiter an bis das Experiment nach drei Tagen beendet wurde (Abb. 3.4).

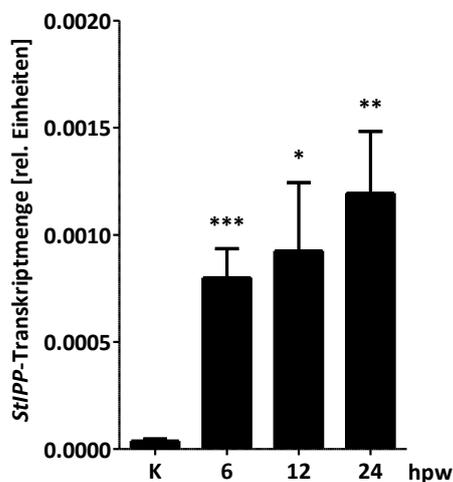


**Abbildung 3.4: Kinetik der relativen Expression des *StIPP*-Gens in *S. tuberosum* nach Infektion mit *P. infestans***

Die qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus Blattmaterial von *P. infestans*-infizierten oder unbehandelten Wildtyp-Kartoffelpflanzen isoliert (K) wurde. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1α*. dpi – Tage nach Infiltration (*days post infiltration*). 3 Exp.  $n \geq 7$ , dargestellt sind MW und SEM, die statistische Analyse erfolgte mittels Student's T-Test,  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Verglichen wurden die Gen-Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Inokulation mit der Expression in der nicht infizierten Kontrolle.

### 3.2.3 Transkriptgehalte nach Verwundung

Für PIs konnte bereits eine Beteiligung an der Vermittlung der Wundantwort in *A. thaliana* gezeigt werden (Mosblech *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde in weiteren Experimenten die Induktion der *StIPP*-Genexpression nach Verwundung untersucht. Hierfür wurden WT-Pflanzen mittels einer gezahnten Pinzette verwundet und zu verschiedenen Zeitpunkten der *StIPP*-Transkriptgehalt bestimmt. Dieser war bereits sechs Stunden nach Verwundung im Vergleich zur unverletzten Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 3.5).



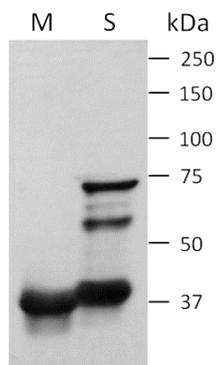
**Abbildung 3.5: Kinetik der relativen Expression des *StIPP*-Gens in *S. tuberosum* nach Verwundung**

Die qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die zu den angegebenen Zeitpunkten aus Blattmaterial von verwundeten oder unbehandelten Wildtyp-Kartoffelpflanzen (K) isoliert wurde. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1α*. hpw – Stunden nach Infiltration (*hours post wounding*). 3 Exp.  $n \geq 7$ , dargestellt sind MW und SEM, die statistische Analyse erfolgte mittels Student's T-Test,  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Verglichen wurden die Gen-Expression zu den jeweiligen Zeitpunkten nach Verwundung mit der Expression in der unbehandelten Kontrolle.

### 3.3 Enzymatische Aktivität des *StIPP*-Genproduktes

Die Aminosäuresequenz der StIPP weist eine hohe Übereinstimmung mit bekannten Inositol-5-phosphatasen auf. Erste Untersuchungen im Rahmen der Diplomarbeit von Ron Stauder weisen auf eine Aktivität der StIPP gegenüber  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  hin. Bereits charakterisierte 5-Phosphatasen aus anderen eukaryotischen Organismen, wie Hefe und *A. thaliana* zeigen variable Substratspezifität (Gerth *et al.*, 2017).

Um die Substratspezifität der StIPP genauer zu untersuchen, wurde das *StIPP*-Genprodukt als N-terminales *His*-MBP-Fusionskonstrukt (*MBP-StIPP*) in *Escherichia coli*-Rosetta gami-Zellen exprimiert (Abb. 3.6). Da Bakterien keinen PI-stoffwechsel aufweisen, wurde das gereinigte Lysat für Aktivitätstests verwendet. Dieses enthielt das His-markierte MBP-StIPP-Protein, welches im Gel ein etwas schnelleres elektrophoretisches Migrationsverhalten als seiner theoretischen Größe entsprechend aufwies (Abb. 3.6, Spur „S“). Weiterhin konnten kürzere Proteine mittels des  $\alpha$ -His-Antikörpers detektiert werden, wobei es sich um verkürzte  $\text{His}_{(10)}$ -MBP enthaltende Varianten handeln könnte. Belfield *et al.* (2007) stellten fest, dass die bei der Gateway-Klonierung entstehenden Verbindungsstellen B1 (*attB1*, *attachment Site B1*) aufgrund der Wiederholung der Nukleinsäure Adenin zu einem transkriptionellen Verrutschen und damit zu einer -1-Leserahmenverschiebung kommen kann. Bei dem verwendeten Gateway-Vektor pDest-N112 würde die hinter der MBP-codierenden Sequenz liegende *attB1* bei einer Verschiebung des Leserahmens zu einem vorzeitigem Stop-Codon und damit zu einem etwa 45,3 kDa großem Protein führen. Als Negativ-Kontrolle diente Lysat aus *E. coli*-Rosetta gami -Zellen, die nur das Gen für das etwa 44 kDa große Maltosebindeprotein (MBP, Abb. 3.6, Spur „M“) exprimierten.



**Abbildung 3.6: Expression des rekombinanten StIPP-Proteins in *E. coli***

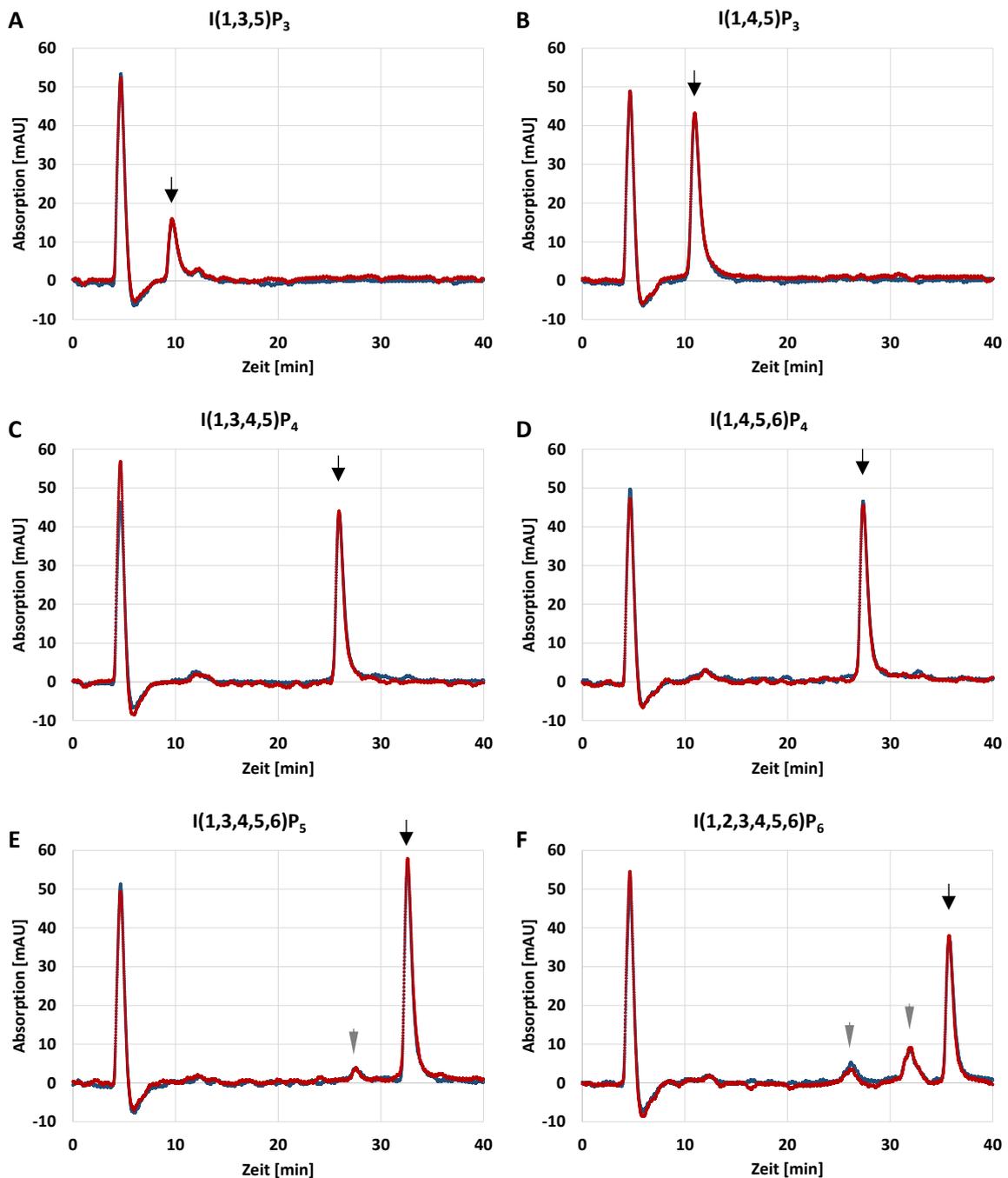
Das Maltosebindeprotein (MBP; M, theoretisches MW: ~44,5 kDa) und das rekombinante MBP-StIPP-Protein (S, theoretisches MW: ~83 kDa) wurden in *E. coli*-Rosetta gami-Zellen exprimiert. Das gereinigte Lysat wurde mittels SDS-PAGE gelelektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die immunologische Detektion des in beiden Proteinen enthaltenen 10xHis-Epitops erfolgte mittels primären  $\alpha$ -His-Antikörper und sekundären HRP-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Antikörper. Die gereinigten Lysate wurden für die Bestimmung der Enzymaktivität verwendet. kDa – Kilodalton

Für die Analyse der katalytischen Aktivität, wurden die gewonnenen rekombinanten Proteinextrakte *in vitro* mit einer Reihe möglicher alternativer Substrate inkubiert. Hierzu gehörten verschiedene PIs sowie lösliche Inositolphosphate.

### 3.4 Identifizierung putativer löslicher Substrate

Putative lösliche Substrate wurden anhand des Vorhandenseins eines Phosphates an Position 5 des Inositolrings ausgewählt. So wurde die Aktivität gegenüber verschiedenen löslichen Inositolphosphaten [Ins(1,3,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub>, Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>, Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub>, Ins(1,2,3,4,5,6)P<sub>6</sub>] überprüft. Nach erfolgter Inkubation wurden mögliche Reaktionsprodukte mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) detektiert (Abb. 3.7). In den resultierenden Chromatogrammen ist für alle Proben bei etwa 4,5 min Retentionszeit ein Injektionssignal sichtbar. Die löslichen InsP<sub>3</sub> sind im gewählten Lauf nach etwa 10 bzw. 11 min detektierbar (Abb. 3.7 A und B). Dabei läuft Ins(1,3,5)P<sub>3</sub> etwas schneller mit dem Laufmittel mit als Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>. Die löslichen InsP<sub>4</sub> sind nach etwa 26 bzw. 27,5 min detektierbar (Abb. 3.7 C und D); hier zeigt Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> ein schnelleres Laufverhalten als Ins(1,4,5,6)P<sub>4</sub>. Ins(1,3,4,5,6)P<sub>5</sub> ist nach etwa 32,5 min und IP<sub>6</sub> nach 36 min detektierbar (Abb. 3.7 E und F). Bei InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>6</sub> scheint eine unspezifische Hydrolyse stattgefunden zu haben. So zeigte sich im Chromatogramm für InsP<sub>5</sub> zusätzlich ein schwaches Detektorsignal bei etwa 27,6 min. Dabei handelt es sich vermutlich um ein InsP<sub>4</sub>.

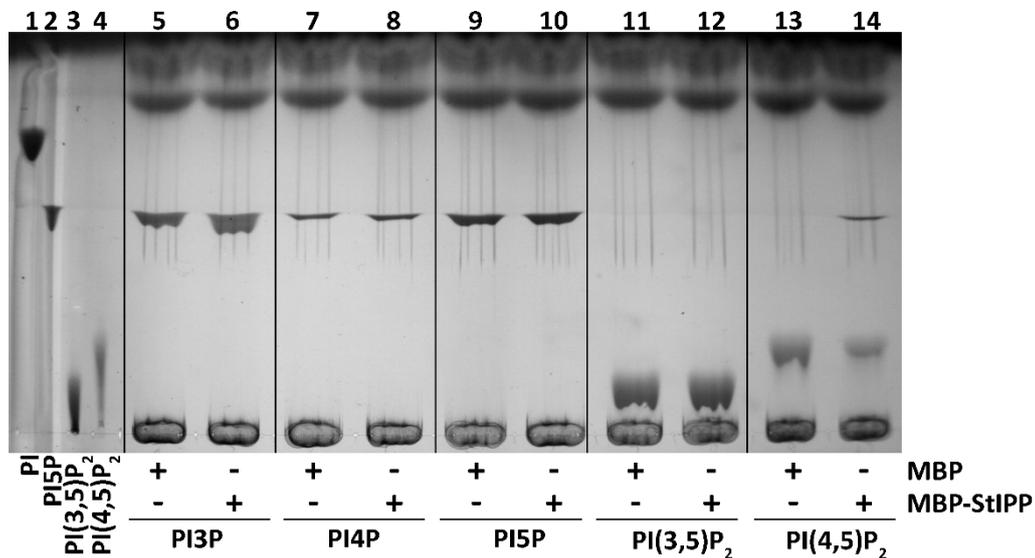
In den Proben mit InsP<sub>6</sub> sind zwei weitere Peaks bei einer Retentionszeit von etwa 32 min und 26 min detektierbar. Bei diesen handelt es sich vermutlich um InsP<sub>5</sub> und InsP<sub>4</sub>. An welcher Position der Kopfgruppe die unspezifische Hydrolyse stattgefunden hat, war anhand dieser Daten nicht sichtbar. Insgesamt wiesen die Chromatogramme aller untersuchten Proben keine Unterschiede zwischen den mit MBP und MPB-StIPP inkubierten Proben auf (Abb. 3.7 A-F). Somit diente keines der getesteten löslichen Inositolphosphate unter den gewählten Bedingungen als Substrat für die StIPP.



**Abbildung 3.7: StIPP zeigt *in vitro* keine Aktivität gegenüber den verwendeten löslichen Inositolphosphaten**  
 HPLC-Chromatogramme der Reaktionsprodukte nach Inkubation von A)  $Ins(1,3,5)P_3$ , B)  $Ins(1,4,5)P_3$ , C)  $Ins(1,3,4,5)P_4$ , D)  $Ins(1,4,5,6)P_4$ , E)  $Ins(1,3,4,5,6)P_5$ , F)  $Ins(1,2,3,4,5,6)P_6$  mit Lysat aus MBP-StIPP- (rot) oder MBP- (blau) exprimierenden *E. coli*-Bakterien für 2 h bei RT. Schwarzen Pfeile markieren das dem jeweiligen Substrat zugehörige Signal. Graue, schmale Pfeile markieren zusätzliche Signale, die zu Produkten unspezifische Hydrolysen gehören. Als Positivkontrolle der enzymatischen Aktivität des StIPP-Proteins diente die gleichzeitige Inkubation mit  $PtdIns(4,5)P_2$  (nicht gezeigt). Die gezeigten Diagramme sind repräsentativ für 2 unabhängige Experimente.

### 3.5 Identifizierung putativer PI-Substrate

Um eine mögliche Aktivität des rekombinanten StIPP-Proteins gegenüber PIs zu testen, wurden verschiedene PI-Lipide *in vitro* als Substrat angeboten. Nach Inkubation der putativen PI-Substrate mit MBP oder MBP-StIPP wurden die Lipide aus dem Reaktionsansatz extrahiert und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Nach zweistündiger Inkubation bei RT, enthielten die Spuren der Inkubationsprodukte mit den PI-Monophosphaten PtdIns3P, PtdIns4P und PtdIns5P (Abb. 3.8, Spur 5 – 10) jeweils eine Bande auf Höhe des aufgetragenen PI-Monophosphat (PtdIns5P)-Standards (Abb. 3.8, Spur 2). Die Spuren der Reaktionsansätze mit PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> (Abb. 3.8, Spur 11 – 12) wiesen jeweils eine Bande auf Laufhöhe des PtdIns(3,5)P<sub>2</sub>-Standards auf (Abb. 3.8, Spur 3). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass sowohl für die PI-Monophosphate als auch für die PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> *in vitro* keine Phosphat-Hydrolyse durch rekombinantes StIPP-Protein erfolgte.



**Abbildung 3.8: Phosphataseaktivität der StIPP gegenüber Phosphoinositiden**

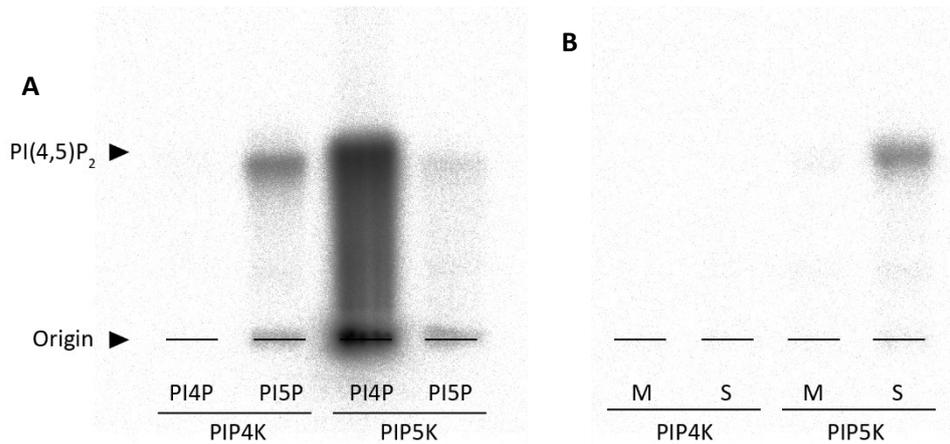
Verschiedene PtdIns wurden mit gereinigtem Lysat aus *E. coli*-Zellen, die das Gen für das Maltosebindeprotein (MBP) oder das rekombinante MBP-StIPP-Protein exprimierten, 2 h bei RT inkubiert. Die anschließend extrahierten Lipide wurden mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Spur 1 - 4 enthielten die für die Aktivitätsmessung eingesetzten Substrate (Standards). Die abgebildete DC-Platte repräsentiert das Ergebnis zweier unabhängiger Experimente. Die Reaktionen von MBP und MBP-StIPP mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wurden in mehr als 4 weiteren Experimenten bestätigt.

Nur nach Reaktion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> mit dem rekombinanten StIPP-Protein, jedoch nicht nach Reaktion mit MBP allein (Abb. 3.8, Spur 13), trat zusätzlich zu der Bande auf Laufhöhe des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Standards eine weitere Bande auf. Diese co-migrierte auf gleicher Höhe wie der PI-Monophosphat-Standard (Abb. 3.8, Spur 14), was darauf schließen lässt, dass StIPP hier als Phosphatase aktiv war und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu einem Monophosphat dephosphorylierte. Demzufolge war von allen getesteten PIs das Isomer PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> das einzige Substrat der StIPP. Da PI-Monophosphate im verwendeten Laufmittel nicht voneinander unterscheidbar sind, war anhand des Migrationsverhaltens des PI-monophosphatproduktes nicht bestimmbar, ob es sich bei dem entstandenen Produkt um PtdIns4P oder PtdIns5P handelte.

### 3.6 Identifizierung des Reaktionsproduktes

Anhand der Substratbestimmung mittels DC geht nicht hervor, welches der möglichen Phosphate hydrolysiert wurde. Möglich wäre eine Dephosphorylierung an Position 4 oder 5 der Inositolphosphatkopfgruppe, was entsprechend zur Bildung von PtdIns4P oder PtdIns5P geführt hätte. Um die Identität des Reaktionsproduktes und somit die mögliche Positionsspezifität des StIPP-Enzyms zu bestimmen, wurde wie zuvor beschrieben PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> entweder mit MBP oder mit MBP-StIPP inkubiert und somit eine Dephosphorylierung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch MBP-StIPP vorgenommen. Anschließend wurden die Lipidprodukte isoliert und mit  $\gamma$ [<sup>33</sup>P]-ATP und spezifischen rekombinanten humanen PIP-Kinasen inkubiert. Dazu wurden die Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-Kinase 2 alpha (PIP 4-Kinase) verwendet, welche PtdIns5P an Position 4 phosphoryliert (Boronenkov and Anderson, 1995), und die Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-Kinase 1 alpha (PIP 5-Kinase), welche PtdIns4P an Position 5 phosphoryliert. Nach zweistündiger Inkubation wurden die Lipidprodukte dieser Rephosphorylierungsreaktionen erneut extrahiert und mittels DC getrennt (Abb. 3.9).

Die Substratspezifität der für die Rephosphorylierung verwendeten menschlichen Lipid-Kinasen gegen PtdIns4P oder PtdIns5P wurde als Kontrolle mitgetestet (Abb. 3.9 A). Nach Inkubation der PIP 4-Kinase mit PtdIns5P war eine deutliche radioaktiv markierte Bande sichtbar, jedoch nicht nach Inkubation mit PtdIns4P. Im Fall der PIP 5-Kinase war nach Inkubation mit PtdIns5P nur eine sehr schwache Bande sichtbar. Jedoch zeigte die PIP-5-Kinase deutlich stärkere Aktivität gegenüber PtdIns4P. Diese Ergebnisse zeigten die Spezifität der einzelnen Kinasen für ihr jeweiliges Substrat. Nach Inkubation des StIPP-Produktes mit der PIP 5-Kinase war eine deutliche Bande auf Höhe des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu sehen, jedoch nicht nach Inkubation mit der PIP 4-Kinase (Abbildung 3.9 B, Spuren „S“). Darüber hinaus waren in einem weiteren Kontrolllexperiment keine Banden nach den Inkubationen der PIP-Kinasen mit den MBP-Inkubationsprodukten sichtbar (Abb. 3.9 B, Spuren „M“). Die Daten lassen den Schluss zu, dass das rekombinante StIPP-Enzym mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu einem Produkt umsetzte, das nur durch eine PIP 5-Kinase rephosphoryliert werden konnte und es sich demnach beim Stipp-Reaktionsprodukt um PtdIns4P handelte. Zusammen mit der zuvor getesteten Substratpräferenz (Abb. 3.8) folgt daraus, dass es sich bei StIPP um eine PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-Phosphatase handelt.



**Abbildung 3.9: Autoradiogramm der mit mittels DC aufgetrennten Lipide**

(A) PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wurde jeweils mit MBP (M) oder der rekombinanten MBP-StIPP (S) 2 h bei RT inkubiert. Die extrahierten Lipidfraktionen wurden anschließend halbiert und jeweils mit einer PtdIns5P -4-Kinase (PIP4K) oder PtdIns4P -5-Kinase (PIP5K) unter Anwesenheit von  $\gamma$ -[<sup>33</sup>P]-ATP 2 h bei RT inkubiert. (B) Analog zu A wurden als Kontrollreaktion jeweils PtdIns4P (PI4P) und PtdIns5P (PI5P) mit PIP4K oder PIP5K inkubiert. Die extrahierten Lipide wurden mittels DC aufgetrennt. Die abgebildete DC-Platte repräsentiert das Ergebnis zwei unabhängiger Experimente mit insgesamt 4 Replikaten. PI(4,5)P<sub>2</sub> – PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>

Diese Ergebnisse werden zusätzlich durch von Dr. Irene Stenzel durchgeführten Experimenten mit transient transformierten *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen gestützt (Abb. 6.3 A Anhang). Pollenschläuche benötigen für die Keimung und das polare Spitzenwachstum PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. So wurde in veröffentlichten Studien bereits gezeigt, dass eine Störung der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Produktion, also eine verringerte PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Verfügbarkeit, in reduzierten Keimungsraten resultiert (Kost *et al.*, 1999, Ischebeck *et al.*, 2008, Sousa *et al.*, 2008, Ischebeck *et al.*, 2011, Stenzel *et al.*, 2011, Hempel *et al.*, 2017).

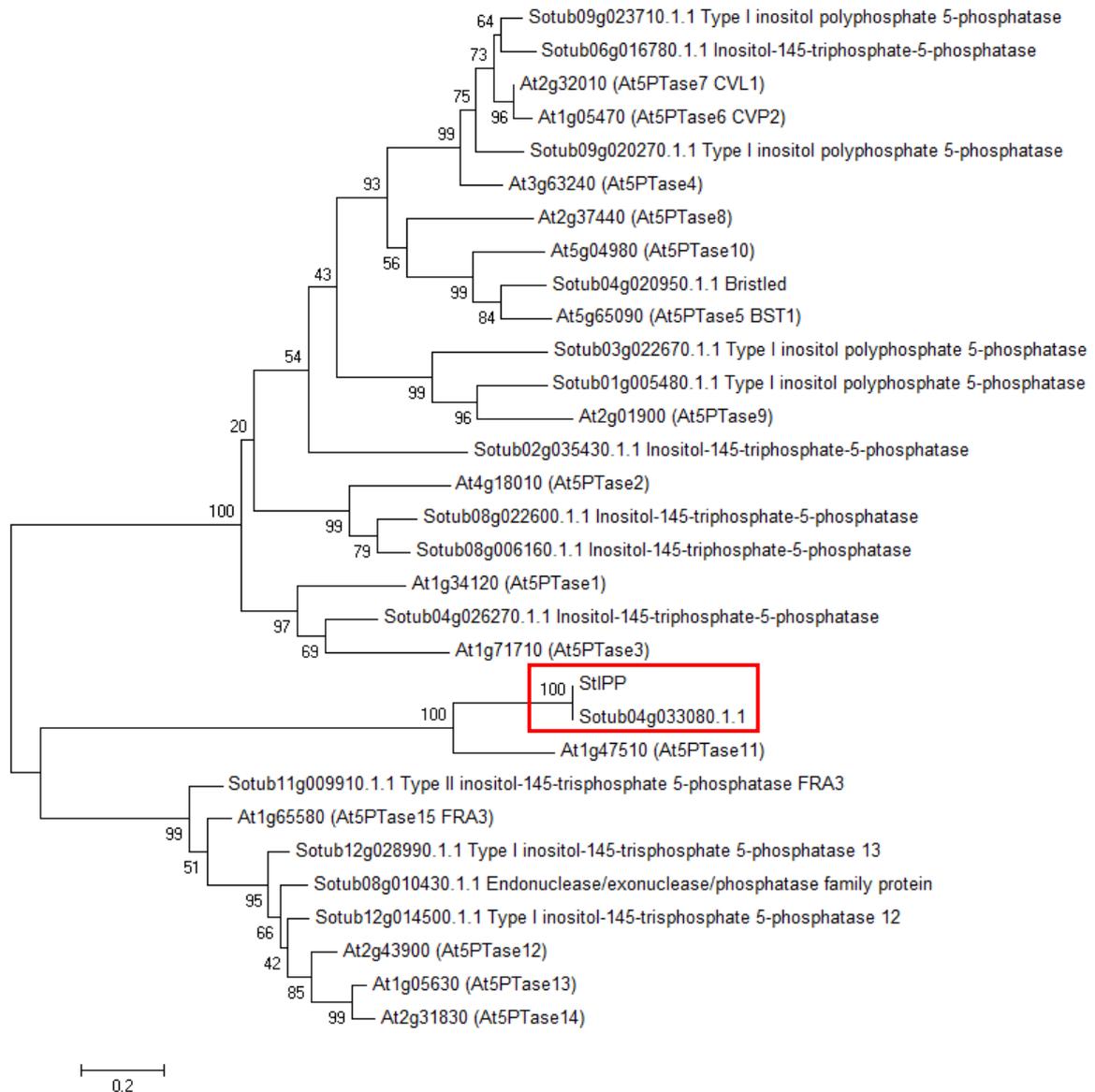
Bei den von Dr. Stenzel durchgeführten Tests führte die Transformation mit dem Leervektor in weniger als 5 % zu einem vorzeitigen Wachstumsstopp. Im Vergleich dazu wiesen 46 % der StIPP-exprimierenden Pollenschläuche einen vorzeitigen Wachstumsstopp auf (Abb. 6.3 A, Anhang). Dies deutet darauf hin, dass das fluoreszenzmarkierte StIPP-Protein gegenüber PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auch *in vivo* enzymatisch aktiv ist.

### 3.7 Phylogenetische Analyse

Innerhalb der RNAseq-Daten konnten nur zwei differentiell regulierte putative Inositol-5-Phosphatasen identifiziert werden.

Um weitere putative Inositol-5-Phosphatasen zu finden, wurde in der „spud“-Datenbank (Hirsch *et al.*, 2014) nach homologen Proteinen gesucht, welche ebenfalls die beschriebenen katalytischen Motive besaßen. Zusätzlich wurden für die phylogenetische Analyse alle bekannten 5-Phosphatasen (Berdy *et al.*, 2001) aus *A. thaliana* verwendet. Innerhalb des Genoms von *S. tuberosum* Phureja finden sich 15 putative 5-Phosphatasen, die beide, für die Phosphataseaktivität wichtige, Motive enthalten (Abb. 3.2 und Abb. 6.4 Anhang). Für die phylogenetische Analyse wurden für Kartoffelproteine die Genbezeichnungen entsprechend der Annotation des ITAG-Konsortiums verwendet. Dabei fällt auf, dass die StIPP-Proteinsequenz sich

nur mit dem Sotub04g033080.1-Protein aus *S. tuberosum* Phureja im gleichen Cluster befand (Abb. 3.10). Danach ist das nächstverwandte Protein die 5-Phosphatase11 aus *A. thaliana* (*At5PTase11*, *At1g47510*). Alle weiteren putativen 5PTasen gruppieren in separaten Ästen.



**Abbildung 3.10: Molekular-phylogenetische Analyse der StIPP-Sequenz**

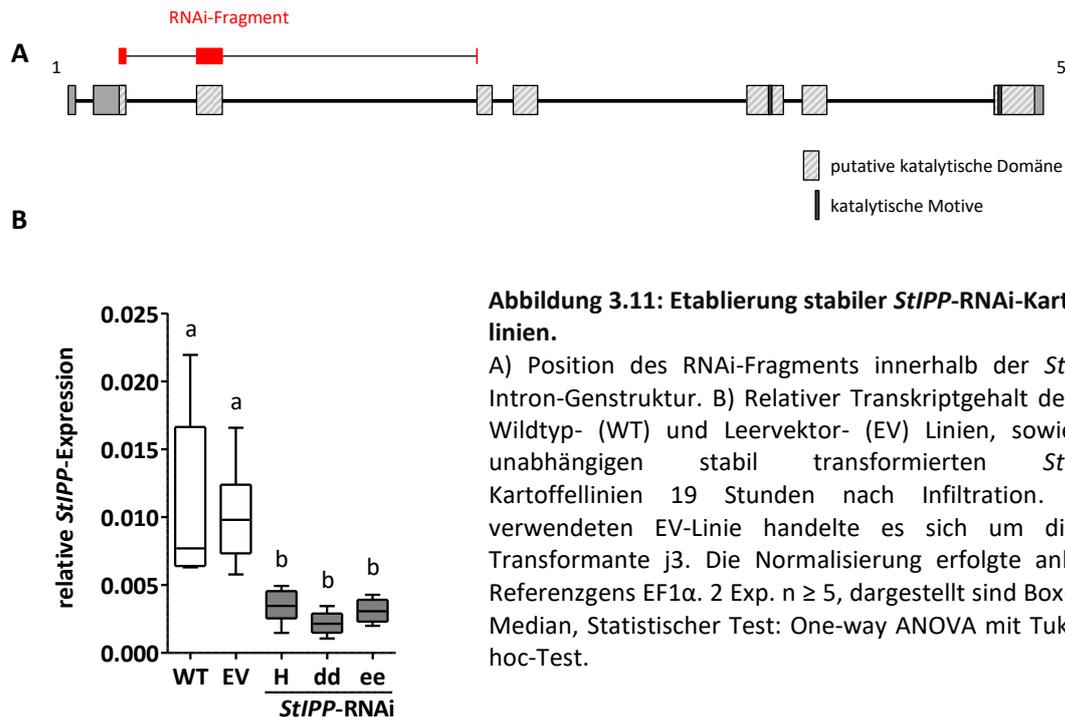
Für die Analyse wurden die Aminosäuresequenzen der StIPP, putativer Inositol-5-Phosphatasen aus *S. tuberosum* Phureja sowie bekannter 5-PTasen aus *Arabidopsis* verwendet. Die Bezeichnungen der Gene aus *S. tuberosum* entsprechen denen des Genmodells des ITAG-Konsortiums. Die evolutionäre Analyse wurde mit der Software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) durchgeführt. Der evolutionäre Verlauf wurde abgeleitet mittels der Maximum Likelihood Methode basierend auf dem JTT matrix-based Modell (Jones *et al.*, 1992). Der Baum mit der höchsten log Wahrscheinlichkeit (-6775.6911) ist gezeigt. Der Prozentsatz der Bäume in welche die assoziierten Taxa gemeinsam gruppieren wird neben den Verzweigungen angezeigt. Der Baum ist maßstabsgerecht, wobei die Astlängen an der Anzahl der lokalen Austausch berechnet wurden. Die Analyse enthielt 31 Aminosäuresequenzen. Alle Stellen mit Lücken oder fehlenden Daten wurden eliminiert. Der finale Datensatz enthielt 200 Positionen. Das rote Kästchen markiert die Position der StIPP.

### 3.8 Analyse transgener *S. tuberosum*-Pflanzen mit modifizierter *StIPP*-Expression

Wie die phylogenetische Analyse zeigt, weist die *StIPP* geringe Ähnlichkeit zu weiteren putativen 5-Phosphatasen aus *S. tuberosum* auf. Dies könnte ein Hinweis auf eine nicht redundante Funktion innerhalb der Kartoffel sein. Um die biologische Funktion der 5-Phosphatase innerhalb der pflanzlichen Abwehrantwort näher zu untersuchen, wurden Kartoffelpflanzen mit verringerter und erhöhter *StIPP*-Expression generiert.

#### 3.8.1 Generierung von *S. tuberosum*-Pflanzen mit verringerter oder erhöhter *StIPP*-Expression

Für die gezielte Expressionsreduktion der *StIPP*-Transkription wurde ein RNA-Interferenz-Ansatz gewählt. Dabei wurde ein RNAi-Fragment innerhalb der für die katalytische Domäne kodierenden Region, jedoch außerhalb der für die 5-PTase-Funktion wichtigen katalytischen Motive gewählt (Abb. 3.11 A). Dadurch sollte vermieden werden, dass homologe Gene mit den gleichen katalytischen Domänen ebenfalls betroffen sind. Das *StIPP*-RNAi-Fragment wurde mittels des Vektors *pHellsgate12* (*pHG12*) über *Agrobacterium tumefaciens* AGL0-vermittelte Blattscheiben-Transformation in die Kartoffelsorte Désirée gebracht. Von 73 regenerierten Pflanzen, wurden 66 durch Southern Blot Analyse auf erfolgreiche Insertion getestet. Demnach konnte in 33 dieser Linien ein *StIPP*-RNAi-Fragment-spezifisches Signal detektiert werden (Abb. 6.5 Anhang). Da die Southern-Analyse keine eindeutigen Aussagen über Insertionen zuließ, wurden ausgewählte Linien hinsichtlich der *StIPP*-Expression nach Pep-13-Behandlung untersucht. Mindestens fünf dieser Linien zeigten eine signifikant reduzierte Aktivierung der Genexpression im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (WT und EV) (Abb. 6.6 Anhang). Drei Linien wurden zur näheren Charakterisierung ausgewählt. 19 h nach Infiltration mit Pep-13 wiesen die *StIPP*-RNAi-Linien H, dd und ee maximal nur ein Drittel des durchschnittlichen relativen Transkriptgehaltes der Kontrolllinien auf (Abb. 3.11 B). Die *StIPP*-RNAi-Linie dd wies sogar eine Reduktion um ca. 80 % der Transkriptmenge der Kontrollpflanzen auf.

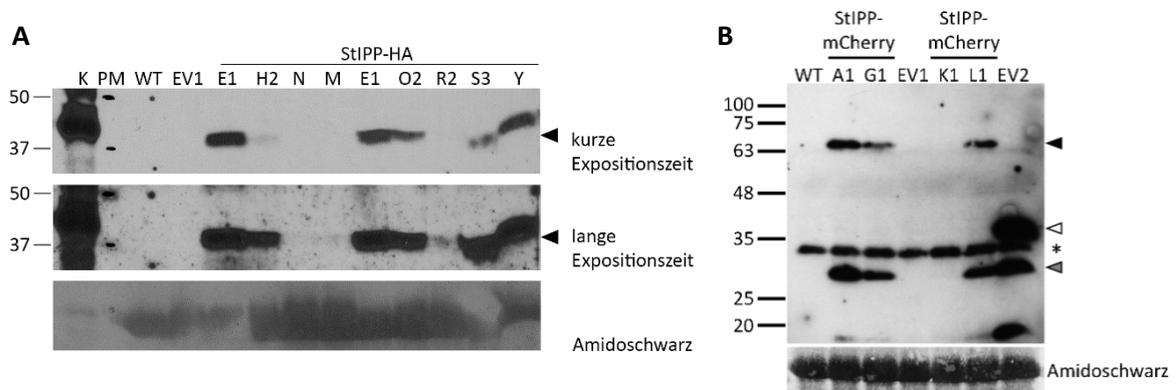


**Abbildung 3.11: Etablierung stabiler *StIPP*-RNAi-Kartoffellinien.**

A) Position des RNAi-Fragments innerhalb der *StIPP*-Exon-Intron-Genstruktur. B) Relativer Transkriptgehalt der *StIPP* in Wildtyp- (WT) und Leervektor- (EV) Linien, sowie in drei unabhängigen stabil transformierten *StIPP*-RNAi-Kartoffellinien 19 Stunden nach Infiltration. Bei der verwendeten EV-Linie handelte es sich um die pHG8-Transformante j3. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens EF1 $\alpha$ . 2 Exp.  $n \geq 5$ , dargestellt sind Box-plots mit Median, Statistischer Test: One-way ANOVA mit Tukeys-Post-hoc-Test.

Zur Erzeugung von *StIPP*-Überexpressionslinien wurden zwei verschiedene rekombinante Konstrukte verwendet. Zum einen wurde die kodierende Sequenz für StIPP mit C-terminaler HA-Markierung (StIPP-HA) über den binären Vektor *pGWB14*, zum anderen für StIPP mit C-terminaler mCherry-Fluoreszenzproteinfusion (StIPP-mCherry) über den Vektor *pAGM32381*, jeweils unter Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (CaMV, *cauliflower mosaic virus*) in Kartoffelpflanzen exprimiert (Abb. 3.12). Beide binäre Vektoren wurden jeweils mittels Agrobakterien in Blattscheiben transformiert und daraus die entsprechenden Überexpressionslinien regeneriert. Für das StIPP-HA-Konstrukt konnten 37 Linien regeneriert und mittels Southern Blot analysiert werden. Dabei wiesen 17 Linien eine Insertion in korrekter Laufhöhe auf (Abb. 6.7 Anhang). Im Northern Blot zeigten 16 dieser Linien eine verstärkte Expression im Vergleich zum WT und EV (Abb. 6.8 Anhang). Von den mit dem StIPP-mCherry-Konstrukt transformierten Blattscheiben konnten 12 Linien regeneriert werden. Diese wurden mittels Southern Blot untersucht, wovon 4 Linien ein StIPP-spezifisches Signal zeigten (Abb. 6.9 Anhang). Anschließend wurden einige der *StIPP*-überexprimierenden Kartoffellinien mittels Western Blot hinsichtlich der Expression auf Proteinebene untersucht. Für das StIPP-HA-Konstrukt konnte in vier von acht unabhängigen Linien das exprimierte Protein mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3.12 A); für das StIPP-mCherry-Protein hingegen nur in drei der vier getesteten unabhängigen Kartoffellinien (Abb. 3.12 B). Auffällig war, dass sowohl StIPP-HA und StIPP-mCherry im Western Blot nur mit Hilfe eines empfindlichen chemilumineszenzverstärkten Substrates („enhanced chemiluminescence substrate“ - ECL) für niedrige Detektionsgrenzen, teilweise erst nach langen Expositionszeiten, detektiert werden konnten. Demzufolge handelte es sich um geringe Menge des exprimierten Proteins. Bis auf die Überexpressionslinie *StIPP*-HA E1

zeigten die generierten Pflanzen mit veränderter *StIPP*-Expression keine makroskopischen Unterschiede im Vergleich zum WT oder der EV-Kontrolllinien (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.12: StIPP-überexprimierende *S. tuberosum*-Pflanzen**

Mittels Agrobacterium-vermittelter Transformation wurden stabile *S. tuberosum*-Transformanten generiert, die verschiedene rekombinante *StIPP*-Fusionskonstrukte unter Kontrolle des CaMV-35S-Promotors exprimieren. Das Gesamtprotein wurde mittels hochmolarem Urea-Puffer aus Blattscheiben der generierten Linien isoliert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf Nitrocellulose geblottet. A) Die immunologische Detektion des rekombinanten *StIPP*-Proteins mit C-terminaler HA-Fusion erfolgte mittels primären  $\alpha$ -HA-Antikörper und sekundären HRP-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Antikörper. K – Positivkontrolle, PM – Proteinmarker, WT – Wildtyp, EV1 – Leervektor (pGPTV B2), E1 – Y – unabhängige *StIPP*-HA überexprimierende Linien. Die Pfeilspitze zeigt auf *StIPP*-HA (theroretisches Molekulargewicht (MW): ~45 kDa). B) Die immunologische Detektion des rekombinanten *StIPP*-Protein mit C-terminaler mCherry-Fusion erfolgte mittels primären  $\alpha$ -RFP-Antikörper und sekundären HRP-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Antikörper. WT – Wildtyp, EV1 – Leervektor (pGPTV B2), EV2 – Leervektor (pAGM32224 L), A1 – L1 – unabhängige *StIPP*-mCherry-überexprimierende Linien. Die schwarze Pfeilspitze zeigt auf *StIPP*-mCherry (theoretisches MW: ~66 kDa). Die weiße und die graue Pfeilspitze zeigen auf His-mCherry (MW: ~30 kDa) bzw. eine weitere mCherry-spezifische Bande (bei ~28 kDa). Das Sternchen kennzeichnet eine unspezifische Bande. Nach erfolgter Detektion wurden die Membranen Amidoschwarz gefärbt um auf gleichmäßige Beladung zu kontrollieren.

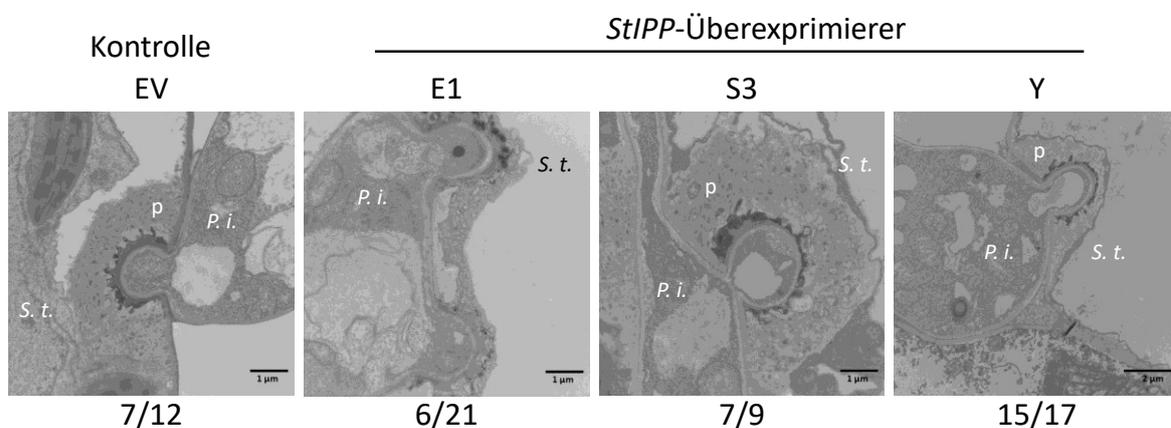
### 3.8.2 Einfluss der *StIPP*-Überexpression auf Bildung callosehaltiger Papillen um *P. infestans*-Haustorien

Wie durch Eschen-Lippold et al. (2012a) gezeigt wurde, spielen Vesikelfusionsprozesse eine wichtige Rolle innerhalb der Abwehr der Kartoffel gegen *P. infestans*. Da PIs an der Regulation von Vesikeltransport und Exozytose beteiligt sind (Krishnamoorthy et al., 2014), wurde hypothesiert, dass eine Modulation des PI-Systems bei veränderter *StIPP*-Expression einen ähnlichen Effekt auf Abwehrprozesse haben könnte.

Um zu überprüfen ob eine *StIPP*-Überexpression und somit verminderte  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ -Verfügbarkeit Einfluss auf die Bildung callosehaltiger Papillen hat, wurden stabile *StIPP*-HA-Überexpressionslinien mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension inokuliert und die Infektionsstellen 3 dpi untersucht. Eine elektronenmikroskopische Analyse dieser Infektionsstellen durch Dr. Gerd Hause zeigte in 3 von 4 EV- Zellen eine callosehaltige Papille. In den *StIPP*-HA-Überexpressionslinien war es schwer, penetrierende Hyphen im Gewebe zu detektieren (persönliche Mitteilung Dr. Gerd Hause). Für die Überexpressionslinie E1 konnten zwar 13 Kontaktstellen von *P. infestans* mit Kartoffelzellen beobachtet werden, jedoch wiesen davon nur 4

penetrierende Hyphen auf. Eine dieser 4 war von einer callosehaltigen Papille umschlossen. In der *StIPP-HA*-Überexpressionslinie Y zeigten von 7 Kontaktstellen 6 penetrierende Hyphen, wobei 3 davon callosehaltige Papillen aufwiesen.

Für eine genauere Betrachtung wurde das Experiment mit einer zusätzlichen Überexpressionslinie wiederholt. Dabei zeigte sich, dass um 58 % der in der EV-Linie betrachteten Penetrationshyphen callosehaltige Papillen gebildet wurden (Abb. 3.13). Die *StIPP-HA*-Überexpressionslinie E1 wies nur in 28 % callosehaltige Papillen auf. Hingegen zeigten die Überexpressionslinien S3 und Y jeweils in 78 % und 88 % Papillenbildung um die penetrierenden Hyphen. Eine Anilinblaufärbung übriger Infektionsstellen zeigte eine eindeutige Callosefärbung in allen betrachteten Linien nach *P. infestans*-Infektion (Daten nicht gezeigt). Die vorliegenden Daten weisen auf keinen eindeutigen Effekt der *StIPP-HA*-Überexpression auf die Ausbildung callosehaltiger Papillen in *P. infestans*-infizierten *S. tuberosum*-Pflanzen hin.

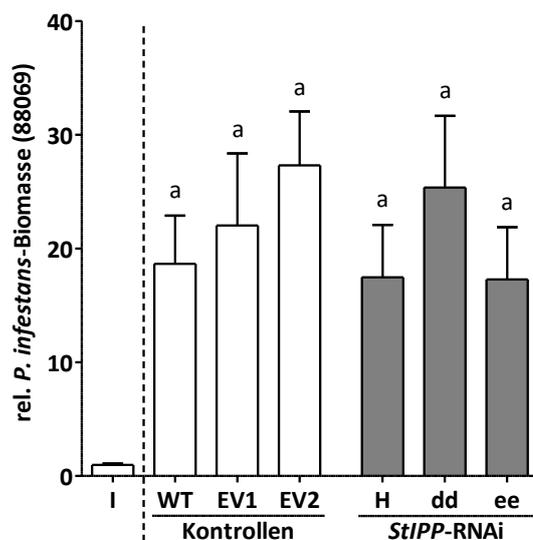


**Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *P. infestans*-Haustorien in infizierten *S. tuberosum*-Zellen**

*StIPP-HA*-Überexpressionslinien E1, S3 und Y, sowie eine EV-Linie (pGPTV B2) wurden mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Isolat CRA 208m2 (Si-Ammour *et al.*, 2003);  $1 \cdot 10^5$  Sporen/ml) inokuliert und Infektionsstellen einen Tag nach Infektion für elektronenmikroskopische Aufnahmen geerntet. Dies erfolgte durch Dr. Gerd Hause. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für die innerhalb der Linie am häufigsten gemachte Beobachtung. Unter den Abbildungen ist die jeweilige Zahl der beobachteten callosehaltigen Papillen in intakten Pflanzenzellen angegeben. *S.t.* – *S. tuberosum*; *P.i.* – *P. infestans*; p – callosehaltige Papille

### 3.8.3 Einfluss der veränderten StIPP-Expression auf die *P. infestans*-Biomasse in *S. tuberosum*-Pflanzen

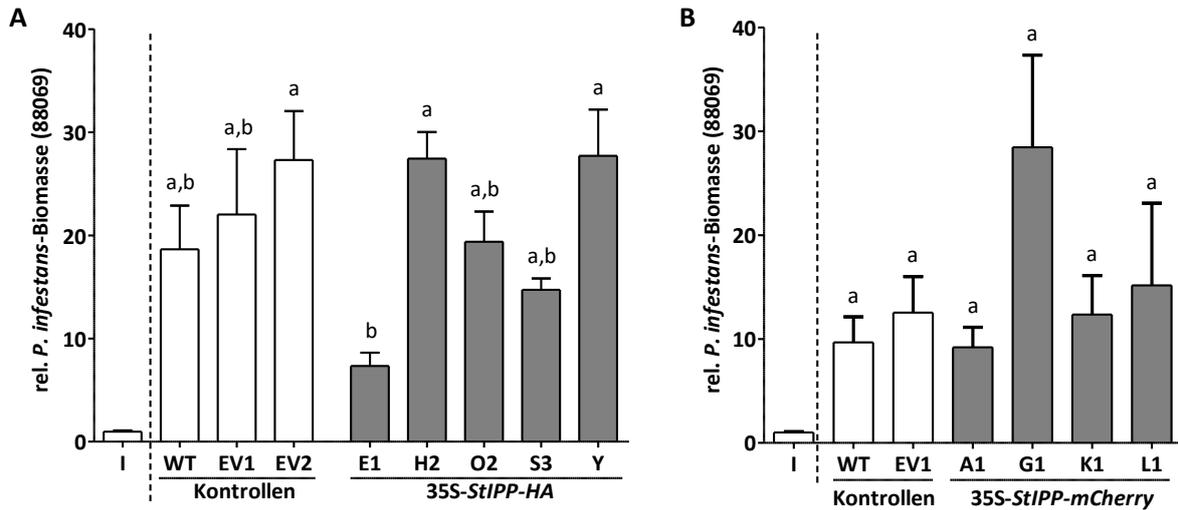
Da die Expression der 5-Phosphatase auch nach *P. infestans*-Infektion aktiviert wurde, wurde überprüft, ob eine Reduktion oder Erhöhung der *StIPP*-Expression das Wachstum von *P. infestans* auf dem Wirt beeinflusst. Dafür wurden drei Wochen alte Kartoffelpflanzen mit *P. infestans*-Zoosporen inokuliert und drei Tage nach Infektion der *P. infestans*-DNA-Gehalt als Maß für die relative Biomasse mittels qPCR bestimmt (Abb. 3.14 und Abb. 3.15). Die Menge an *P. infestans*-DNA in allen infizierten Linien war drei Tage nach Inokulation im Vergleich zum Inokulum (I) erhöht ( $p \leq 0,02$ , Student's T-Test). Das Wachstum des *P. infestans*-Isolats 88069 auf Pflanzen der *StIPP*-RNAi-Linien und der *StIPP*-HA-Überexpressionslinien unterscheidet sich nicht von dem auf den WT- oder Leervektor-Kontrolllinien (Abb. 3.14 und 3.15 A). Lediglich die *StIPP*-HA-Überexpressionslinie E1 wies ein verringertes *P. infestans*-Wachstum auf (Abb. 3.15 A). Um zu überprüfen, ob es sich bei der erhöhten Resistenz dieser Linie E1 um ein Artefakt aufgrund des genomischen Integrationsortes oder einer somaklonalen Variation handelt, wurden weitere *StIPP*-überexprimierende Pflanzen untersucht.



**Abbildung 3.14: Relative *P. infestans*-Biomasse in *S. tuberosum*-Pflanzen mit verringerter *StIPP*-Expression**

Je Kartoffelpflanzen der WT-, EV- und *StIPP*-RNAi-Linien wurden drei Blätter mit 10  $\mu$ l-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension ( $7,5 \cdot 10^4$  Sporen/ml) inokuliert. Die Ernte der Infektionsstellen erfolgte drei Tage nach Inokulation. Nach DNA-Isolation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels qRT-PCR anhand einer *P. infestans*-spezifischen DNA-Sequenz. I – Inokulum, EV1 – *pGPTV*-exprimierende Linie B2, EV2 – *pHG8*-exprimierende Linie j3. Zu beachten ist hier, dass es sich bei Inokulum und den Kontrollen um die Gleichen wie in Abb. 3.14 A handelt, da alle Daten in gemeinsamen Experimenten erhoben wurden. Dargestellt sind MW und SEM, statistischer Test: Kruskal-Wallis-Test mit Dunns-Post-hoc-Test; 2 Exp. n = 7 (außer: I: n = 5, *StIPP*-RNAi ee: n = 6).

Dafür wurden die *StIPP-mCherry*-Überexpressionslinien verwendet (Abb.3.12 B). Die *StIPP-mCherry*-Linie K1, welche kein detektierbares Protein im WB zeigte, wies vergleichbare *P. infestans*-Biomasse (Isolat CRA 208m2) wie die WT- und EV-Kontrolllinie auf (Abb. 3.15 B). Die drei *StIPP-mCherry*-exprimierenden Linien wiesen ebenfalls kein signifikant verändertes Wachstum zu den Kontrollen auf. Demnach korreliert weder die Verringerung noch die Erhöhung der *StIPP*-Expression mit einer veränderten *P. infestans*-Biomasse.



**Abbildung 3.15: Relative *P.-infestans*-Biomasse in *S. tuberosum*-Pflanzen mit erhöhter *StIPP*-Expression**

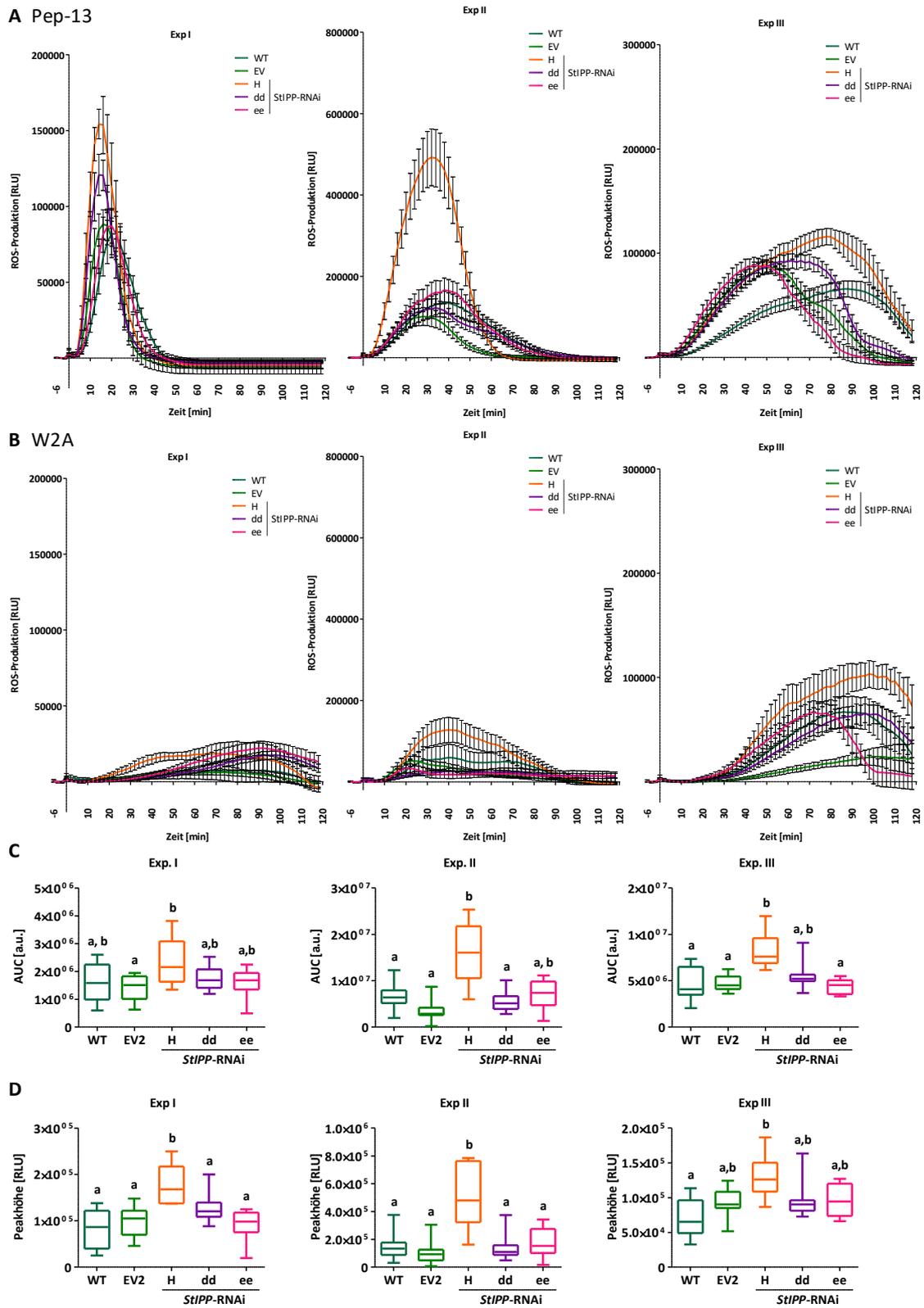
Drei Wochen alte stabile Kartoffeltransformanten, die ein *StIPP*-HA- (A) bzw. ein *StIPP-mCherry*-Fusionskonstrukt (B) unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors exprimierten wurden mit *P. infestans* inokuliert. Die Ernte der Infektionsstellen erfolgte drei Tage nach Inokulation. Nach DNA-Isolation erfolgte die Bestimmung der Biomasse mittels qRT-PCR anhand einer *P. infestans*-spezifischen DNA-Sequenz. Je Kartoffelpflanze wurden drei Blätter mit 10 µl-Tropfen einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (A: Isolat 88069;  $7,5 \cdot 10^4$  Sporen/ml; B: Isolat CRA 208m2 (Si-Ammour *et al.*, 2003);  $1 \cdot 10^5$  Sporen/ml) inokuliert. I – Inokulum, EV1 – pGPTV-exprimierende Linie B2, EV2 – pHG8-exprimierende Linie j3. Dargestellt sind die MW mit SEM, Statistischer Test: Kruskal-Wallis-Test mit Dunns-Post-hoc-Test; (A) 2 Exp. n = 7 (außer: I: n=5, *StIPP*-HA O2 und S3: n = 6); (B) 3 Exp. n ≥ 7.



### 3.8.4 Einfluss der veränderten *StIPP*-Expression auf die PAMP-abhängige Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies

Kartoffelpflanzen reagieren auf Infiltration mit Pep-13 unter anderem mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Halim *et al.*, 2004). Verschiedene Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen Phosphatidylsäure (PA) bzw. Phospholipasen C und der ROS-Bildung als Reaktion auf biotischen Stress (Bigeard *et al.*, 2015, Gonorazky *et al.*, 2016, D'Ambrosio *et al.*, 2017). Da PtdOH ein indirektes Produkt der Hydrolyse der Inositolkopfgruppe von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> durch die Phospholipase C sein kann, wäre es denkbar, dass ein verändertes PtdIns4P - PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gleichgewicht sich letztlich auf die ROS-Bildung auswirken könnte.

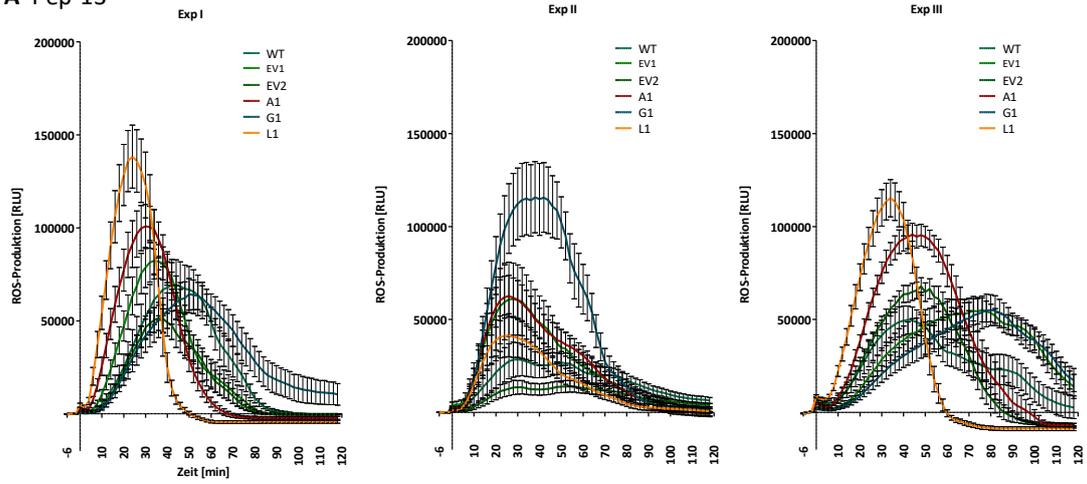
Um zu untersuchen, ob die PAMP-abhängige ROS-Entwicklung in den Pflanzen mit veränderter *StIPP*-Expression beeinflusst ist, wurden Blattscheiben drei Wochen alter Kartoffelpflanzen mit verschiedenen PAMPs behandelt. Aus veröffentlichten Studien ist bekannt, dass eine erhöhte ROS-Entwicklung nach PAMP-Behandlung in den ersten Minuten nach Elizitierung auftritt und bis 30 min nach Elizitierung andauern kann (Chinchilla *et al.*, 2007, Ranf *et al.*, 2011). Als Maß für die Bildung von ROS diente die luminolabhängige Chemielumineszenz, die als Reaktion auf gebildetes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsteht. Dabei wurden die gebildeten Photonen über einen zeitlichen Verlauf von 120 min bestimmt. Sowohl in den WT und EV-Linien, als auch in den *StIPP*-RNAi-Linien tritt eine erhöhte ROS-Produktion im Zeitraum von 10 bis 60 min nach Behandlung mit 10 nM Pep-13 in zwei von drei Experimenten auf (Abb. 3.16 A). Die Behandlung mit 10 nM des fast inaktiven Pep-13-Derivats W2A diente als Kontrolle und sollte eine geringere ROS-Produktion zur Folge haben. Dies ist in zwei von drei Experimenten sichtbar (Abb. 3.16 B). Aufgrund der stark variierenden Kurvenmorphologie der einzelnen Linien wurde für bessere Vergleichbarkeit die jeweilige Fläche unter den normalisierten Kurven (*area under the curve* - AUC) bestimmt. Dieser Wert repräsentiert die Gesamtmenge der gebildeten ROS nach Elizitierung (Abb. 3.16 C). Es fällt auf, dass in allen drei Experimenten die RNAi-Linie H im Vergleich zu den anderen untersuchten RNAi-Linien und den WT- und EV-Kontrolllinien eine erhöhte Gesamt-ROS-Produktion aufwies. Diese unterschied sich in zwei von drei Experimenten signifikant von den Kontrolllinien. Die *StIPP*-RNAi-Linie H unterschied sich ebenfalls durch eine temporär erhöhte maximale ROS-Produktion signifikant von allen anderen Linien in zwei von drei Experimenten (Abb.3.16 D). Jedoch verhielten sich die anderen zwei RNAi-Linien wie der WT und die EV-Linie.



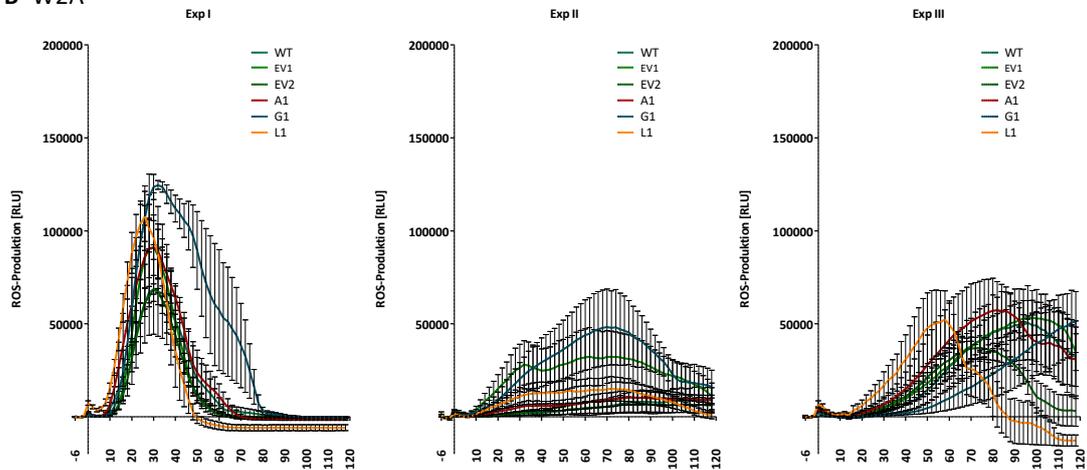
**Abbildung 3.16: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *StIPP*-RNAi-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung.**

Die ROS-Produktion wurde in Blattscheiben 3 Wochen alter *S. tuberosum*-Transformanten (unabhängige *StIPP*-RNAi-Linien H, dd, ee; Leervektorkontrolllinie pHG8 j3 (EV2)) sowie WT-Pflanzen nach Behandlung mit 10 nM Pep-13 (**A**) oder 10 nM W2A (**B**) gemessen. Die Bestimmung der ROS-Produktion nach Pep-13- (A) oder W2A- (B) Behandlung erfolgte im zeitlichen Verlauf von 118 min und ist in relative Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte anhand der gemittelten gebildeten ROS-Produktion vor Behandlung durch Subtraktion von den einzelnen Werten nach Elizitierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 12 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für Pep-13 und 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 4 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für W2A. **C**) Die Gesamt-ROS-Akkumulation in Blattscheiben nach Pep-13-Behandlung wurde durch Integration der Flächen unter den Kurven aus (A) berechnet. AUC - *area under the curve*, peak-Fläche; a. u. - *arbitrary units*, willkürliche Einheiten. **D**) Gezeigt ist die maximale transiente ROS-Produktion nach Pep-13-Behandlung. Die Box-Plots (C und D) zeigen den Median sowie die 25 % und 75 %-Perzentilen (Boxen) als auch die 5 % und 95 %-Perzentilen (Antennen). Die Werte ergeben sich aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 12 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp. Die statistischen Tests auf Signifikanz erfolgten mittels one-way-ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) und Newman-Keuls-Post-Hoc-Test bei normalverteilten Werten (Exp. I) bzw. mittels Kruskal-Wallis-Test ( $P \leq 0,05$ ) mit Dunns-Post-Hoc-Test (Exp. II und III) bei nicht-normalverteilten Werten. Boxen mit den gleichen Buchstaben unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

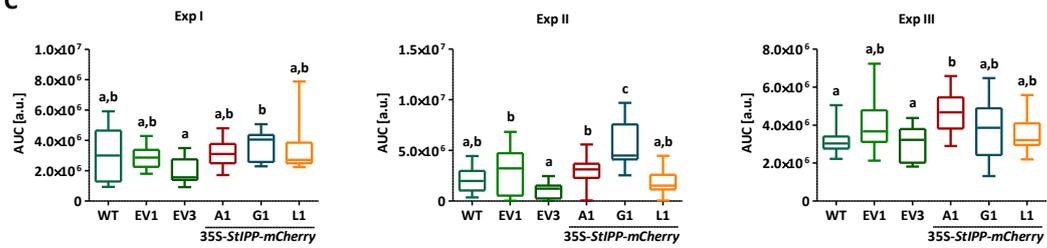
**A Pep-13**



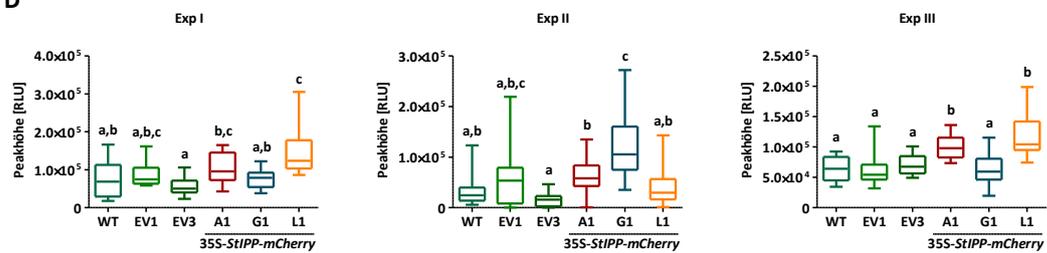
**B W2A**



**C**



**D**

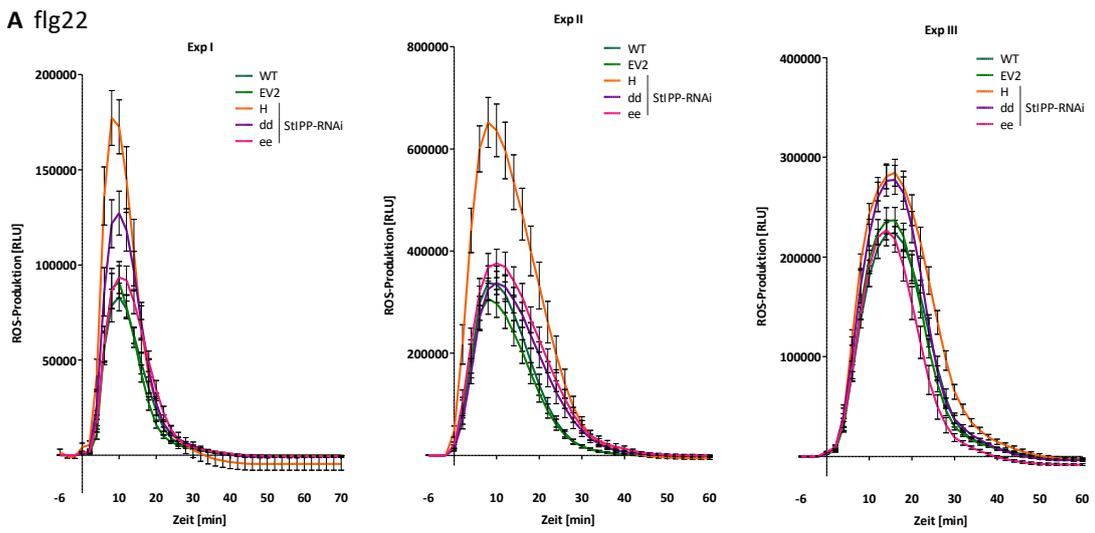


Im WT und in der EV-Line, sowie in den *StIPP-mCherry*-Überexpressionslinien führte die Pep-13-Behandlung zu einer Induktion der ROS-Bildung (Abb. 3.17 A). Dies konnte allerdings auch nach W2A-Behandlung beobachtet werden (Abb. 3.17 B). Besonders im Experiment I führte die W2A-Behandlung zu einer ähnlich starken ROS-Produktion wie nach Pep-13-Behandlung. Vergleicht man die Gesamtmenge der gebildeten ROS, waren keine Unterschiede zwischen den *StIPP*-überexprimierenden Linien und den Kontrolllinien zu beobachten (Abb. 3.17 C). Lediglich die *StIPP-mCherry*-Linie G1 zeigte im zweiten Experiment eine signifikant erhöhte ROS-Produktion. Hinsichtlich der Peakhöhen ließen sich ebenfalls keine durchgehend signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 3.17 D). Nur die *StIPP-mCherry*-Linie L1 wies in zwei von drei Experimenten und die *StIPP-mCherry*-Linie A1 in einem von drei Experimenten leicht erhöhte Peakmaxima auf. In den *StIPP-HA*-überexprimierenden Kartoffeln konnte nach Behandlung mit 5 nM Pep-13 bzw. W2A ebenfalls eine Induktion der ROS-Produktion gemessen werden. Auch hier konnte die *StIPP*-Expression keinen einheitlichen Einfluss auf die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (Abb. 6.10 Anhang). Auch hier hatte die *StIPP*-Expression keinen Einfluss auf die ROS-Bildung nach Pep-13-Behandlung. Die Beobachtung einer geringeren ROS-Produktion in der *StIPP-HA*-Überexpressions-Linie E1 konnte durch weitere unabhängige Linien somit nicht bestätigt werden. Möglicherweise handelt es sich bei der ROS-Produktion in der *StIPP-HA*-Überexpressionslinie E1 das Ergebnis sekundärer Effekte.

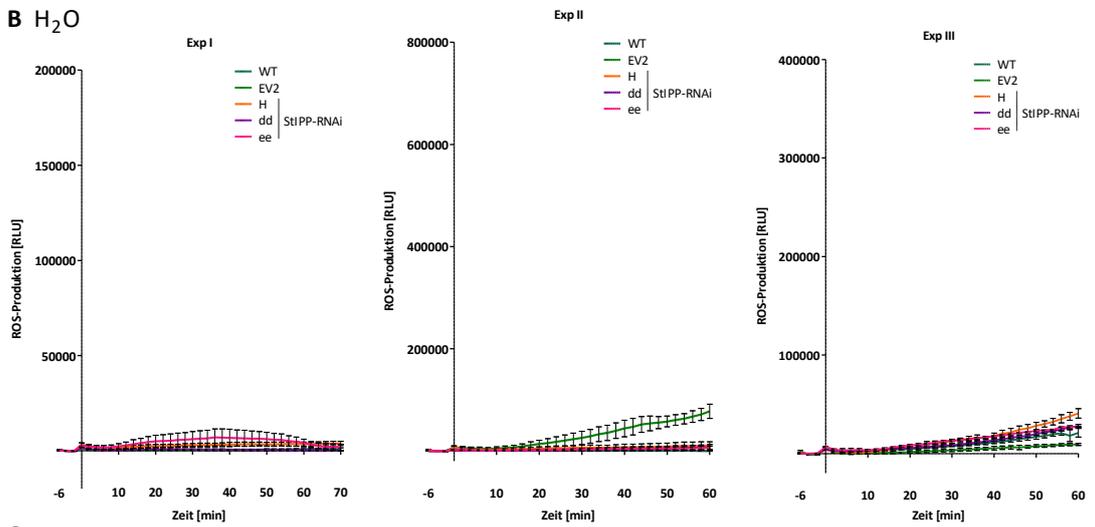
**Abbildung 3.17: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *StIPP-mCherry*-Überexpressions-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung**

Die ROS-Produktion wurde in 3 Wochen alten *S. tuberosum*-Transformanten (unabhängige *StIPP-mCherry*-Linien A1, G1, L1; Leervektorkontrolllinien pGPTV B2 (EV1) und pAGM32224 L (EV3)) sowie WT-Pflanzen nach Behandlung mit 10 nM Pep-13 (A) oder 10 nM W2A (B). Die Bestimmung der ROS-Produktion nach Pep-13- (A) oder W2A- (B) Behandlung erfolgte im zeitlichen Verlauf von 118 min und ist in relative Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte anhand der gemittelten gebildeten ROS-Produktion vor Behandlung durch Subtraktion von den einzelnen Werten nach Elizitierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 12 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für Pep-13 und 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 4 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für W2A. C) Die Gesamt-ROS-Akkumulation in Blattscheiben nach Pep-13-Behandlung wurde durch Integration der Flächen unter den Kurven aus (A) berechnet. AUC - *area under the curve*, peak-Fläche; a. u. - *arbitrary units*, willkürliche Einheiten. D) Gezeigt ist die maximale transiente ROS-Produktion nach Pep-13-Behandlung. Die Box-Plots (C und D) zeigen den Median sowie die 25 % und 75 %-Perzentilen (Boxen) als auch die 5 % und 95 %-Perzentilen (Antennen). Werte ergeben sich aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 12 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp. Die statistischen Tests auf Signifikanz erfolgten mittels one-way-ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) und Newman-Keuls-Post-Hoc-Test bei normalverteilten Werten (Exp. II (C)) bzw. mittels Kruskal-Wallis-Test ( $P \leq 0,05$ ) mit Dunns-Post-Hoc-Test (Exp. II (D); Exp I und III) bei nicht-normalverteilten Werten. Boxen mit den gleichen Buchstaben unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

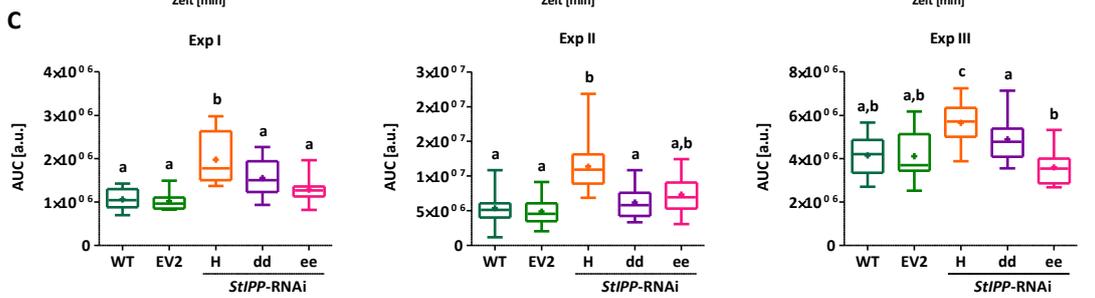
**A flg22**



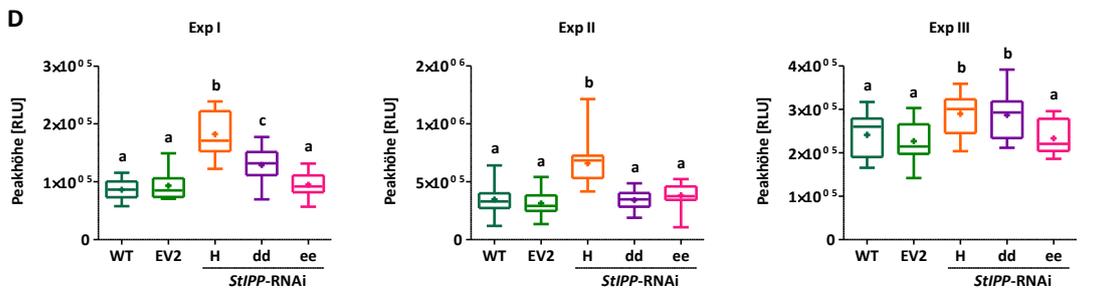
**B H<sub>2</sub>O**



**C**



**D**



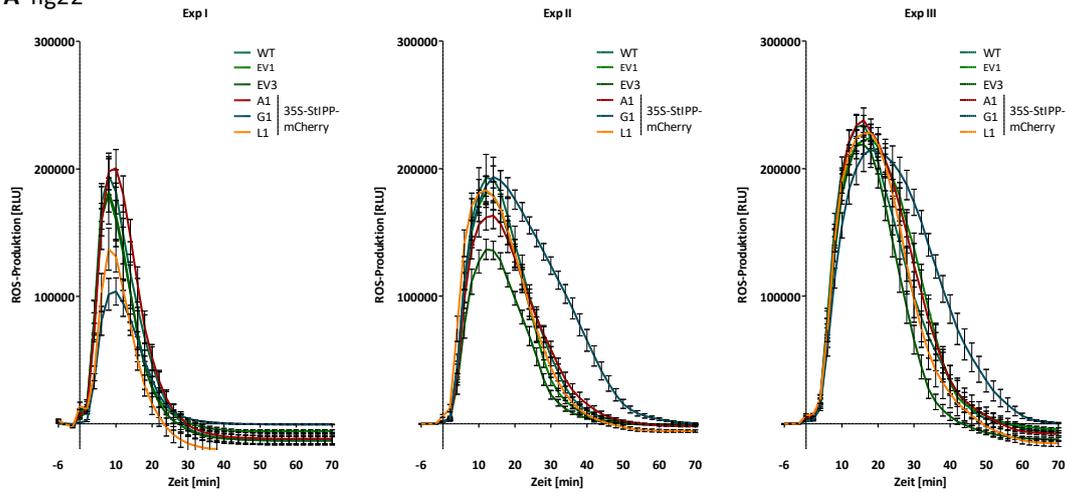
Die Behandlung mit dem bakteriellen PAMP flg22 führt in den ersten 30 min nach Elizitierung zu einer deutlichen ROS-Produktion sowohl in den Kartoffelblattscheiben der Kontrolllinien als auch in den *StIPP*-RNAi-Linien (Abb. 3.18 A). Nach der Kontroll-Behandlung mit Wasser bleibt die Bildung eines ROS-Peaks aus (Abb. 3.18 B). Nach der Elizitierung mit flg22 zeigt die *StIPP*-RNAi-Linie H eine signifikant höhere Gesamt-ROS-Bildung im Vergleich zu den Kontrolllinien und den anderen beiden RNAi-Linien in allen drei Experimenten (Abb. 3.18 C). Hinsichtlich der temporären maximalen ROS-Bildung unterscheidet sich die *StIPP*-RNAi-Linie H in drei und die Linie dd in zwei von drei Experimenten von den Kontrolllinien (Abb. 3.18 D). Die dritte RNAi-Linie ee zeigt hingegen eine ähnliche flg22-vermittelte ROS-Produktion wie die Kontrollen.

Insgesamt betrachtet scheint die Reduktion der *StIPP*-Expression zu einer leicht höheren ROS-Bildung nach flg22-Behandlung im Vergleich zum WT und der EV-Kontrolle zu führen. Denkbar wäre, dass ein stärkerer Effekt durch einen *knock-out* des Gens sichtbar wäre. Möglicherweise ist die verbleibende Expression (Abb. 3.11 B) der *StIPP* in den RNAi-Linien für eine Funktion innerhalb der PAMP-Antwort ausreichend. In dieser Hinsicht wäre jedoch auch eine mögliche Redundanz durch eine weitere 5PTase denkbar.

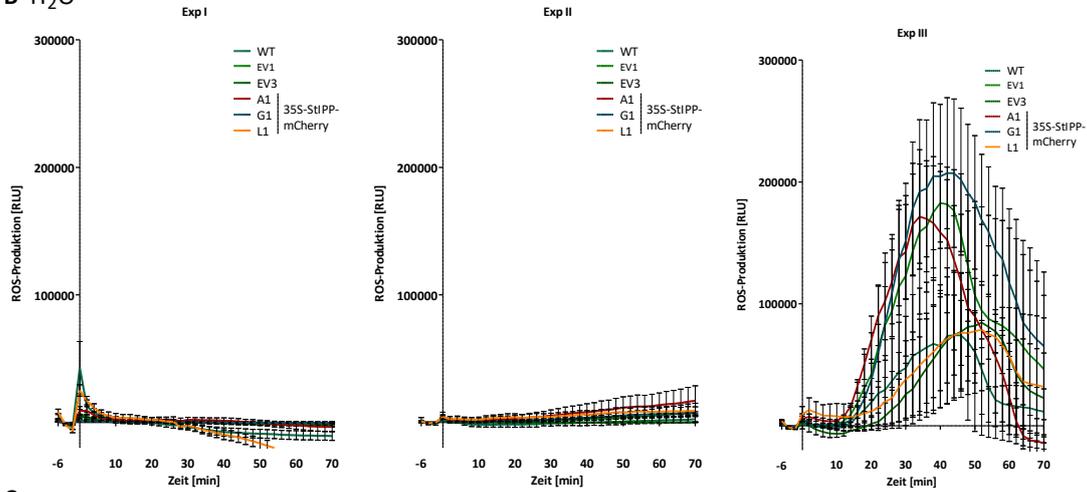
### **Abbildung 3.18: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *StIPP*-RNAi-Pflanzen nach flg22- und H<sub>2</sub>O-Behandlung**

Die ROS-Produktion wurde in 3 Wochen alten *S. tuberosum*-Transformanten (unabhängige *StIPP*-RNAi-Linien H, dd, ee; Leervektorkontrolllinie pHG8 j3 (EV2)) sowie WT-Pflanzen nach Behandlung mit 50 nM flg22 (A) oder H<sub>2</sub>O (B). Die Bestimmung der ROS-Produktion nach flg22- (A) oder H<sub>2</sub>O - (B) Behandlung erfolgte im zeitlichen Verlauf von 60 min und ist in relative Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte anhand der gemittelten gebildeten ROS-Produktion vor Behandlung durch Subtraktion von den einzelnen Werten nach Elizitierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 14 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für Pep-13 und 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 2 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für W2A. C) Die Gesamt-ROS-Akkumulation in Blattscheiben nach flg22 wurde durch Integration der Flächen unter den Kurven aus (A) berechnet. AUC - *area under the curve*, peak-Fläche; a. u. - *arbitrary units*, willkürliche Einheiten. D) Gezeigt ist die maximale transiente ROS-Produktion nach flg22-Behandlung. Die Box-Plots (C und D) zeigen den Median sowie die 25 % und 75 %-Perzentilen (Boxen) als auch die 5 % und 95 %-Perzentilen (Antennen). Werte ergeben sich aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 14 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp. Die statistischen Tests auf Signifikanz erfolgten mittels one-way-ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) und Newman-Keuls-Post-Hoc-Test bei normalverteilten Werten (Exp. I und III (C); Exp. III (D)) bzw. mittels Kruskal-Wallis-Test ( $P \leq 0,05$ ) mit Dunns-Post-Hoc-Test (Exp II (C); Exp I und II (D)) bei nicht-normalverteilten Werten. Boxen mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

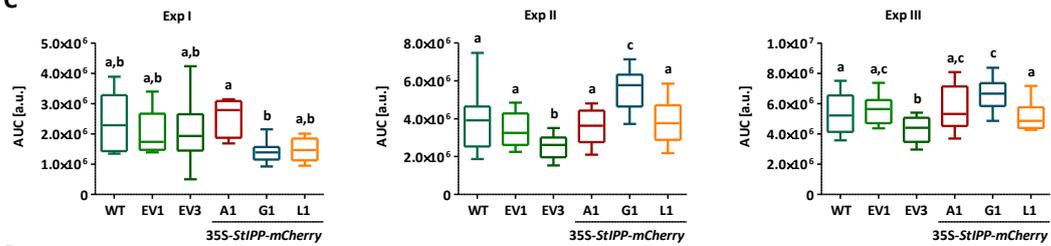
**A fig22**



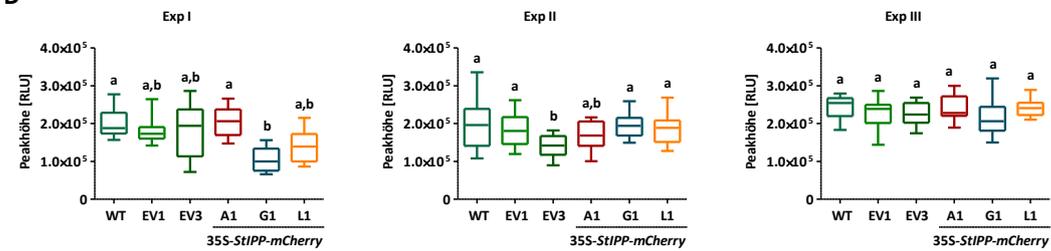
**B H<sub>2</sub>O**



**C**



**D**



In den *StIPP-mCherry*-Überexpressionslinien führt die Behandlung mit dem bakteriellen PAMP flg22 in den ersten 30 min nach Elizitierung zu einer deutlichen ROS-Produktion (Abb. 3.19 A). Die Kontrollbehandlung mit Wasser führte in zwei von drei Experimenten zu keiner Aktivierung der ROS-Produktion (Abb. 3.19 B). In einem dritten Experiment war in einigen Blattscheiben eine ROS-Entwicklung messbar. Diese unterschied sich jedoch vom flg22-induziertem ROS-Peak durch einen veränderten zeitlichen Verlauf. Aus diesem Grund wurde das Experiment ebenfalls für eine Auswertung herangezogen. Hinsichtlich der Gesamt-ROS-Produktion unterscheiden sich die *StIPP-mCherry*-Linien nicht von den WT- und EV-Kontrollpflanze (Abb. 3.19 C). Einzig die Linie G1 zeigt in einem Experiment eine signifikante leicht erhöhte ROS-Produktion. Die temporäre maximal ROS-Produktion unterscheidet sich in den untersuchten Linien nicht voneinander (Abb. 3.19 D). Insgesamt betrachtet scheint die Überexpression der *mCherry*-fusionierten 5PTase keinen Einfluss auf die PAMP-abhängige ROS-Produktion zu haben.

**Abbildung 3.19: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *StIPP-mCherry*-Überexpressions-Pflanzen nach flg22- und H<sub>2</sub>O-Behandlung**

Die ROS-Produktion wurde in 3 Wochen alten *S. tuberosum*-Transformanten (unabhängige *StIPP-mCherry*-Linien A1, G1, L1; Leervektorkontrolllinien pGPTV B2 (EV1) und pAGM32224 L (EV3)) sowie WT-Pflanzen nach Behandlung mit 50 nM flg22 (A) oder H<sub>2</sub>O (B). Die Bestimmung der ROS-Produktion nach flg22- (A) oder H<sub>2</sub>O - (B) Behandlung erfolgte im zeitlichen Verlauf von 60 min und ist in relative Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte anhand der gemittelten gebildeten ROS-Produktion vor Behandlung durch Subtraktion von den einzelnen Werten nach Elizitierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 14 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für Pep-13 und 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 2 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp für W2A. C) Die Gesamt-ROS-Akkumulation in Blattscheiben nach flg22 wurde durch Integration der Flächen unter den Kurven aus (A) berechnet. AUC - *area under the curve*, peak-Fläche; a. u. - *arbitrary units*, willkürliche Einheiten. D) Gezeigt ist die maximale transiente ROS-Produktion nach flg22-Behandlung. Die Box-Plots (C und D) zeigen den Median sowie die 25 % und 75 %-Perzentilen (Boxen) als auch die 5 % und 95 %-Perzentilen (Antennen). Werte ergeben sich aus 8 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 14 Blattscheiben (Exp. II und III) von 2 Pflanzen je Genotyp. Die statistischen Tests auf Signifikanz erfolgten mittels one-way-ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) und Newman-Keuls-Post-Hoc-Test bei normalverteilten Werten (Exp. II und III) bzw. mittels Kruskal-Wallis-Test ( $P \leq 0,05$ ) mit Dunns-Post-Hoc-Test (Exp I) bei nicht-normalverteilten Werten. Boxen mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

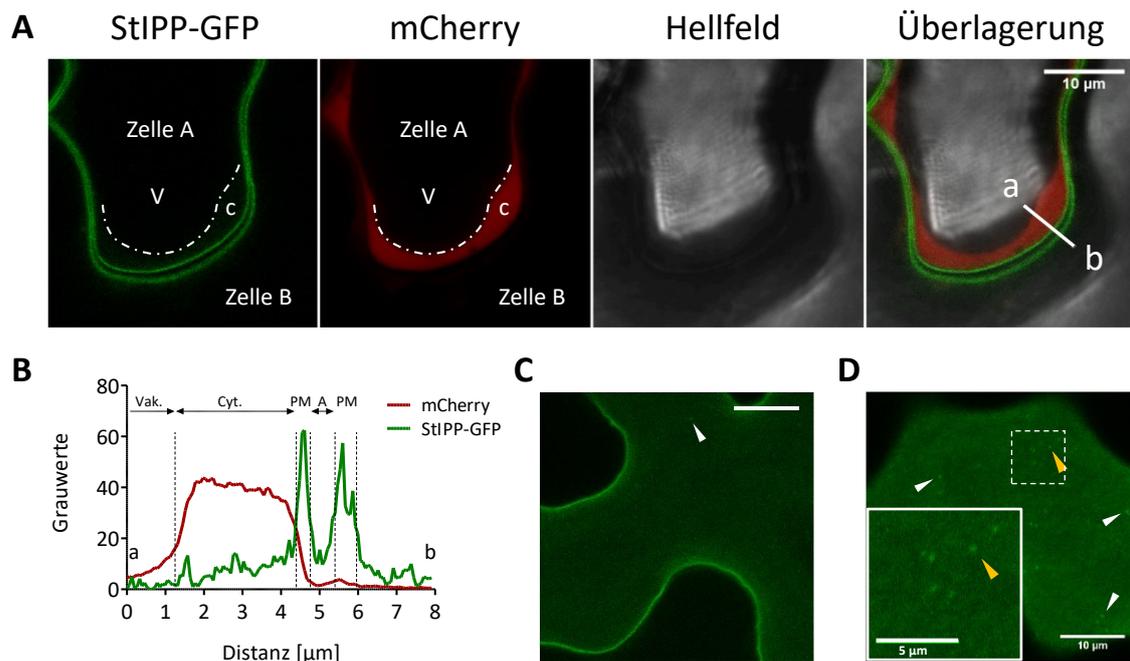
### 3.9 Transiente *StIPP*-Expression

Die vorliegenden Ergebnisse wiesen darauf hin, dass eine konstitutive starke Überexpression der 5-Phosphatase gegebenenfalls nicht möglich ist und durch die Pflanze reguliert wird. So waren *StIPP*-Transkriptmengen nach PAMP-Behandlung, Verwundung oder Infektion kaum detektierbar und stabile *StIPP*-überexprimierende Kartoffelpflanzen enthielten nur sehr geringe detektierbare *StIPP*-Proteinmengen.

Um dennoch weitere Einsicht in eine mögliche Rolle innerhalb der pflanzlichen Abwehrantwort zu erhalten, wurden fluoreszenzmarkierte Varianten von *StIPP* transient in *N. benthamiana*-Zellen sowie *A. thaliana*-Protoplasten überexprimiert, um die subzelluläre Verteilung mittels konfokaler Laserrastermikroskopie (LSM) untersuchen zu können.

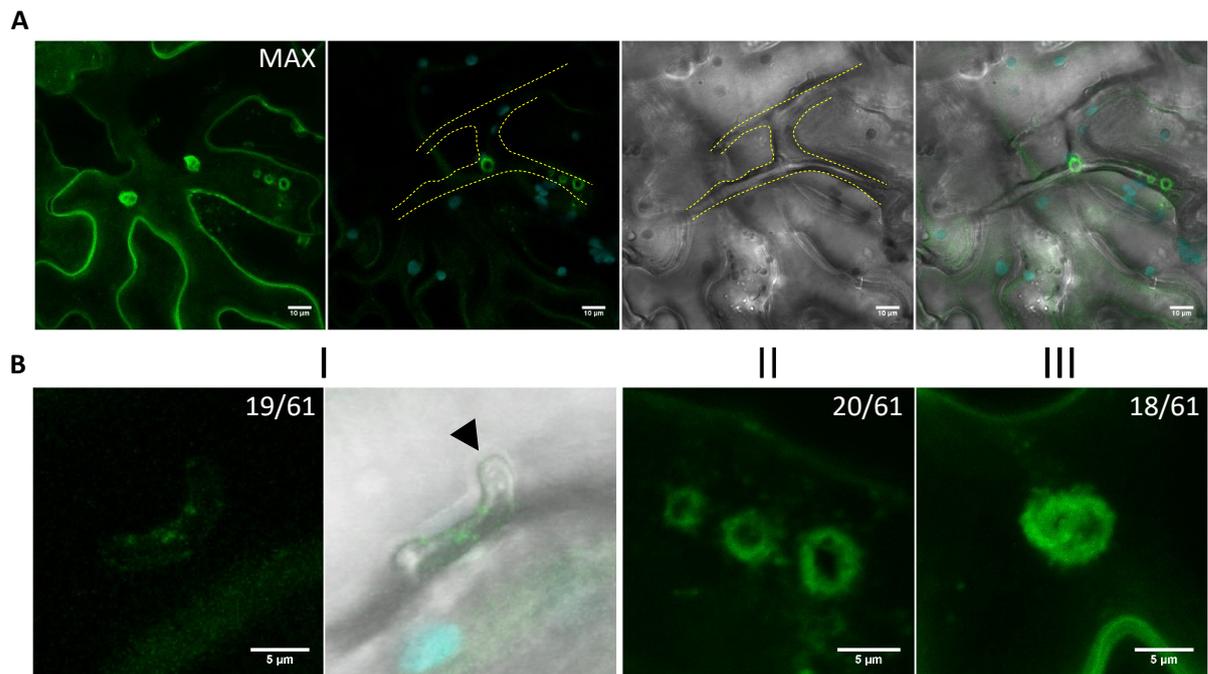
### 3.10 Transiente *StIPP*-Expression in *N. benthamiana*-Blättern

Die enzymatische Aktivität gegenüber  $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$  lässt eine PM-assoziierte subzelluläre Lokalisation vermuten. In von Dr. Irene Stenzel durchgeführten Experimenten konnte für das rekombinante überexprimierte *StIPP*-YFP-Konstrukt in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen eine PM-Lokalisation detektiert werden (Abb. 6.3 B Anhang). In weiteren Experimenten wurde *StIPP*-GFP in *N. benthamiana*-Zellen mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation transient exprimiert und drei Tage später im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) untersucht. Dort war eine vergleichbare Lokalisation wie in den Tabak-Pollenschläuchen zu beobachten. In den Tabak-Epidermiszellen zeigte überexprimiertes *StIPP*-GFP-Protein im Gegensatz zu freiem cytosolisch-lokalisiertem mCherry ein distinktes Signal entlang der Zellperipherie (Abb. 3.20 A, Zelle A). Dies zeigt PM-Lokalisation des *StIPP*-Fusionsproteins an. Im Fluoreszenz-Plot war ein zusätzliches schwaches Signal innerhalb des Cytoplasmas zu erkennen (Abb. 3.20 B). Eine vergleichbare Lokalisation konnte in einem weiteren Experiment in transient transformierten Kartoffelepidermiszellen beobachtet werden (Abb. 6.11 Anhang). Zusätzlich zur gleichmäßigen Lokalisation an der PM (Abb. 3.20 C) konnten gelegentlich in der Aufsicht auf die PM in einigen der *StIPP*-GFP-überexprimierenden Tabakepidermiszellen kleine punktförmige Signale detektiert werden (Abb. 3.20 D).



**Abbildung 3.20: Co-expression von StIPP-GFP und freiem mCherry in *N. benthamiana* Blatt-Epidermiszellen**  
*N. benthamiana*-Pflanzen wurde mit *A. tumefaciens* GV3101, die den Vektor *pB7FWG2-StIPP\_oS* (StIPP-GFP) oder den Vektor *pGWB14-mCherry* (mCherry) enthielten transient transformiert. Dies führte zur Expression von *StIPP-GFP* bzw. *mCherry* unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors. Die transformierten Tabak-Pflanzen wurden drei Tage nach Infiltration mikroskopisch mittels konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht (LSM 800). A) Dargestellt ist die Kontaktstelle zweier Tabak-Epidermiszellen. Die gestrichelte weiße Linie markiert einen Teil der von der Plasmamembran (PM) unterscheidbaren vakuolären Membran (Tonoplast). V – Vakuole; C – Cytosol. = 10  $\mu\text{m}$ . B) Der Fluoreszenz-Plot zeigt die Signalintensität entlang der eingezeichneten weißen Linie in (A), welche a und b verbindet. A – apoplastischer Raum; Cyt. - Cytosol; PM - Plasmamembran; Vak. - Vakuole. C und D) Aufsicht auf die PM StIPP-GFP-überexprimierender *N.b.*-Zellen. Die weißen Pfeilspitzen weisen auf punktförmige Lokalisation hin. Der gestrichelt umrahmte Bereich wurde zusätzlich vergrößert dargestellt Die gelbe Pfeilspitze markiert die gleichen punktförmigen Signale in der Übersichtsabbildung und im vergrößerten Bereich. Die gezeigten Bilder sind Maximalprojektionen von 19 bzw. 14 Einzelbildern mit 0,446  $\mu\text{m}$  Schritten. Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$  bzw. 5  $\mu\text{m}$  im vergrößerten Bereich.

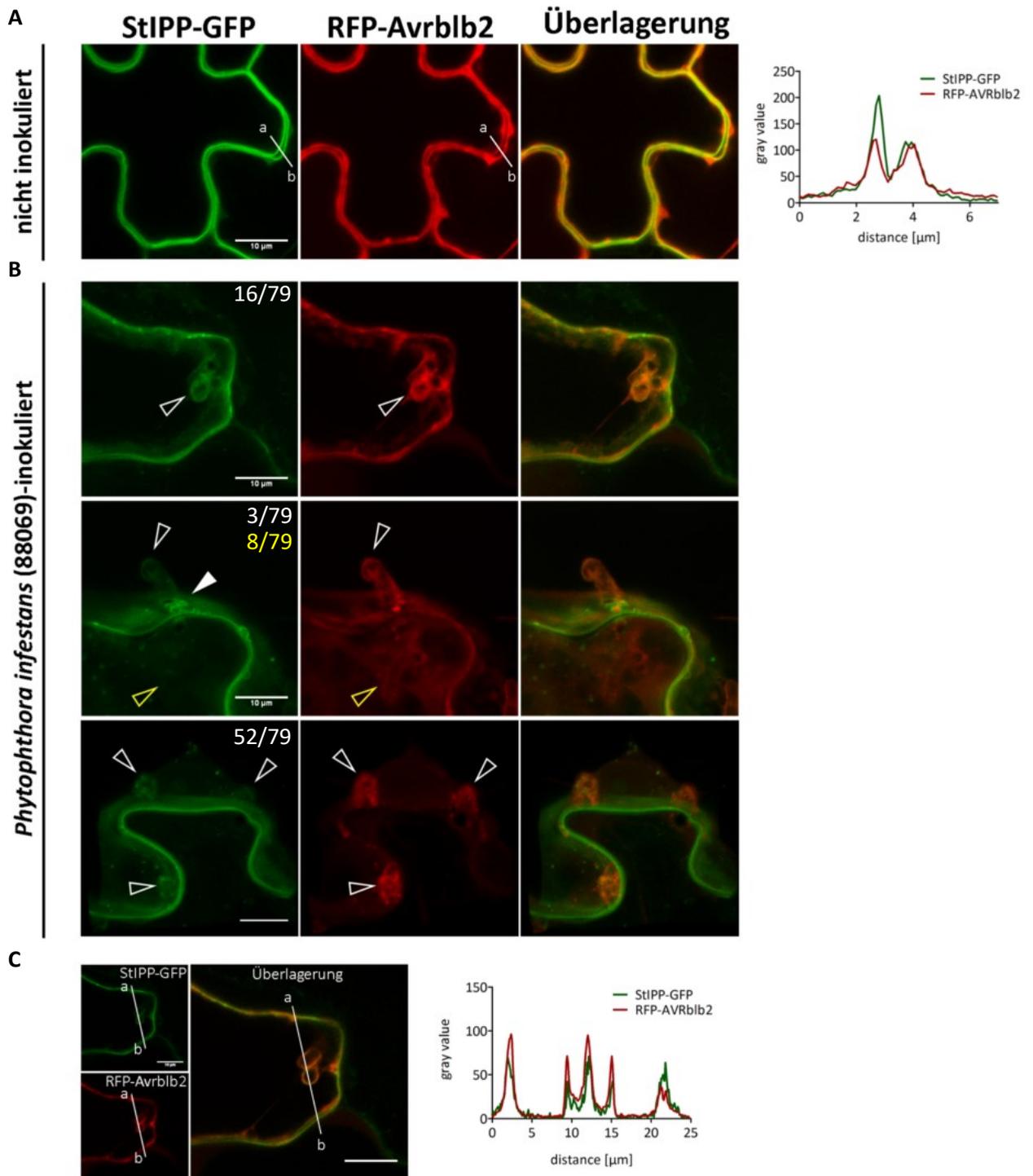
Um Informationen über die subzelluläre Lokalisation der StIPP während der Infektion mit *P. infestans* zu erhalten, wurde erneut das StIPP-GFP-Fusionskonstrukt transient mittels Agrobacterium-vermittelter Transformation in *N. benthamiana*-Blättern überexprimiert und anschließend mit dem *P. infestans*-Isolat 88069 inokuliert. Dieses Isolat ist in der Lage Tabakpflanzen unter Laborbedingungen zu infizieren (Chaparro-Garcia *et al.*, 2015). Die Infektionsstellen wurden 3 - 4 Tage nach Infektion am konfokalen LSM untersucht. Im infizierten Gewebe sind entlang der Hyphen Veränderungen in der Lokalisation des StIPP-GFP-Konstruktes sichtbar (Abb. 3.21 A). In etwa 31 % der Fälle zeigte sich eine fokale Lokalisation der GFP-fusionierten Phosphatase um haustorielle Strukturen (19 von 61, Abb. 3.21 B, I). Im gleichen Maße konnte eine ringförmige Akkumulation um die Penetrationsstelle beobachtet werden (20 von 61, Abb. 3.20 B, II), die sich in über 29 % der Beobachtungen (18 von 61) schlauchförmig entlang der Penetrationshype erstreckte.



**Abbildung 3.21: StIPP-GFP akkumuliert um *P. infestans* Penetrationsstellen**

*N. benthamiana*-Blätter, die StIPP-GFP transient unter Kontrolle des CaMV 35S-Promotors exprimierten, wurden mit *P. infestans* 88069 inokuliert und 3 dpi untersucht. A) StIPP-GFP lokalisiert an filamentösen Strukturen (markiert durch die gelben gestrichelten Linien), wobei es sich um Hyphen von *P. infestans* (88069) handelt. Bei dem ersten Bildausschnitt handelt es sich um eine Maximalprojektion (MAX) von 28 Einzelbildern in 0,554 µm Schritten. Rechts daneben ist ein Einzelbild dieser Maximalprojektion herausgegriffen, um die Lokalisation der *P. infestans*-Hyphe zu verdeutlichen. Maßbalken = 10 µm. B) Gezeigt sind repräsentative Bilder verschiedener subzellulärer Lokalisationsmuster (II und III aus A). Die gezeigten Bilder sind Maximalprojektionen von 6 bzw. 20 Einzelbildern mit 0,534 bzw. 0,554 µm Schritten für I bzw. II bis III. Die Häufigkeit der Beobachtungen ist im Bild gekennzeichnet. Maßbalken = 5 µm. Die Pfeilspitze in I weist auf eine Hyphe hin.

Um zu überprüfen, ob es sich bei den beobachteten Strukturen tatsächlich um Haustorien handelt, wurde StIPP-GFP mit einem rekombinanten RFP-AvrBlb2-Fusionskonstrukt co-exprimiert. Für diesen *P. infestans*-Effektor wurde gezeigt, dass dieser in nicht infizierten Zellen an der PM und während der Infektion vorwiegend an der EHM lokalisiert (Bozkurt *et al.*, 2014, Bozkurt *et al.*, 2015). In nicht infizierten Zellen zeigten beide Proteine eine Co-Lokalisation an der Zellperipherie (Abb. 3.22 A). Dadurch bestätigt sich die PM-Lokalisation des StIPP-GFP-Konstruktes. Darüber hinaus war ein zusätzliches cytosolisches Signal für RFP-AvrBlb2 detektierbar, jedoch nicht für StIPP-GFP. In infizierten Zellen lokalisierte RFP-AvrBlb2 in den meisten Fällen um die Haustorien, wohingegen StIPP-GFP unterschiedliche Lokalisationsmuster aufwies (Abb. 3.22 B).



**Abbildung 3.22: StIPP-GFP co-lokalisiert mit RFP-AvrBlb2 an der Plasmamembran, Extrahaustoriellen Membran und an haustoriellen Penetrationsstellen**

*N. benthamiana* Blätter die nach *Agrobacterium*-vermittelter transienter Transformation *StIPP-GFP* und *RFP-AvrBlb2* unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors exprimieren, wurden mit Wasser (A) oder *P. infestans* 88069 (B, C) inokuliert und 3 bis 4 Tage nach Inokulation (dpi) mikroskopisch untersucht. A) *StIPP-GFP* und PM-lokalisierendes *RFP-AvrBlb2* co-lokalisieren in Wasser-behandelten Epidermis-Zellen. Der Fluoreszenzplot zeigt die Signalintensität entlang der eingezeichneten weißen Linie, welche a und b verbindet. B) *StIPP-GFP* lokalisiert an den durch *RFP-AvrBlb2* markierten Penetrationsstellen und an der EHM. Die gezeigten Bilder sind jeweils Maximalprojektionen von 13, 17 und 30 Einzelbildern in 0,535 μm Schritten für die obere,

**Weiter Abb. 3.22**

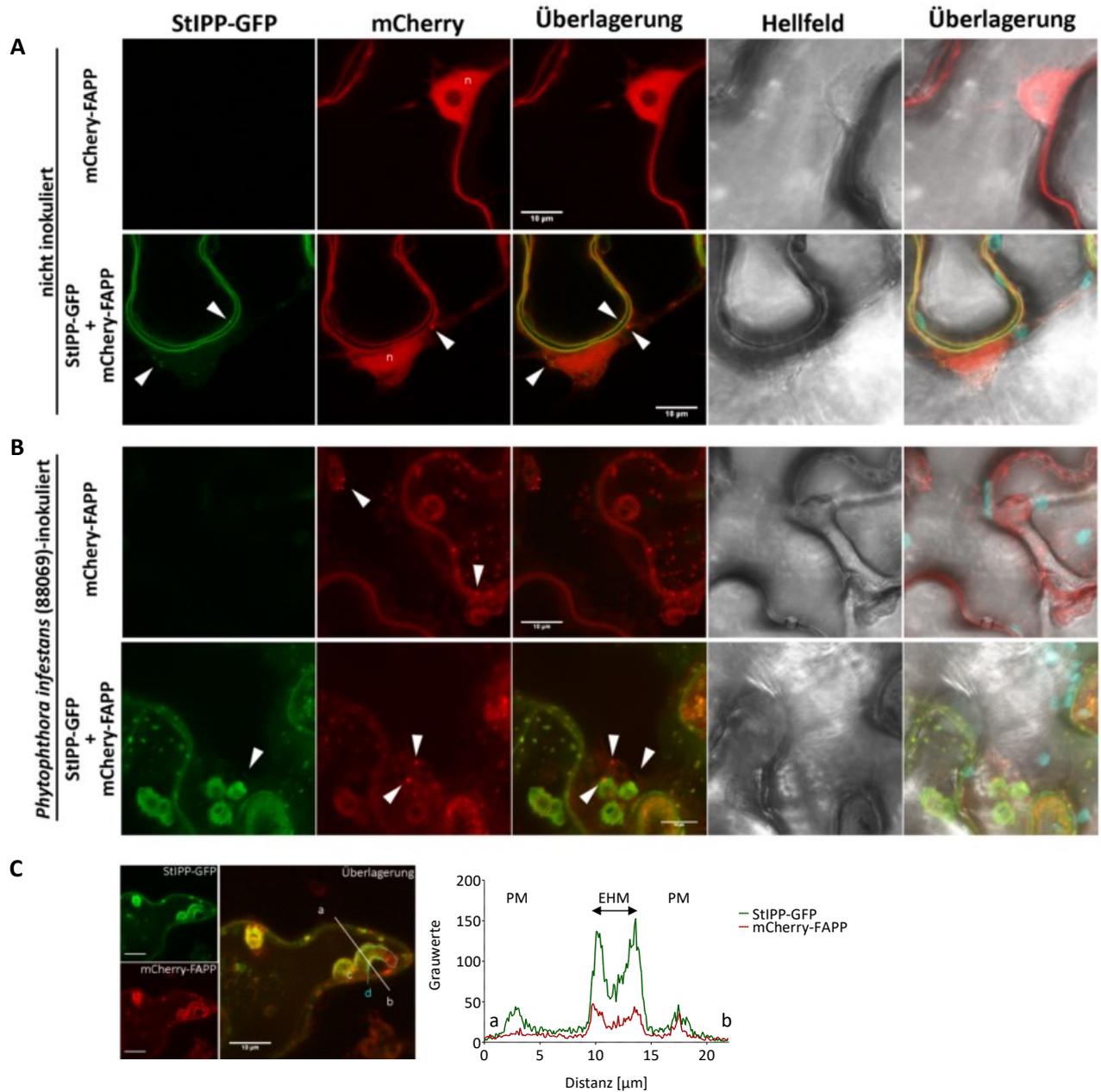
mittlere und untere Reihe. Offene Pfeilspitzen markieren Hyphen; weiße Pfeilspitzen markieren StIPP-GFP, das an Penetrationsstellen lokalisiert; gelbe offene Pfeilspitzen markieren Hyphen ohne StIPP-GFP-Lokalisation. Die Anzahl der Beobachtungen ist im Bild angegeben. In 8 von 78 Fällen konnte kein StIPP-GFP-Signal an AvrBlb2-markierten Haustorien detektiert werden; n – Zellkern, durch gestrichelte Linie gekennzeichnet. C) Einzelbild der Maximalprojektion der oberen Reihe aus (B). Der Fluoreszenz-Plot zeigt die Signalintensität entlang der eingezeichneten weißen Linie, welche a und b verbindet. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Maßbalken = 10 µm.

Drei bis vier Tage nach Inokulation mit *P. infestans* co-lokalisiert StIPP-GFP mit RFP-AvrBlb2 um die Haustorien in 20 % der beobachteten Fälle (16 von 79) (Abb. 3.22 B, C). In fast 4 % der Fälle (3 von 79) konnte ein im Vergleich zur PM stärkeres, ringförmiges und StIPP-spezifisches Signal an der Penetrationsstelle des Haustoriums detektiert werden. Dagegen konnte in 10 % der Fälle für die Phosphatase ein Signal nur an der PM, jedoch nicht an AvrBlb2-markierten Haustorien festgestellt werden. Allerdings zeigte StIPP-GFP in 65 % der Fälle (52 von 79) eine heterogene Lokalisation in Form fokaler Akkumulationen oder punktförmiger Strukturen an zellpenetrierenden Hyphen, welche durch RFP-AvrBlb2 markiert waren. Die beobachtete Lokalisation der fluoreszenzmarkierten StIPP-Fusionen weist auf eine mögliche Funktion des Enzyms an der PM infizierter Zellen hin.

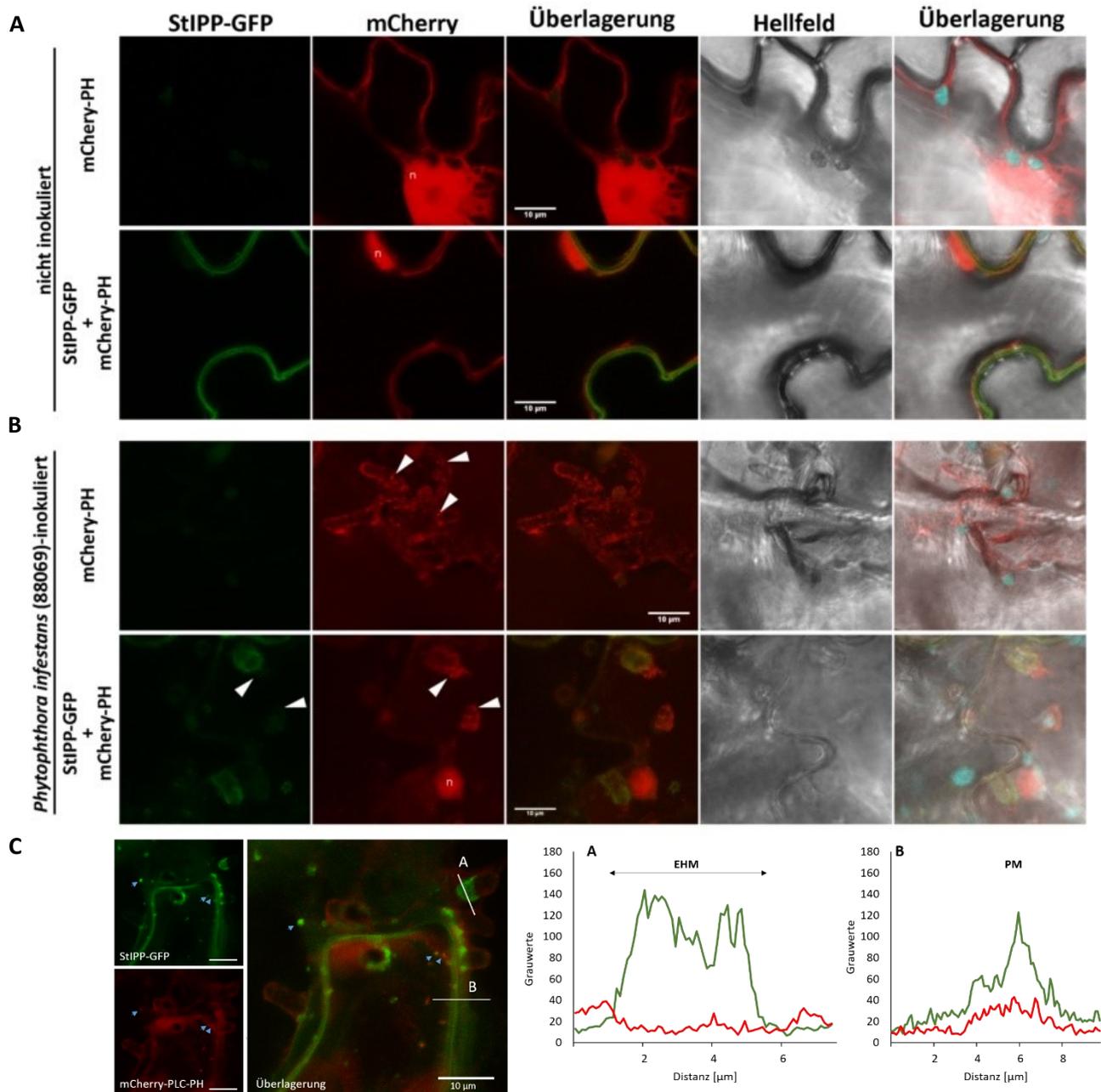
### 3.11 *In vivo* Effekte der *StIPP-GFP*-Expression auf die Abundanz von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns4P

Nachdem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat und PtdIns4P als korrespondierendes Produkt der enzymatischen Aktivität der StIPP *in vitro* identifiziert werden konnte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die StIPP-GFP Expression auch *in vivo* einen Einfluss auf die Abundanz von PIs ausüben kann. Hierzu wurde die subzelluläre Lokalisation der Phosphatase bei Co-Expression mit spezifischen Biosensoren für PtdIns4P (mCherry-FAPP1) oder für PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (mCherry-PH) nach transienter Transformation in *N. benthamiana* betrachtet. Dabei wurde die Co-Lokalisation in nicht-infizierten und *P. infestans*-infizierten Tabak-Blättern verglichen.

In nicht infiziertem Gewebe zeigte StIPP-GFP eine Co-Lokalisation sowohl mit dem PtdIns4P-Reporter mCherry-FAPP1 als auch mit dem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Reporter mCherry-PH an der Zellperipherie (3.23 A und 3.24 A). Zusätzlich war für beide PI-Reporter ein starkes Signal im Nucleus und Zytosol detektierbar. Ob es sich dabei um freies mCherry als Artefakt der Überexpression oder auch um Detektion dort lokalisierter (Phosphatidyl-) Inositole handelte, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch zeigten beide Bindedomänen in infizierten Zellen eine Verteilung, die sich von freiem mCherry in infiziertem Gewebe unterschied. In *mCherry-FAPP1*-überexprimierenden infizierten Zellen konnte zusätzlich zu einer diffusen Lokalisation eine punktförmige Lokalisation des PtdIns4P-Reporters um penetrierende Hyphen detektiert werden (Abb. 3.23 B). Dieses Muster bestand weiterhin bei Co-Expression mit *StIPP-GFP*, welches eine schlauchförmige Lokalisation aufwies. Der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Reporter mCherry-PH zeigte in infizierten Zellen ebenfalls eine diffuse Lokalisation sowie punktförmige Akkumulationen um die penetrierenden Hyphen, die der Verteilung von mCherry-FAPP1 ähnelten (Abb. 3.24 B). Eine Co-Lokalisation mit StIPP-GFP konnte hier aber nicht festgestellt werden. Wo StIPP-GFP schlauchförmig nahe der Penetrationsstelle lokalisierte, zeigte mCherry-PH eine apikale Lokalisation um die Penetrationshyphen. Die Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Anwesenheit von StIPP-GFP an der EHM mit einer vermehrten Reporterfluoreszenz des PtdIns4P-Markers mCherry-FAPP1 bzw. einer verminderten Reporterfluoreszenz des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Markers mCherry-PH korrelierte (vglw. Abb. 3.23 C und 3.24 C). Im Gegensatz dazu zeigte sich kein Effekt der Anwesenheit von StIPP-GFP auf die PI-Marker an der PM. Das beobachtete Muster weist darauf hin, dass StIPP-GFP mglw. besonders an der EHM einen Umsatz von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns4P ermöglicht.



**Abbildung 3.23: StIPP-GFP co-lokalisiert mit einem PtdIns4P -Markerprotein an penetrierenden Hyphen.** *N. benthamiana*-Blätter, die transient *StIPP-GFP* und eine *mCherry*-fusionierte PtdIns4P-Bindedomäne (*mCherry-FAPP*) unter Kontrolle des *CaMV 35S*-Promotors exprimierten, wurden mit einer *P. infestans* 88069-Zoosporensuspension ( $5 \times 10^4$ ) inokuliert und 3 bis 4 dpi mikroskopisch analysiert. A) Bilder von nicht infiziertem Gewebe zeigen Einzelbilder. Weiße Pfeilspitzen weisen auf punktförmige Strukturen hin, n – Zellkern, Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$  B) Die gezeigten Bilder von infiziertem Gewebe sind Maximalprojektionen von 20 und 24 Einzelbildern in 0,535  $\mu\text{m}$  Schritten jeweils für die obere und untere Reihe. Weiße Pfeilspitzen weisen auf punktförmige Strukturen neben den Haustorien hin. Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$  C) *StIPP-GFP* und *mCherry-FAPP1* co-lokalisieren um die penetrierenden Hyphen. Die Fluoreszenzplots zeigen die Signalintensität entlang der eingezeichneten weißen (EHM schneidend) bzw. cyanfarbenen (entlang der EHM) Linie, welche a und b bzw. c und d verbindet. Die gezeigten Bilder sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$

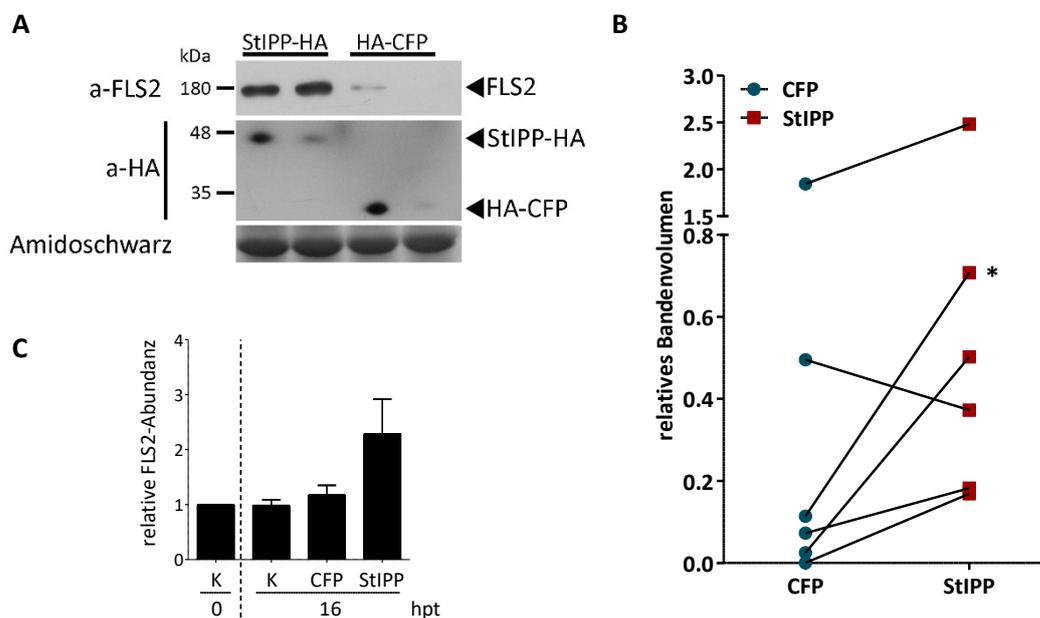


**Abbildung 3.24: StIPP-GFP co-lokalisiert mit einem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Markerprotein an penetrierenden Hyphen**

A) Bilder von nicht infiziertem Gewebe zeigen Einzelbilder. B) Die dargestellten Bilder von infiziertem Gewebe sind Maximalprojektionen von 8 und 11 Einzelbildern in 0,535  $\mu\text{m}$  Schritten jeweils für die obere und untere Reihe. Weiße Pfeilspitzen weisen auf punktförmige Strukturen neben den Haustorien hin. N – Zellkern; Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$ . C) StIPP-GFP und mCherry-PLC-PH lokalisieren um die penetrierenden Hyphen sowie im Cytosol, ähnlich freiem mCherry. Zusätzlich sind punktförmige Strukturen, an denen StIPP-GFP und mCherry-PH co-lokalisieren sichtbar (cyanfarbene Pfeilspitzen). Die gezeigten Bilder sind Maximalprojektionen von 14 Einzelbildern. Maßbalken = 10  $\mu\text{m}$ . Rechts davon zeigen die Fluoreszenz-Plots die Signalintensität entlang der eingezeichneten weißen Linien A (an der EHM) und B (an der PM).

### 3.12 *StIPP*-Überexpression beeinflusst die Abundanz des FLS2-Rezeptors in *A. thaliana*-Protoplasten

In vorangegangenen Studien wurde ein Zusammenhang zwischen der Aktivität von Phospholipasen C und der Endocytose des aktivierten FLS2-Rezeptors der PM (Abd-El-Haliem *et al.*, 2016), sowie zwischen dessen endosomaler Sortierung und der Aktivität von PI 4-Kinase (Antignani *et al.*, 2015) hergestellt. Um zu überprüfen, ob die transiente Expression von *StIPP* in *Arabidopsis* Col-0 Wildtyp Mesophyll-Protoplasten einen Einfluss auf die Abundanz membranassoziierter Proteine hat, wurden die Mengen des FLS2-Rezeptors 16 h nach Transformation in den jeweiligen Protoplasten semiquantitativ im Western Blot mittels FLS2-Antikörper bestimmt (Abb. 25 A).



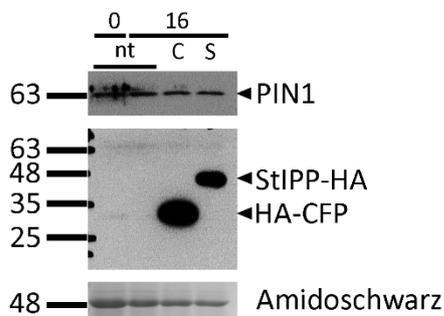
**Abbildung 3.25: Überexpression der *StIPP* in *A. thaliana*-Mesophyll-Protoplasten resultiert in einer erhöhten FLS2-Abundanz**

Ein *StIPP*-HA-bzw. *HA-CFP*-Fusionskonstrukt wurde unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors transient in Protoplasten von *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen exprimiert. A) 16 Stunden nach Transformation wurden der Gesamtproteingehalt durch SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot hinsichtlich der FLS2-Abundanz mittels  $\alpha$ -FLS2-Antikörper analysiert. Der Nachweis der Expression der Fusionskonstrukte erfolgte im Anschluss mittels  $\alpha$ -HA-Antikörper auf derselben Membran. Ähnliche Ergebnisse wurden in 5 von 6 Experimenten erhalten. Eine Amidoschwarz-Färbung diente zur Kontrolle für gleichmäßige Beladung. B) Gezeigt ist der gepaarte Vergleich der FLS2-Menge der *HA-CFP*- bzw. *StIPP*-HA-überexprimierenden Protoplasten von sechs, wie unter A) beschriebenen Western-Blot-Experimenten. Das relative Bandenvolumen wurde mit Hilfe der ImageJ-Software bestimmt. Die Normalisierung der FLS2-Bandenvolumen erfolgte anhand der Amidoschwarz-gefärbten großen Untereinheit der RuBisCo. Der Stern markiert das in (A) dargestellte Ergebnis. C) Die FLS2-Menge wurde in *HA-CFP*- bzw. *StIPP*-HA-überexprimierenden, sowie unbehandelten Protoplasten unter Verwendung eines Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpers, der im Infrarotbereich detektierbar war ( $\alpha$ -Kaninchen-IRDye800), bestimmt. Die probenspezifische Normalisierung erfolgte anhand Gesamtproteinmenge mittels eines Farbstoffs der Firma DyeAgnostics. Zur Vergleichbarkeit der Experimente wurden die 16-h-Werte anhand des zugehörigen 0-h-Wertes normalisiert. Dargestellt sind die MW und SE aus drei Experimenten. Statistischer Test: Student's T-Test,  $p = 0,164$

Dabei fiel auf, dass in den *StIPP*-HA-überexprimierenden Proben mehr FLS2-Rezeptorprotein (theoretisches MW 129 kDa) bei einer Laufhöhe von etwa 180 kDa detektierbar war als in den

Kontrollproben, die ein HA-CFP-Konstrukt überexprimierten (Abb. 3.25 A). Dies konnte in weiteren vier von insgesamt sechs Experimenten beobachtet werden (Abb. 3.25 B, Abb. 6.12 Anhang). In weiteren drei unabhängigen Experimenten wurden die FLS2-Mengen mittels Fluoreszenzfarbstoffgekoppelter-Antikörper bestimmt. Dabei wurden die erhaltenen Werte anhand der Gesamtproteinmenge normalisiert. Es ergaben sich Schwankungen in den Proteinmengen aufgrund der unterschiedlichen Protoplastenpräparationen. Um die drei Experimente zusammenfassen zu können, wurden die normalisierten Werte der 16 hpt-Proben zusätzlich auf die Werte der 0 hpt-Kontrollprobe bezogen (Abb. 3.25 C). Dabei handelte es sich jeweils um die für die Transformation verwendeten Protoplasten. Es zeigt sich, dass die FLS2-Proteinmengen der nicht transformierten Kontrollproben (K) sowie der HA-CFP-überexprimierenden Proben 16 hpt den ursprünglichen FLS2-Proteinmengen (K, 0 hpt) entsprechen. Die StIPP-HA-exprimierenden Protoplasten weisen ungefähr die 2,3-fache Menge an FLS2 im Vergleich zu den nicht-transformierten Kontrollproben K und die ungefähr 2-fache Menge der in den HA-CFP-exprimierenden Proben auf.

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten Effekt von StIPP auf die FLS2-Abundanz um einen generellen Einfluss auf Membranproteine handelt, wurde zusätzlich mittels Western Blot die PIN1-Abundanz bestimmt (Abb. 26, Abb. 6.13 Anhang). PIN1 unterliegt ebenfalls CME-abhängigen Recycling-Prozessen (Gerth *et al.*, 2017). Vergleicht man die Menge des PIN1-Proteins (theoretisches MW 67 kDa) in den HA-CFP-überexprimierenden Protoplasten mit der in den StIPP-HA-überexprimierenden Pflanzen, lässt sich kein Unterschied feststellen (siehe zusätzlich Abb.6.9 Anhang).



**Abbildung 3.26: Überexpression der StIPP in *A. thaliana*-Protoplasten resultiert in keiner veränderten PIN1-Menge**

Ein *StIPP*-HA-bzw. *HA-CFP*-Fusionskonstrukt wurde unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors transient in Protoplasten von *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen exprimiert. 16 Stunden nach Transformation wurden der Gesamtproteingehalt durch SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot hinsichtlich der PIN1-Abundanz mittels  $\alpha$ -PIN1-Antikörper analysiert. Der Nachweis der Expression der Fusionskonstrukte erfolgte zuvor mittels  $\alpha$ -HA-Antikörper auf derselben Membran. Ähnliche Ergebnisse wurden in weiteren vier Experimenten erhalten. Eine Amidoschwarz-Färbung diente zur Kontrolle für gleichmäßige Beladung.

Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine Funktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Phosphatase StIPP während der Wirts-Pathogen-Interaktion von *S. tuberosum* und *P. infestans* hin. StIPP akkumuliert an der EHM *P. infestans*-infizierter *N. benthamiana*-Zellen und bewirkt in *A. thaliana*-Protoplasten eine höhere Abundanz eines für die Immunantwort wichtigen membranständigen Rezeptors.



## 4 Diskussion

Die subzellulären Abwehrprozesse und beteiligten Komponenten während der Infektion von *S. tuberosum* mit *P. infestans* sind großteils unbekannt und das Wissen um die Biogenese und Funktion der Wirts-Pathogen-Interaktionsstelle nicht weitgehend untersucht (Bozkurt and Kamoun, 2020, Rausche *et al.*, 2021). Die Erkenntnisse dazu haben in den vergangenen Jahren zugenommen, allerdings sind viele Fragen, besonders zu den Mechanismen und Funktion der EHM, weiterhin unbeantwortet (Bozkurt *et al.*, 2015, Bozkurt and Kamoun, 2020). Obwohl über die Funktion von PIs und an ihrer Biosynthese beteiligten Enzymen während der pflanzlichen Immunantwort bislang nur wenig bekannt ist, weisen verschiedene publizierte Studien sowie die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine regulatorische Rolle von PtdIns4P und PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> während der pflanzlichen Abwehrantwort hin.

### 4.1 Eine PM-lokalisierte Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphat-Phosphatase wird im Rahmen der Abwehrantwort aktiviert

Während der pflanzlichen Immunantwort kommt es zu einer massiven Umprogrammierung der Genexpression. Dabei kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl von Abwehrgenen, worunter sich auch Gene befinden, die in Endo- und Exozytoseprozesse involviert sind.

In solchen vesikulären Transportprozessen nehmen PIs eine zentrale regulatorische Position ein. Interessanterweise wurden in einem Screen zur Identifizierung von Genen, die an der Abwehrantwort beteiligt sind, auch Komponenten des PI-Stoffwechsels identifiziert. Dabei zeigte das Gen für die in dieser Arbeit näher untersuchte StIPP-Phosphatase die stärkste Aktivierung nach Pep-13-Behandlung im Vergleich zur Kontrollbehandlung (Tabelle 3.1). Weiterführende Untersuchungen zeigen eine Induktion der *StIPP*-Transkription nicht nur nach Pep-13-Behandlung, sondern auch nach Verwundung oder *P. infestans*-Infektion (Abb. 3.3 bis 3.5). Experimente mit SA- und JA-defizienten Pflanzen weisen auf eine SA- bzw. JA-abhängige *StIPP*-Expression zu späteren Zeitpunkten nach Pep-13-Behandlung hin (Abb. 3.3 B). In *S. tuberosum* sind beide Hormone für die Pep-13-induzierten Abwehrantworten notwendig (Halim *et al.*, 2009). Dabei scheint die Pep-13-abhängige JA-Akkumulation von SA abhängig zu sein, da in SA-defizienten *NahG*-exprimierenden Kartoffelpflanzen die Akkumulation von JA nach Pep-13-Behandlung ausbleibt (Halim *et al.*, 2009). Somit kann anhand der in dieser Arbeit vorliegenden Daten nicht auf eine direkte SA-Abhängigkeit der späteren *StIPP*-Expression geschlossen werden. Es wäre denkbar, dass JA für die Feinregulation SA-unabhängiger *StIPP*-Expressionslevel benötigt wird. An dieser Stelle wären Experimente zur Induzierbarkeit der *StIPP* durch JA notwendig. Bemerkenswerterweise wird die Expression einer bekannten 5-PTase aus *Arabidopsis*, *At5PTase11*, durch JA induziert (Ercetin and Gillaspay, 2004). Diese 5-PTase zeigt eine Transkriptakkumulation zwei Stunden nach Behandlung mit JA. Spätere Studien bekräftigen einen Zusammenhang zwischen dem JA-Signalweg und dem PI-Netzwerk. So führt eine endogene JA-Akkumulation innerhalb von 15 min zu einem Anstieg der löslichen InsP<sub>3</sub>-Level in *A. thaliana* (Mosblech *et al.*, 2008). Interessanterweise wurde das lösliche Inositolpentakisphosphat IP<sub>5</sub> als Co-Faktor des F-Box-Proteins CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1)

in *Arabidopsis* identifiziert (Sheard *et al.*, 2010). Dort funktioniert COI1 zusammen mit dem Transkriptionsrepressor JAZ (JASMONATE ZIM DOMAIN 1) innerhalb des E3-Ubiquitin-Ligase SKP1-Cullin-F-box-Komplexes als Rezeptor für JA-Isoleucin (JA-Ile; Sheard *et al.*, 2010, Mosblech *et al.*, 2011). Die Perzeption von JA-Ile führt zum Abbau des JAZ-Repressors und somit zur Derepression verschiedener Transkriptionsfaktoren, was nachfolgend zur Aktivierung von JA-abhängigen Abwehrgenen führt (Riemer *et al.*, 2022). Ein Zusammenhang zwischen der StIPP-abhängigen Verfügbarkeit von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, was als Substrat der Phospholipase C eine Vorstufe des löslichen IP<sub>3</sub> und weiter von IP<sub>5</sub> ist, wäre denkbar, aber rein spekulativ.

In den *in silico*-Analysen weist die Aminosäuresequenz des untersuchten StIPP-Proteins die höchste Ähnlichkeit in *A. thaliana* zu der 5-Phosphatase 11 (At5PTase11) auf und damit eine nähere Verwandtschaft als zu putativen *S. tuberosum*-Proteinen, die ebenfalls die für 5-Phosphatasen typische katalytische Motive enthalten (Abb. 3.10). Somit könnte es sich bei StIPP und At5PTase11 um homologe Proteine handeln. Ähnlich der 334 Aminosäuren langen At5PTase11 besteht der Großteil der 338-Aminosäuresequenz der StIPP aus der katalytischen IPP-Domäne und enthält keine weiteren bekannten Protein-Domänen (Ercetin and Gillaspay, 2004). Beide Enzyme weisen ein ähnliches Substratspektrum auf. Die At5PTase11 zeigt *in vitro* nur Aktivität gegenüber den Pls PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, PtdIns(3,5)P<sub>2</sub> und PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, jedoch nicht gegenüber wasserlöslichen Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> und Ins(1,3,4,5)P<sub>4</sub> (Ercetin and Gillaspay, 2004). Das Substratspektrum der StIPP erwies sich in den Untersuchungen dieser Arbeit als noch enger. Die Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen zur Enzymaktivität zeigen, dass die induzierte StIPP für eine funktionale PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-5-Phosphatase kodiert, welche spezifisch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns4P dephosphoryliert (Abb. 3.7, 3.8 und 3.9). Ein ähnliches Substratspektrum weisen die At5PTasen CVP2, CVL1 und die At5PTase9 auf, wobei diese zusätzlich *in vitro* Aktivität gegenüber PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> zeigten, einem PI, das in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Carland and Nelson, 2009, Kaye *et al.*, 2011, Golani *et al.*, 2013, Gerth *et al.*, 2017). Bemerkenswerterweise erfolgten die enzymatischen Analysen der vorliegenden Arbeit mit rekombinanten StIPP-Protein, welches im prokaryotischen System exprimiert wurde. Andere 5-Phosphatasen wurde in bisherigen Untersuchungen zur Enzymaktivität im eukaryotischen System, wie z. B. die At5PTase11 in *Drosophila melanogaster* S2 Gewebekulturzellen, exprimiert, da aktives rekombinantes Protein im prokaryotischen System nicht gewonnen werden konnte (Ercetin and Gillaspay, 2004). Die Autoren vermuten als Ursache der Inaktivität prokaryotisch gewonnener 5PTasen das Fehlen posttranslationaler Modifikationen. Jedoch zeigen andere vorausgegangene Studien zur enzymatischen Aktivität verschiedener PI 4-Kinasen oder PI4P 5-Kinasen, dass im prokaryotischen System aktive PI-modifizierende Enzyme exprimiert werden können (Ischebeck *et al.*, 2008, Ischebeck *et al.*, 2010b, Hempel *et al.*, 2017). Demzufolge ist für die enzymatische Aktivität von StIPP gegenüber PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> keine eukaryotische posttranslationalen Modifizierung notwendig. Weiterführende, durch Dr. Irene Stenzel durchgeführte, heterologe Analysen in Tabak-Pollenschläuchen stützen die Ergebnisse zur Substratspezifität. So zeigen Tabak-Pollenschläuche bei heterologer Überexpression einer C-terminal YFP-markierten StIPP einen Phänotyp, der dem von Pollenschläuchen von *pip5k4 pip5k5*-*Arabidopsis*-Doppelmutanten ähnelt (Abb. 6.3 Anhang; Ischebeck *et al.*, 2008, Rausche *et al.*, 2021). Die PtdIns-Kinasen PIP5K4 und PIP5K5 phosphorylieren PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>. In den

*pip5k4 pip5k5*-Doppelmutanten ist die Verfügbarkeit von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> reduziert, was mit einer signifikant verringerten Pollenkeimungsrate im Vergleich zum WT einhergeht (Ischebeck *et al.*, 2008). Demgegenüber ruft eine erhöhte Verfügbarkeit von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> aufgrund heterologer Überexpression der PI4P 5-kinase *PIP5K5* weitere distinkte Veränderungen der Pollenschlauchmorphologie hervor (Ischebeck *et al.*, 2008, Rausche *et al.*, 2021). Die gleichzeitige Expression der Gene für die PI4P 5-kinase *AtPIP5K5* und der StIPP-Phosphatase führt zu signifikant mehr morphologisch normalen Pollenschläuchen, was durch eine Wiederherstellung des PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gleichgewichtes durch Aktivität der StIPP zu erklären ist (Rausche *et al.*, 2021). Diese Ergebnisse zeigen zusätzlich zur *in vivo*-Aktivität als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-Phosphatase, dass StIPP-Fluoreszenzprotein-Konstrukte als funktionale Enzyme für die Generierung von Überexpressionsmutanten geeignet sind.

Die enzymatische Aktivität gegenüber PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> geht mit der subzellulären Lokalisation heterolog exprimierten StIPP-Proteins an der PM von Kartoffel- als auch Tabakzellen einher (Abb. 6.5 und 6.11 Anhang, sowie Abb. 3.20). So geht unter anderem aus mikroskopischen Studien mit *A. thaliana* hervor, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hauptsächlich in der cytosolischen Seite der PM vorkommt. Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführte Co-Expressions-Analysen von *StIPP-GFP* mit dem Fluoreszenz-markierten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Reporter *mCherry-PH* in Tabak-Zellen deuten auf eine Co-Lokalisation der StIPP-Phosphatase mit ihrem Substrat PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> an der PM hin (Abb. 3.24). Zusätzliche, durch Dr. Fratini durchgeführte, Korrelationsanalysen der Fluoreszenzintensitäten dieser Experimente weisen einen durchschnittlichen Pearson-Koeffizienten von 0,89 und damit einen hohen Grad der Co-Lokalisation auf (Rausche *et al.*, 2021). In gleicher Weise ist eine Co-Lokalisation von StIPP-GFP und dem Fluoreszenz-markierten PtdIns4P-Bindeprotein *mCherry-FAPP1* in nicht infizierten Tabakzellen zu beobachten (Abb. 3.23; Rausche *et al.*, 2021). Die Lokalisation an der PM erscheint bei Aufsicht (Abb. 3.20 C) recht gleichmäßig, gelegentlich konnten jedoch kleine punktförmige Strukturen beobachtet werden (Abb. 3.20 D). Ob es sich dabei um besondere Strukturen wie Micro- oder Nanodomänen handelt, könnte mit Hilfe alternativer hochauflösender mikroskopischer Verfahren zu der in dieser Arbeit angewendeten konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie wie z.B. *spinning disc*- oder Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (*total internal reflection fluorescence microscopy*, TIRF-Mikroskopie) untersucht werden. Unter Verwendung der *spinning disc*-Mikroskopie wurde kürzlich gezeigt, dass PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und die Fluoreszenzprotein-markierte PIP-Kinase *AtPIP5K2-EYFP* in dynamischen PM-Nanodomänen lokalisieren (Fratini *et al.*, 2021). Des Weiteren sind punktförmige Strukturen auch intrazellulär nach *P. infestans*-Infektion zu sehen (Abb. 3.22 und Abb. 3.23). Der genaue Ursprung dieser Akkumulationen ist ebenfalls nicht bekannt. Es könnte sich um vesikuläre Strukturen unbekannter Identität, wie z. B. späten Endosomen, handeln. Hier sind weiterführende mikroskopische Analysen mit geeigneten Endomembran-Markern notwendig.

## 4.2 StIPP lokalisiert an den Haustorien in *P. infestans*-infizierten Pflanzen

In *P. infestans*-infizierten Tabak-Zellen lokalisiert transient exprimiertes StIPP-GFP zusätzlich zur PM vor allem an der EHM (Abb. 3.21 und Abb. 3.22), was vermuten lässt, dass dies der Ort der StIPP-

Aktivität während der Infektion ist. Die lokale Quantifizierung von PIs ist schwierig, jedoch ist die subzelluläre Lokalisation dieser Lipide unter Verwendung etablierter Biomarker möglich. Unter Zuhilfenahme der Biosensoren mCherry-FAPP1 (für PtdIns4P) und mCherry-PH (für PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) wurde interessanterweise kürzlich in der EHM von *A. thaliana*-Zellen, die mit den biotrophen Pilzen *E. cichoracearum* bzw. *A. candida* infiziert wurden, PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> detektiert, jedoch nicht PtdIns4P (Qin *et al.*, 2020). In der extra-invasiven hyphalen Membran von *Arabidopsis*-Zellen, die mit dem hemibiotrophen Pathogen *C. higginsianum* infiziert wurden, wurden beide Lipide detektiert (Shimada *et al.*, 2019), wobei sich die PtdIns4P-spezifischen Signale, im Gegensatz zu den PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifischen Signalen, in ihrer Intensität nicht von denen an der PM unterscheiden (Shimada *et al.*, 2019). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Biosensoren an der EHM von *P. infestans*-infizierten *Nicotiana*-Zellen sowohl die Anwesenheit von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als auch von PtdIns4P (Abb. 3.23 und Abb. 3.24), wobei die Intensität der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Signale an der EHM vermindert und die der PtdIns4P-Signale vermehrt zu sein scheint.

Die Co-Expressions-Untersuchungen des etablierten Fluoreszenz-markierten Bindeproteins mCherry-FAPP1, welches das Produkt der StIPP-Aktivität PtdIns4P erkennt, zusammen mit StIPP-GFP zeigen eine Co-Lokalisation an den Haustorien *P. infestans*-infizierter Tabakzellen (Abb. 3.23 B). Obwohl Signale des Fluoreszenz-markierten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bindeproteins mCherry-PH an der EHM in *P. infestans*-infizierten *Nicotiana*-Zellen detektierbar sind, weist dieser Marker, anders als an der PM, keine Co-Lokalisation mit StIPP-GFP an der EHM auf, was durch einen negativen Pearson-Koeffizienten gestützt wird (Abb. 3.24; Rausche *et al.*, 2021). Ein Grund dafür könnte sein, dass die GFP-markierte Phosphatase das an der EHM zur Verfügung stehende PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> umgesetzt hat, und damit die Bindestellen für den PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Marker mCherry-PH entfernt hat. Zusätzlich wäre eine posttranslationale Modifizierung denkbar, die die Aktivität der StIPP an der EHM erhöht. Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die starke Expression von StIPP-GFP die Bindestellen für den PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Marker mCherry-PH maskiert werden, da beide Proteine um den gleichen Liganden konkurrieren. Hier sind weiterführende Untersuchungen zur Regulation und Dynamik der StIPP-Lokalisation notwendig. Ob eine Lokalisation der StIPP in ähnlicher Weise in *P. infestans*-infizierten *S. tuberosum*-Zellen wie in infizierten *N. benthamiana*-Zellen detektierbar ist, könnte mit Hilfe der Kartoffel-Transformanten, die das Gen für ein mCherry-markiertes StIPP-Protein überexprimieren, sowie dem GFP-exprimierenden *P. infestans*-Isolat CRA 208m2 getestet werden.

Insgesamt stützen die Ergebnisse der kombinierten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen die Hypothese, dass StIPP an der EHM als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-PTase aktiv ist.

#### 4.3 *S. tuberosum*-Pflanzen mit veränderter *StIPP*-Expression zeigten keine Unterschiede hinsichtlich Suszeptibilität, Callose-Sekretion oder ROS-Produktion im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen

Die Ergebnisse der Untersuchung zur Expression des *StIPP*-Gens und subzellulären Lokalisation des zugehörigen Proteins weisen auf eine Beteiligung während der pflanzlichen Abwehr gegen

*P. infestans* hin, wobei StIPP verstärkt an der EHM infizierter Pflanzen lokalisiert. Daraus ergibt sich die Frage, welche Funktion die Aktivierung einer 5-Phosphatase und die damit verbundene lokale Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte bzw. PtdIns4P-Produktion während der Abwehr gegen *P. infestans* hat. Über die Funktion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns4P in der EHM von *P. infestans*-infizierten Zellen ist nichts bekannt. Eine Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte könnte dazu dienen, die Interaktionsstellen für Proteine, die direkt oder indirekt in die Regulation von Mechanismen der Abwehrantwort involviert sind, zu reduzieren oder durch Generierung von PtdIns4P zu erhöhen. Somit könnte StIPP eine Rolle in der Inhibierung PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängiger oder der Aktivierung PtdIns4P-abhängiger Abwehrprozesse spielen. Häufig weisen Pflanzen mit reduzierter Expression von Enzymen, die in die Biosynthese von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> involviert sind, phänotypische Veränderungen auf. So zeigen die Arabidopsis-Doppelmutanten, in denen die PI4P 5-Kinasen PIP5K1 und PIP5K2 ausgeschaltet sind, eine deutliche Wachstumsretardierung (Ischebeck *et al.*, 2013, Qin *et al.*, 2020). Nur eine der in dieser Arbeit untersuchten StIPP-HA exprimierenden Kartoffel-Pflanze zeigte eine verringerte Wuchshöhe (StIPP-HA E1) im Vergleich zu den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Diese Linie wies auch hinsichtlich der Calloseablagerungen, ROS-Produktion und Pathogenbiomasse die stärksten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollen auf, welche sich allerdings durch Untersuchungen weiterer Pflanzen mit veränderter StIPP-Expression nicht bestätigen ließen.

#### 4.3.1 Callose in *P. infestans*-infizierten StIPP-überexprimierenden Pflanzen

Teil der Abwehr ist die Veränderung der Zusammensetzung der Zellwand durch Papillenbildung an der Pathogen-Penetrationsstelle, vorrangig durch Ablagerung von Callose, (1,3)- $\beta$ -Glucan, aber auch anderer chemischer Komponenten, wie Pektin und Xyloglucan (Voigt, 2014). Die subzelluläre Lokalisation der StIPP um die penetrierenden Hyphen (Abb. 3.21), könnte auf eine Beteiligung bei der Papillenbildung hindeuten. Eschen-Lippold *et al.* (2012b) zeigten, dass eine Störung sekretorischer Prozesse durch Herunterregulieren der SYR1-Expression zu einer Reduktion callosehaltiger Papillen an den *P. infestans*-Penetrationsstellen in *S. tuberosum* führt. SYR1 vermittelt als membranständiges SNARE-Protein das selektive Andocken und die Fusion von Transportvesikeln an die Membran. In Säugetieren vermitteln hohe PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Konzentrationen das Clustern des SNARE-Proteins Syntaxin 1 in der PM (van den Bogaart *et al.*, 2011). Dem Prozess des SNARE-vermittelten Andockens und der Fusion von sekretorischen Vesikeln ist das Anbinden dieser an die Membran vorgelagert. Untersuchungen in Arabidopsis weisen darauf hin, dass PIs an der PM-Lokalisation des Vesikel-Tethering-Komplexes Exocyst beteiligt sind und so zur Sekretion pflanzlicher Metaboliten beitragen (Bloch *et al.*, 2016, Synek *et al.*, 2021). Die Störung des Exocyst-Komplexes durch Ausschalten der Gene, die für die verschiedenen Sec5- oder Exo70-Untereinheiten kodieren, führt ebenfalls zu geringerer Callose-Ablagerung in *N. benthamiana* nach Infektion mit *Pst* (Du *et al.*, 2015, Du *et al.*, 2018). Aus der Analyse *P. infestans*-infizierter StIPP-überexprimierender *S. tuberosum*-Pflanzen konnte kein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich der Rolle von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> für die Bildung callosehaltiger Papillen abgeleitet werden. Eine der untersuchten Linien zeigte zwar deutlich weniger Callose-Ablagerungen und callosehaltige Papillen im Vergleich

zur Leervektor-Kontrolllinie, jedoch bestätigte sich dieser Phänotyp nicht bei Untersuchung zweier weiterer Überexpressionslinien (Abb. 3.13). Diese scheinen hingegen etwas häufiger callosehaltige Papillen aufzuweisen. Eine Erklärung dafür könnte sich in den kürzlich entdeckten Unterschieden hinsichtlich der Lipid-Bindungspartner der Exocyst-Untereinheiten, die die PM-Bindung dieses Proteinkomplexes vermitteln, finden. So erfolgt in Hefe- und tierischen Zellen die Rekrutierung des Komplexes an die PM durch Interaktion der Exo70-Untereinheit mit PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> (He *et al.*, 2007, Liu *et al.*, 2007). In Pflanzen hingegen scheint die Rekrutierung des Exocyst-Komplexes an die PM mittels der Untereinheit Exo70A1 hauptsächlich über PtdIns4P und PA zu erfolgen (Synek *et al.*, 2021). So war in Arabidopsis *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten mit stark verringertem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalt keine Veränderung der Fluoreszenz-markierten Exocyst-Untereinheit EXO70A1 feststellbar, eine pharmakologische Inhibierung der PtdIns4P- bzw. PtdOH-Produktion hatte jedoch eine signifikant verringerten Lokalisation an der PM zur Folge (Synek *et al.*, 2021). In Anbetracht der Ergebnisse von Synek *et al.* (2021) könnte die Untersuchung der StIPP-RNAi-Pflanzen weiteren Aufschluss über eine mögliche Funktion der StIPP bei Bildung callosehaltiger Papillen liefern, da bei diesen Pflanzen hypothetisch geringere PtdIns4P-Level an der EHM zu einer Störung des Anbindens sekretorischer Vesikel führen könnten.

Interessanterweise passt die subzelluläre Lokalisation der StIPP an der Haustorien-Basis (etwa 33 % der beobachteten Fälle) zur kragen- bzw. ringförmigen Callose-Akkumulation, die Bozkurt *et al.* (2011, 2014) beobachteten. Sie stellten fest, dass etwa 50 % der Haustorien einen callosehaltigen Kragen aufweisen (Bozkurt *et al.*, 2011). Weiterhin merkten die Autoren an, dass *P. infestans*-Haustorien eher selten von callosehaltigen Papillen umgeben sind. Dies steht den Beobachtungen in dieser Arbeit bezüglich der Callose-Ablagerungen nicht zwangsläufig entgegen, da zu beachten ist, dass die Beobachtungen von Bozkurt *et al.* (2011) aus Experimenten resultieren, in denen ein anderes Pathosystem als in dieser Arbeit für die Untersuchung callosehaltiger Papillen verwendet wurde. Es ist möglich, dass sich die Bildung callosehaltiger Papillen in *N. benthamiana*-Blättern, die mit dem fluoreszenz-markierten *P. infestans* Isolat 88069td infiziert wurden, von der in *S. tuberosum*-Blättern unterscheidet, die mit dem Isolat CRA 208m2 infiziert wurden.

Eine Veränderung in der Ablagerung von Callose korreliert nicht zwangsläufig mit einer veränderten Suszeptibilität des Wirtes gegenüber dem Phytopathogen. So waren beispielsweise *N. benthamiana*-Pflanzen, in denen jeweils Gene für verschiedene Exocyst-Untereinheiten ausgeschaltet waren, nicht mehr oder weniger suszeptibel gegenüber Pst-Infektion, trotz geringerer Callose-Ablagerungen (Du *et al.*, 2018). In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen einer verringerten oder erhöhten *StIPP*-Expression auf das Wachstum von *P. infestans* nach Infektion von *S. tuberosum*-Blättern untersucht. Die *P. infestans*-Biomasse war weder auf den Kartoffel-Pflanzen mit erhöhter noch auf denen mit verringerter *StIPP*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen verändert (Abb. 3.14 und 3.15). Qin *et al.* (2020) beschreiben PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Suszeptibilitätsfaktor während der Interaktion von Arabidopsis mit den Phytopathogenen *E. cichoracearum* bzw. *A. candida*. In beiden Pathosystemen zeigt sich eine Akkumulation von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> an der EHM im Vergleich zur PM. Das Ausschalten der beiden PI4P 5-Kinasen PIP5K1 und PIP5K2, welche PtdIns4P zu PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> phosphorylieren, hatte eine verringerte Suszeptibilität der Arabidopsis-Pflanzen gegenüber beiden Pathogenen zur Folge (Qin *et al.*, 2020). Die zugrunde liegenden Mechanismen

sind nicht bekannt, jedoch erscheint die Wechselwirkung mit dem Aktin-Netzwerk wichtig zu sein. Die mikroskopischen Untersuchungen von Qin *et al.* (2020) zur PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Lokalisation an der EHM wiesen darauf hin, dass diese einerseits von Aktin abhängig ist, andererseits hatte das Ausschalten der beiden PI4P 5-Kinasen PIP5K1 und PIP5K2 einen negativen Effekt auf Ausbildung und Organisation des Aktin-Netzwerks in infizierten und nicht-infizierten Zellen. Eine regulatorische Funktion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auf das Aktin-Zytoskeletts ist in Hefe und tierischen Organismen gut untersucht. Dort interagiert es direkt und indirekt mit verschiedenen Aktin-Bindeproteinen (Senju *et al.*, 2017), wodurch es in die Bildung von PM-angrenzender Aktinfilament-Strukturen involviert ist. In Pollenschläuchen resultiert die Überexpression von *PIP5K2* in einer substantiellen Stabilisierung der Aktin-Dynamik (Fratini *et al.*, 2021). Verschiedene weitere Studien in Pflanzen mit missexprimierten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-produzierenden und -degradierenden Enzyme weisen dort ebenfalls auf einen Einfluss von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> auf das Aktin-Netzwerk hin (Zhong *et al.*, 2004, Zhong *et al.*, 2005, Dowd *et al.*, 2006, Ischebeck *et al.*, 2011). Eine Funktion von StIPP auf das Aktin-Netzwerk während der *P. infestans*-Infektion von *S. tuberosum* oder *N. benthamiana* wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Jedoch könnte eine mikroskopische Analyse der Aktinfilamente in transient StIPP-exprimierenden Tabak-Zellen während der *P. infestans*-Infektion Aufschluss über eine Interaktion der StIPP mit dem Aktin-Netzwerke geben.

### 4.3.2 ROS-Produktion nach PAMP-Behandlung

PIs sind nicht nur an der Regulation sekretorischer, sondern auch endozytotischer Prozessen beteiligt. So ist PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ein wichtiger Faktor der CME in Pflanzen (Ischebeck *et al.*, 2013, Menzel *et al.*, 2019). Kürzlich zeigten Menzel *et al.* (2019) eine Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte in Arabidopsis-Zellen nach flg22-Behandlung. Diese geringere Lipid-Verfügbarkeit führte zu einer verringerten Endozytose der NADPH-Oxidase RbohD, was mit einer erhöhten ROS-Produktion korrelierte (Menzel *et al.*, 2019). Die Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte resultiert aus der posttranslationalen Hemmung der katalytischen Aktivität der PI4P 5-Kinase PIP5K6. Die Hemmung von PIP5K6 nach flg22-Behandlung in Arabidopsis passt zur Pep-13-abhängigen Aktivierung der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifischen Phosphatase StIPP in Kartoffel, da beides zu einer Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Verfügbarkeit führen kann. Dies stimmt mit der von Qin *et al.* (2020) beschriebenen Funktion von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> als Suszeptibilitätsfaktor überein, der bei Infektion von den Wirtspflanzen möglicherweise in seiner Abundanz limitiert werden muss. Die in dieser Arbeit untersuchten *StIPP*-Überexpressionslinien zeigten hinsichtlich der ROS-Bildung nach Pep-13 bzw. flg22-Behandlung keinen Unterschied zu den Kontrollpflanzen. Zwei der *StIPP*-RNAi-Pflanzen zeigten teilweise eine vermehrte PAMP-abhängige Bildung von ROS im Vergleich zu den Kontrollen. In einer weiteren unabhängigen *StIPP*-RNAi-Linie hatte die verringerte StIPP-Verfügbarkeit jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die ROS-Bildung nach PAMP-Behandlung. Ob die Aktivität der 5-Phosphatase keinen Einfluss auf die ROS-Produktion hat oder eine verbliebene Expression (Abb. 3.11) und damit möglicherweise verbundene geringe Restaktivität innerhalb der RNAi-Pflanzen ausreicht, um eine normale Abwehrantwort zu bewirken, konnte nicht abschließend geklärt werden und bedarf weiterführender Experimente.

Es ist wichtig zu verstehen, dass die Verfügbarkeit und das dynamische Gleichgewicht von PIs nicht allein durch die Verfügbarkeit der jeweiligen Enzyme bestimmt wird, sondern der Kontrolle eines komplexen regulatorischen Netzwerks unterliegt und man erst beginnt, die Abhängigkeiten der einzelnen Komponenten zu verstehen (Heilmann and Heilmann, 2022). Die Komplexität beruht neben der gewebespezifischen Expression der beteiligten Elemente auch auf ihrer präzisen subzellulären Verteilung in Membrandomänen, sowie in ihrer posttranslationalen Regulation. Vor diesem Hintergrund ist denkbar, dass eine Überexpression von *StIPP* keinen lokalen und spezifischen Effekt auf das PI-System ergibt, weil zusätzliche Faktoren fehlen. Weiterhin wäre es möglich, dass eine redundante 5-Phosphatase in den *StIPP*-RNAi-Pflanzen die fehlende Aktivität der *StIPP* kompensiert. Ähnliches wurde für die beiden Einzelmutanten der PIP5-Kinasen PIP5K1 und PIP5K2 in *A. thaliana* beschrieben. Das Ausschalten der jeweiligen Kinase hat die erhöhte Expression der jeweils anderen Kinase zur Folge (Ischebeck *et al.*, 2013). Im Fall von *StIPP* wäre es denkbar, dass ausgleichend die Aktivität einer korrespondierenden Kinase reduziert wird, um die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Homöostase aufrecht zu erhalten. Analysen der Transkriptgehalte putativer PI-Kinasen und -Phosphatasen in den *S. tuberosum*-Pflanzen mit veränderter *StIPP*-Expression könnten dafür erste Antworten liefern. Interessanterweise zeigt sich in den RNA-Seq-Daten von Qin *et al.* (2020) eine Induktion der *At5Ptase11*, des Gens mit der höchsten Ähnlichkeit zu *StIPP*, fünf und sieben Tage nach Inokulation mit *E. cichoracearum*, wobei in der *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutante die Expression signifikant geringer ausfällt (Abb. 6.14 Anhang; Qin *et al.*, 2020). Die Autoren gehen nicht weiter auf dieses Phänomen ein und es fehlt an weiterer Evidenz, jedoch wäre ein transkriptionelles Feedback für die Regulation der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte denkbar.

Vorläufige Ergebnisse von Experimenten mit elizitierten Kartoffelzellkulturen lassen annehmen, dass die *StIPP*-Expression nach Pep-13-Behandlung einer Regulation durch die Aktivität der NADPH-Oxidasen unterliegt. Eine Hemmung der NADPH-Oxidase mittels Diphenyliodoniumchlorid scheint zu einer Erhöhung des *StIPP*-Transkriptgehaltes zu führen (Abb. 6. 15 Anhang). ROS selbst wirken als Signalmoleküle (Dubiel *et al.*, 2013, Kadota *et al.*, 2015). Pogany *et al.* (2009) diskutierten die aktivierte Arabidopsis NADPH-Oxidase RbohD als negativen Regulator für eine Reihe Pathogen-induzierter Gene, die in *Alternaria brassicicola*-infizierten *AtrbohD*-Mutanten signifikant stärker exprimiert waren als in infizierten WT-Pflanzen. Die Erhöhung der *StIPP*-Transkriptgehalte in NADPH-Oxidase-Inhibitor-behandelten Pflanzen könnte als Hinweis auf eine mögliche Regulation der *StIPP*-Expression durch NADPH-Oxidase-Aktivität gedeutet werden, wobei ein sekundärer Effekt der DPI-Behandlung auf andere Flavoenzyme nicht ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin ist denkbar, dass die Phosphatase *StIPP* auf PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Pools wirkt, die in den Transport anderer Membranproteine als den der NADPH-Oxidase involviert sind. Es wäre interessant zu sehen, ob die veränderte *StIPP*-Expression einen Einfluss auf die Abundanz der NADPH-Oxidase hat. Diese wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

PIs weisen vielfältige Funktionen innerhalb der Zelle auf. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> wirkt als zentraler Regulator vieler subzellulärer Komponenten und die regulatorische Funktion wird auch durch die Stärke der Expression beeinflusst, wie sich beispielsweise am Pollenschlauchwachstum zeigt (Ischebeck *et al.*,

2008, Ischebeck *et al.*, 2011). Es ist also gut vorstellbar, dass eine Veränderung des PI-Gleichgewichts pleiotrope Effekte nach sich ziehen kann, die Effekte auf die pflanzliche Abwehr kaschieren könnten.

Es wäre auch denkbar, dass die Veränderung der StIPP-Expressionsniveaus in den stabil transformierten Kartoffelpflanzen zu keiner ausreichenden Veränderung der Enzymproduktion führt. Der serologische Nachweis überexprimierten Proteins in stabil transformierten Kartoffelzellen war schwierig. So wurden zusätzlich zu den in dieser Arbeit untersuchten StIPP-überexprimierenden Pflanzen bereits in Vorarbeiten weitere Versuche vorgenommen, Kartoffelpflanzen mit vermehrter StIPP-Expression zu generieren (Diplomarbeit Ron Stauder). Der Nachweis der Proteine gelang häufig nur mit Hilfe sensitiver Chemilumineszenz-Tests. Diese Schwierigkeiten beim Proteinnachweis sind auch für andere Enzyme des PI-Stoffwechsels bekannt (Ischebeck *et al.*, 2013, Tejos *et al.*, 2014) und könnten darauf hinweisen, dass die StIPP-Überexpression und eine damit möglicherweise verbundene Störung der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Homöostase schädlich für die Pflanze ist.

Weiterhin erfolgte kein experimenteller *in vitro*-Nachweis der enzymatischen Funktionalität der für die Überexpression in Arabidopsis-Protoplasten und Kartoffel verwendeten StIPP-HA- und StIPP-mCherry-Fusionsproteine. Jedoch lassen die von Dr. Stenzel durchgeführten Experimente an Tabak-Pollenschläuchen annehmen, dass eine Funktionalität *in vivo* durchaus gegeben ist. Hier hätte die Untersuchung der erzeugten Kartoffelpflanzen mit veränderter StIPP-Expression hinsichtlich der Veränderung der PtdIns-Gehalte möglicherweise weitere Hinweise auf eine Funktionalität *in vivo* geben können.

#### 4.4 FLS2 akkumuliert bei Überexpression der *StIPP* in *A. thaliana*-Protoplasten

Um zu testen, ob StIPP die Verfügbarkeit PM-ständiger Proteine beeinflusst, wurden in Experimenten mit transient transformierten Arabidopsis-Protoplasten die Abundanz des FLS2-Rezeptors und des PIN1-Proteins getestet. Der FLS2-Rezeptor akkumuliert in Protoplasten, die das Gen für StIPP-HA exprimierten, jedoch nicht in denen, die das Kontrollprotein CFP-HA exprimierten (Abb. 3.25). Hingegen konnte keine Akkumulation für den Auxintransporter PIN1 detektiert werden (Abb. 3.26). Beide Proteine unterliegen einem Endozytose-vermitteltem Recyclingprozess (Dhonukshe *et al.*, 2007, Beck *et al.*, 2012, Ischebeck *et al.*, 2013, Mbengue *et al.*, 2016). PIN1 ist ein Mitglied einer Familie von Auxintransportern und spielt unter anderem eine Rolle in der Ausbildung der Blattform während der pflanzlichen Entwicklung, ist jedoch - soweit bekannt - nicht in die pflanzliche Abwehr involviert (Zhou and Luo, 2018). Der FLS2-Rezeptor vermittelt die Perzeption des bakteriellen Flagellins und ist damit ein entscheidender Faktor in der pflanzlichen Abwehr. Basierend auf diesen Ergebnissen kann man annehmen, dass StIPP an der Stabilisierung abwehrrelevanter Proteine wie Rezeptoren oder Co-Rezeptoren an der EHM beteiligt ist. So können Analysen der Abundanz weiterer PM-ständiger Rezeptoren und Proteine Aufschluss darüber geben, ob auch andere in die Abwehr-Antwort involvierte Komponenten an der Membran durch StIPP-Überexpression stabilisiert werden. Besonders interessant wäre an dieser Stelle die Untersuchung

der Abundanz der NADPH-Oxidase RbohD. Für dieses Protein zeigten Menzel *et al.* (2019) in Arabidopsis eine reduzierte PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängige Endozytose nach flg22-Behandlung. Die flg22-Behandlung führt zu einer MPK6-abhängigen Hemmung der transient exprimierten PI4P 5-Kinase PIP5K6 und damit zu einer reduzierten PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Bildung, was in einer reduzierten RbohD-Endozytose und vermehrter ROS-Bildung resultiert. Diese Daten legen eine Stabilisierung von RbohD an der PM nach flg22-Behandlung nahe, wenn die Bildung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und damit die CME von RbohD gehemmt sind, ähnlich wie in dieser Arbeit für FLS2 bei Expression von StIPP gezeigt wird (Abb. 3.25). Beide Untersuchungen erfolgten im Protoplastensystem, was zeigt, dass dieses System unter Verwendung geeigneter Kontrollen geeignet ist, um die dynamischen Folgen der Aktivität von PI-spezifischen Enzymen zu untersuchen. Dennoch ist zu beachten, dass aufgrund der Aufbereitung der Protoplasten vermehrt Vesikeltransportprozesse stattfinden, die der Regeneration der zuvor enzymatisch entfernten Zellwand dienen. Weiterhin kann bereits der Abbau der Zellwand die laterale Diffusion von PM-Proteinen und die Bildung von Nanodomänen stark beeinflussen (Jaillais and Ott, 2020). Ein unspezifischer Effekt auf die Abundanz verschiedener Proteine ist deshalb nicht auszuschließen. Weitere Untersuchungen unter Verwendung zusätzlicher Kontrollen, wie der Expression bekannter 5-PTasen oder StIPP-Varianten mit veränderter Enzymaktivität sind notwendig. Untersuchungen der Abundanz membranständiger Proteine in stabil transformierten Pflanzen könnten robustere Ergebnisse liefern. Dafür würden sich die *StIPP*-Überexpressionslinien anbieten, deren Analyse hinsichtlich des Gehalts membranständiger Proteine im Rahmen dieser Arbeit, aufgrund des Fehlens geeigneter Antikörper, nicht mehr möglich war.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf einen selektiven Mechanismus der Wirkung von PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> hin, da es in den *StIPP*-exprimierenden Protoplasten im Vergleich zu den CFP-exprimierenden Protoplasten zwar zur Stabilisierung des FLS2-Rezeptors kam, die Überexpression jedoch keinen Effekt auf den Gesamtgehalt an PIN1-Protein zeigte. Eine darauf aufbauende spannende Frage ist, welche Auswirkung die *StIPP*-Überexpression auf die Abundanz des FLS2-Rezeptors nach PAMP-Behandlung hat. Dieser wird nach Aktivierung durch flg22 endozytiert, (Mbengue *et al.*, 2016). Bozkurt *et al.* (2015) fanden mittels umfangreicher mikroskopischer Analysen heraus, dass es nach *P. infestans*-Infektion zu einer massiven Umleitung endozytotischer Prozesse zum Ort der Wirt-Pathogen-Interaktion in *N. benthamiana* kommt. Dies schließt unter anderem die Umleitung flg22-aktivierter FLS2-Rezeptoren sowie des Co-Rezeptors SERK3 hin zur EHM mit ein. Das Vorkommen des SERK3-Rezeptors in späten Endosomen und an der EHM erscheint plausibel, da dieser für Elicitor-vermittelte Abwehrantwort in Tabak- und Kartoffelblättern notwendig ist (Chaparro-Garcia *et al.*, 2011, Nietzschmann *et al.*, 2019). Es ist denkbar, dass eine PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-Phosphatase eine regulatorische Rolle während der Umleitung solcher Membrantransportprozesse während der *P. infestans*-Infektion hat. Dies schließt auch eine mögliche Funktion während sekretorischer Prozesse ein. Kürzlich fanden Wang *et al.* (2020) heraus, dass die Exocyst-Untereinheiten EXO70B1 and EXO70B2 an der Regulation des FLS2-Transports zur PM beteiligt sind. Arabidopsis-Pflanzen, in denen die Gene für diese Proteine, einzeln oder gleichzeitig, ausgeschaltet sind, akkumulierten weniger FLS2 an der PM im Vergleich zum WT. Hingegen war im Gesamtproteinextrakt kein Unterschied hinsichtlich der FLS2-Abundanz zwischen

EXO70B1- bzw. EXO70B2-Mutanten und Kontrollen feststellbar. Die Autoren schlussfolgern, dass EXO70B1 die FLS2-Akkumulation an der PM spezifisch reguliert und nicht das FLS2-Proteingleichgewicht beeinflusst. Zusammen mit der Hypothese von Synek *et al.* (2021), dass PtdIns4P zur Bindung von EXO70-Untereinheiten an die PM beiträgt, passen die Ergebnisse von Wang *et al.* (2020) zu den Ergebnissen der Protoplastenexperimente in dieser Arbeit. So könnte die beobachtete erhöhte FLS-Abundanz in den StIPP-HA-exprimierenden Arabidopsis-Protoplasten auch das Ergebnis einer erhöhten EXO70-abhängigen Rekrutierung FLS2-haltiger Vesikel aufgrund einer erhöhten Verfügbarkeit von PtdIns4P sein. Ob die in dieser Arbeit beobachtete erhöhte FLS2-Abundanz in StIPP-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle auch ein Effekt eines Einflusses der StIPP auf das FLS2-Proteingleichgewicht ist, geht aus den Ergebnissen dieser Arbeit nicht hervor; auch nicht an welcher subzellulären Membran der FLS2-Rezeptor akkumuliert. Eine Trennung der Membranfraktionen und anschließende Western Blot-Analyse ähnlich der Untersuchungen in Wang *et al.* (2020) könnten weiter Aufschluss darüber geben, ob es sich tatsächlich um eine Akkumulation in der PM oder in Endosomen handelt.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit die Vermutung zu, dass StIPP Membrantransport-Prozesse und so lokal die Stabilisierung von Proteinen beeinflusst, die in die pflanzliche Wirts-Pathogen-Interaktion involviert sind. Diese Stabilisierung umfasst ein komplexes mehrschichtiges Netzwerk voneinander abhängiger und sich gegenseitig beeinflussender Komponenten. Es ist somit möglich, dass eine Überexpression oder ein Herunterregulieren der Genexpression einer in der Abwehr involvierten Komponente nicht in einer veränderten Suszeptibilität resultiert.

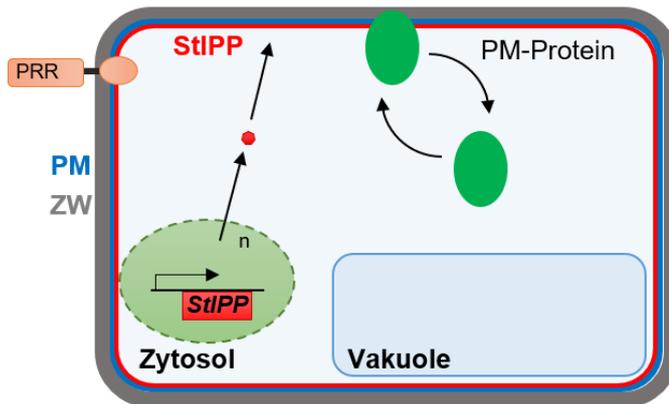
Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich nachfolgendes Modell zur möglichen Funktion der StIPP während der Immunantwort (Abb. 4.1). In nicht infizierten *S. tuberosum*-Zellen wird die PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-Phosphatase StIPP nur in geringen Mengen produziert. Diese 5-Phosphatase weist in diesen Fällen eine breite Lokalisation an der PM auf. Bei Infektion mit *P. infestans* wird die Verfügbarkeit von StIPP durch Induktion des codierenden Gens erhöht und StIPP lokalisiert vermehrt am Pathogeneintrittsort und speziell an der EHM. Dort dephosphoryliert es PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns4P, was vermutlich zu einer Verringerung der Endozytose EHM-lokalisierter Proteine führt und damit zur Abwehrantwort gegen *P. infestans* beiträgt. Dabei könnte es sich beispielsweise um nicht aktivierte PRRs handeln.

Da Haustorien auch ein Ort verstärkter Sekretion sind und kürzlich gezeigt wurde, dass vermutlich PtdIns4P in die Regulation des Exocyst-Komplexes involviert ist, kann eine Funktion von StIPP während sekretorischer Prozesse nicht ausgeschlossen werden.

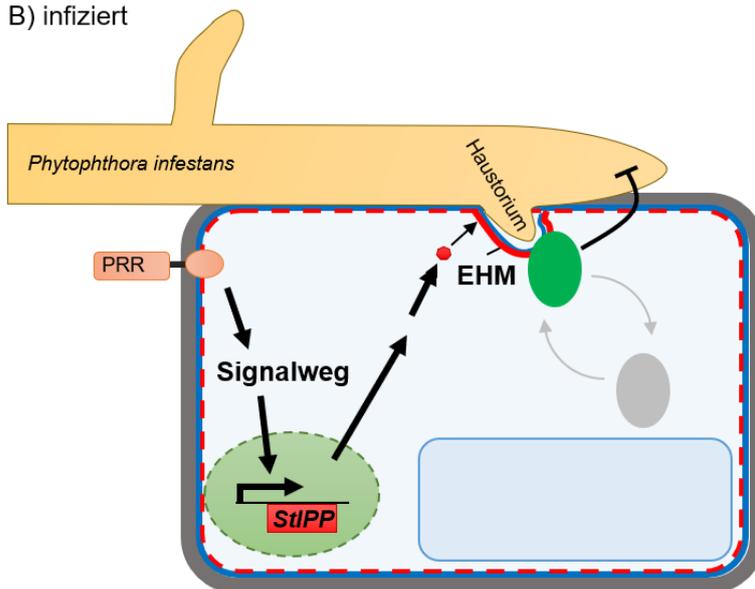
Weiterführende Untersuchungen zur Funktion der StIPP bzw. Reduktion der PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-Gehalte während der pflanzlichen Abwehrantwort gegen *P. infestans* sind notwendig. Eine weiterhin offene zentrale Frage ist, ob die Aktivität der StIPP endozytotische oder exozytotische Prozesse oder beide gleichermaßen beeinflusst. Analysen des Effekts pharmakologischer Substanzen, die solche Prozesse beeinflussen, könnten auf den festgestellten Einfluss der StIPP-Überexpression auf die

FLS2-Abundanz wertvolle Informationen liefern. Weitere wichtige Hinweise zur Funktion der StIPP könnten aus Co-Lokalisationsstudien mit weiteren Biomarkern resultieren. Dabei wäre die Identität des Kompartiments der beobachteten subzellulären StIPP-Akkumulation von besonderem Interesse.

A) nicht infiziert



B) infiziert



**Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der möglichen Funktion von StIPP während der Abwehrantwort**

A) In nicht infizierten Zellen wird das *StIPP*-Gen kaum oder nicht exprimiert. In den Zellen geringfügig vorhandenes Protein ist mit der Plasmamembran (PM) assoziiert. B) Nach PAMP-Behandlung oder *P. infestans*-Infektion wird die *StIPP*-Expression aktiviert, worauf das Enzym sowohl an der PM als auch um Penetrationsstellen lokalisiert. Dort könnte StIPP als PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifische 5-Phosphatase das PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängige Recycling PM-ständiger Proteine verringern. Das daraus folgende reduzierte Recycling (grauer ovaler Kreis) könnte zur transienten Stabilisierung dieser Proteine an der PM führen. Dickere Pfeile markieren verstärkte Prozesse. ZW – Zellwand, EHM - Extrahaustorielle Membran; N – Zellkern, PRR – Mustererkennungszepitor, roter Kreis - StIPP.

## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Rolle eines Pep-13-induzierten Gens aus Kartoffelpflanzen bei der durch Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP)-induzierten Abwehrantwort auf *Phytophthora infestans*-Infektion untersucht. Dieses Gen weist Ähnlichkeit zu bekannten 5-Phosphatase-codierenden Genen aus Arabidopsis auf und trägt aus diesem Grund die Bezeichnung *StIPP* (*Solanum tuberosum* Inositolpolyphosphat-Phosphatase). Die Expression dieses Gens wird weiterhin durch *P. infestans*-Behandlung und Verwundung induziert. Im Rahmen der Arbeit wird gezeigt, dass das *StIPP*-Gen für eine Phosphatidinositol-5-Phosphatase kodiert, die *in vitro* spezifisch PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> zu PtdIns4P dephosphoryliert. Dieser *in vitro*-Befund wird durch *in vivo*-Ergebnisse von Untersuchungen in *N. tabacum*-Pollenschläuchen gestützt. Das getestete rekombinante *StIPP*-Protein zeigte unter den gewählten Bedingungen *in vitro* keine enzymatische Aktivität gegenüber weiteren getesteten Phosphoinositiden oder gegen lösliche Inositolphosphate. PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> und PtdIns4P sind an der Regulation exozytischer und endozytischer Vorgänge an der Plasmamembran pflanzlicher und tierischer Organismen beteiligt. Kartoffelpflanzen mit erhöhter *StIPP*-Expression wiesen keine eindeutige Veränderung hinsichtlich der Bildung callosehaltiger Papillen nach *P. infestans*-Infektion oder der ROS-Bildung nach PAMP-Behandlung im Vergleich zu Kontrollpflanzen auf. Eine Reduktion der *StIPP*-Expression (*StIPP*-RNAi) korrelierte nur teilweise mit erhöhter ROS-Produktion nach PAMP-Behandlung verglichen mit den Kontrollen. Die *P. infestans*-Biomasse unterschied sich in infizierten *StIPP*-RNAi- oder *StIPP*-überexprimierenden Pflanzen nicht von der Pathogenbiomasse in infizierten Kontrollpflanzen. Eine Veränderung der *StIPP*-Verfügbarkeit hat demnach keine unmittelbaren Auswirkungen auf die Suszeptibilität von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans*.

Transient in *N. benthamiana*-Epidermiszellen exprimiertes *StIPP*-GFP-Protein lokalisierte in nicht infizierten Zellen an der Plasmamembran und in *P. infestans*-infizierten Zellen zusätzlich an der extrahaustoriellen Membran. Dort wies es Co-Lokalisation mit dem fluoreszenzmarkierten *P. infestans*-Effektorprotein AvrBlb2 und einem PtdIns4P-spezifischen Markerprotein (FAPP1) auf. In Co-Lokalisations-Analysen von *StIPP*-GFP mit einem PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-spezifischen Markerprotein (PH), war für dieses Markerprotein eine verringerte Intensität an der EHM zu verzeichnen.

Die Expression von *StIPP* in *A. thaliana*-Protoplasten führte im Vergleich zu exprimierten Kontrollproteinen zu einer erhöhten Abundanz der PAMP-Rezeptorkinase Flagellin-sensitiv 2. Die Abundanz des Auxintransporters PIN1, einem Protein ohne Bezug zur pflanzlichen Abwehr, war hingegen nicht erhöht. Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine Funktion zur Verringerung PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>-abhängiger oder Verstärkung PtdIns4P-abhängiger Prozesse während der Pathogen-Wirts-Interaktion.

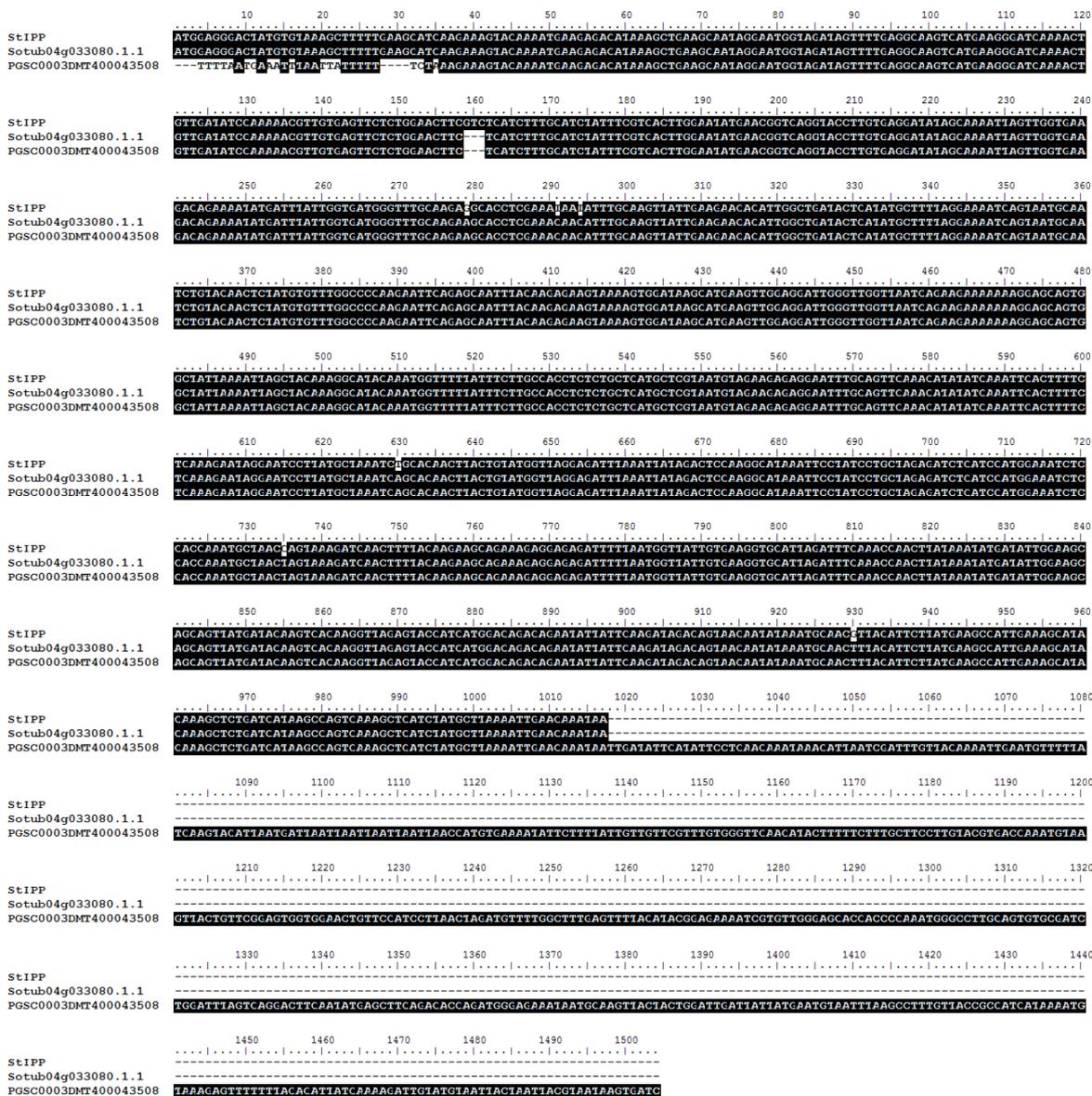
## 6 Anhang

### StIPP cDNA-Sequenz

ATGGAGGGACTATGTGTAAAGCTTTTTGAAGCATCAAGAAAGTACAAAAT  
GAAGAGACATAAAGCTGAAGCAATAGGAATGGTAGATAGTTTTGAGGCAA  
GTCATGAAGGGATCAAAACTGTTGATATCCAAAAACGTTGTGAGTTCCTC  
GGAACTTCGTCTCATCTTTGCATCTATTTTCGTCACTTGGAATATGAACGG  
TCAGGTACCTTGTGAGGATATAGCAAAATTAGTTGGTGAAGACAGAAAAT  
ATGATTTATTGGTGATGGGTTTGCAAGAGGCACCTCGAAAATAATATTTGC  
AAGTTATTGAAGAACACATTGGCTGATACTCATATGCTTTTAGGAAAATC  
AGTAATGCAATCTGTACAACCTATGTGTTGGCCCCAAGAATTCAGAGC  
AATTTACAAGAGAAGTAAAAGTGGATAAGCATGAAGTTGGAGGATTGGGT  
TGGTTAATCAGAAGAAAAAAGGAGCAGTGGCTATTAATAATAGCTACAA  
AGGCATACAAATGGTTTTTATTTCTTGCCACCTCTCTGCTCATGCTCGTA  
ATGTAGAAGAGAGGAATTTGCAGTTCAAACATATATCAAATTCACTTTTTC  
TCAAAGAATAGGAATCCTTATGCTAAATCTGCACAACCTTACTGTATGGTT  
AGGAGATTTAAATTTATAGACTCCAAGGCATAAATTCCTATCCTGCTAGAG  
ATCTCATCCATGGAAAATCTCCACCAAAATGCTAACCCAGTAAAGATCAACTT  
TTACAAGAAGCAGAAAAGAGGAGAGATTTTTAATGGTTATTGTGAAGGTGC  
ATTAGATTTCAAACCAACTTATAAATATGATATTGGAAGCAGCAGTTATG  
ATACAAGTCACAAGGTTAGAGTACCATCATGGACAGACAGAATATTATTC  
AAGATAGACAGTAACAATATAAATGCAACGTTACATTCTTATGAAGCCAT  
TGAAAGCATACAAAGCTCTGATCATAAGCCAGTCAAAGCTCATCTATGCT  
TAAAATTGAACAAATAA

#### Abbildung 6.1: Nukleotidsequenz der *StIPP*-cDNA

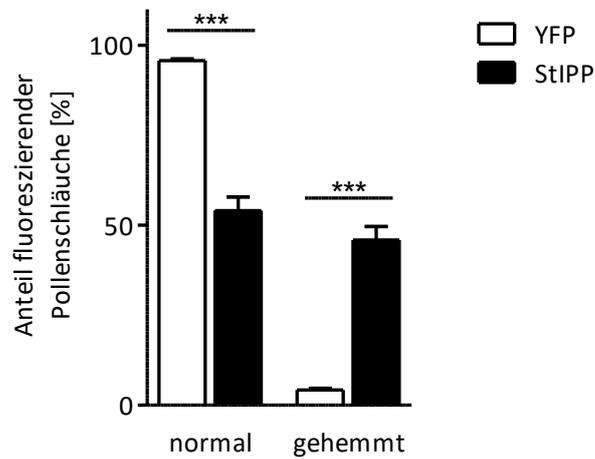
Die unterstrichene Sequenz markiert das verwendete *StIPP*-RNAi-Fragment.



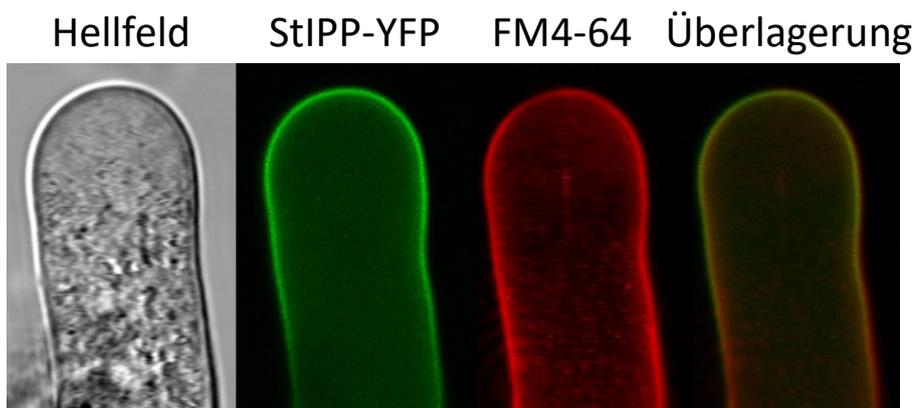
**Abbildung 6.2: Vergleich der Nukleotidsequenzen der klonierten *StIPP*-cDNA gegen die homologe Sequenz aus *S. tuberosum* Phureja**

Für die Analyse wurden die klonierte *StIPP*-cDNA mit der Transkriptsequenz PGSC0003DMT400043508 entsprechende der Annotation des PGSC-Genmodells bzw. mit dem Transkript zum Sotub04g033080.1.1-Gen entsprechende der Annotation des ITAG-Genmodells aus der SPUD-Datenbank verwendet. Clustal W Alignment mittels Bioedit-Software, Bootstrap 1000, Gap penalty: Voreinstellungen. Identische Nukleotide wurden schwarz unterlegt. Der Schwellenwert für die Schattierung betrug 66%.

A



B

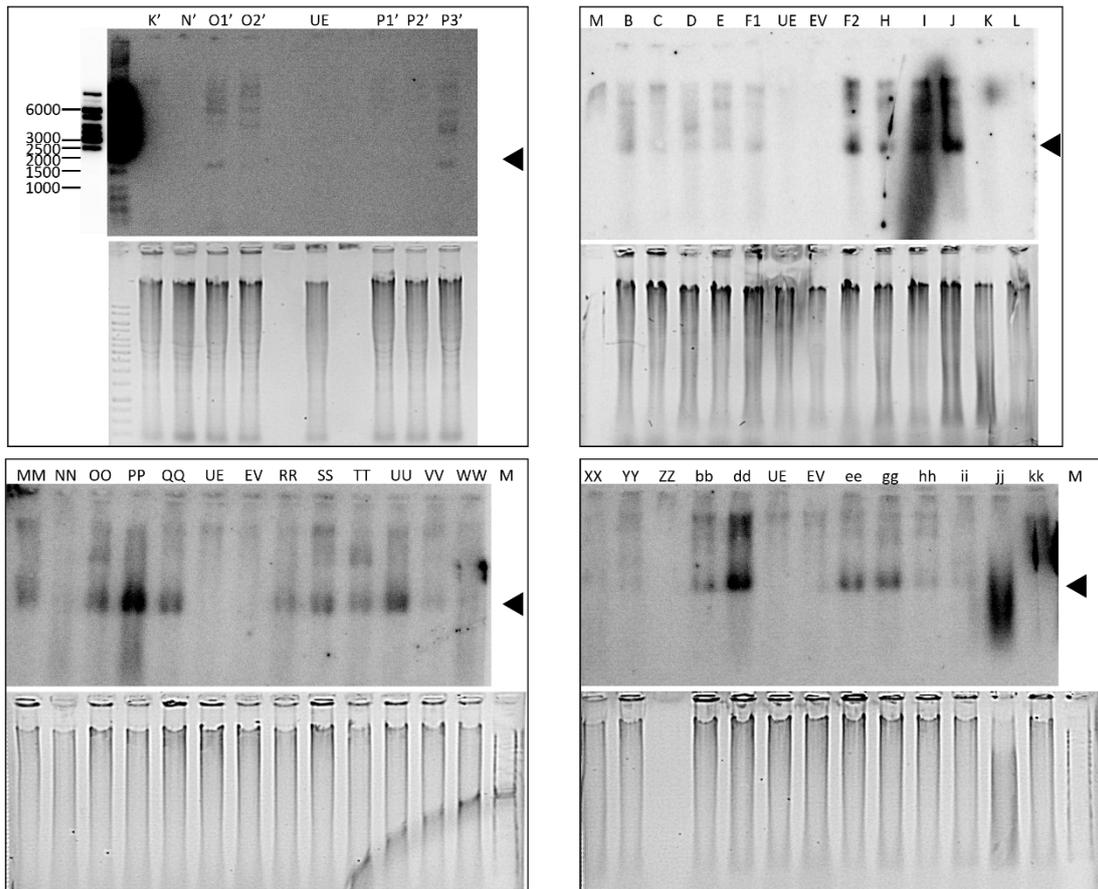


**Abbildung 6.3: Transiente Expression in *Nicotiana tabacum*-Pollenschläuchen**

A) *Nicotiana tabacum* Pollenkörner wurden mittels Beschusses mit DNA-bedeckten Goldpartikeln transient transformiert. Somit sollte StIPP-YFP-Konstrukt unter Kontrolle des Lat52-Promotors überexprimiert werden. Als Kontrolle diente Lat52-YFP. Nach der Transformation wurden die Pollen auf normale bzw. gehemmte Pollenschlauchentwicklung überprüft. Dargestellt sind MW und SEM aus mindestens vier Experimenten mit insgesamt mehr als 450 ausgezählten Pollenschläuchen. Statistischer Test: Student's T-Test, verglichen wurden YFP-exprimierende Pollenschläuche mit StIPP-YFP-exprimierenden Schläuchen; \*\*\*  $p \leq 0,001$ . B) Repräsentatives Bild der subzellulären Lokalisation von StIPP-YFP in Tabak-Pollenschläuchen. StIPP-YFP lokalisiert im Cytosol sowie an der Plasmamembran. Dort zeigt sich eine Co-Lokalisation mit dem Membranfarbstoff FM4-64. Alle Experimente mit Tabakpollenschläuchen wurden durch Dr. Irene Stenzel durchgeführt.

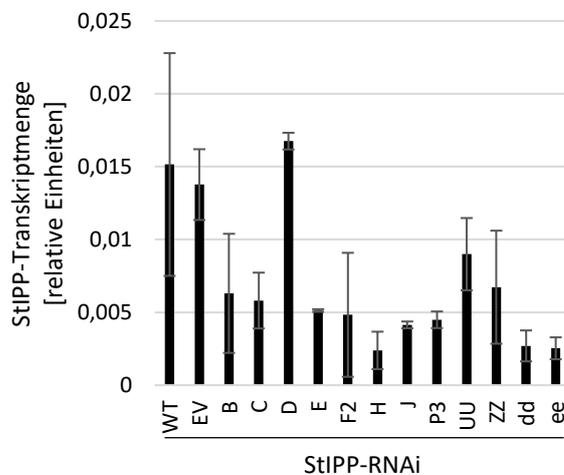
	Motiv I	Motiv II
StIPP	PYAKSAQLTVWLGDLNYRLQ	SYDTSH---KVRVPSWTDRIIFKI
Sotub04g033080.1.1	PYAKSAQLTVWLGDLNYRLQ	SYDTSH---KVRVPSWTDRIIFKI
Sotub04g020950.1.1	EKITDHQRAIWLGDLNYRVS	GETTKS--KKKRRTPAWCDRILWRG
Sotub12g028990.1.1	PDLAEADMVIFCGDLNYRLF	CYDSGE---KKRIPAWCDRVLYRD
Sotub12g014500.1.1	PDLAEADMVIFFGDLNYRLF	CYDSGE---KKRIPAWCDRVLYRD
Sotub08g010430.1.1	PELGEADLVIFTGDLNYRLF	CYDSGE---KKRIPAWCDRVLYRD
Sotub02g035430.1.1	LTILGHDQIFWFGDLNYRLY	GGLPSR-AGEKQRTPAWCDRILWHG
Sotub01g005480.1.1	TKILDHDHVIFLGDLYNRIS	GRSDVK-KGEKKRSPAWCDRIIWYG
Sotub11g009910.1.1	PELSEADMVVFLGDLYNRID	CYDSGE---KKRIPAWCDRIIYRD
Sotub08g022600.1.1	QTIPSHDQIFWFGDLNYRIS	GEIM-R-EGEKKRSPAWCDRILWLG
Sotub04g026270.1.1	KSIHDHERI IWLGDLYNRIN	GEDP-K-AG--RRNPAWCDRILSFG
Sotub09g023710.1.1	ENILEHDRVIWLGDLYNRIA	GDDMHP--KEKRRTPAWCDRILWHG
Sotub08g006160.1.1	QTIPSHDQIFWFGDLNYRIN	GESP-R-EGEKKRSPAWCDRILWLG
Sotub06g016780.1.1	ETILEHDRVIWLGDLYNRIA	VDDMQP--KDKRRTPAWCDRILWHG
Sotub09g020270.1.1	QTILEHDRI IWLGDLYNRIA	GEDTHP--KEKRRTPAWCDRIIWYG
Sotub03g022670.1.1	RKILQHDRV IWLGDLYNRIC	GCNNQKGKKEKNRTPAWCDRIIWFG

**Abbildung 6.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der putative 5-phosphatasen aus *S. tuberosum* Phureja**  
Für die Analyse wurden die Bezeichnung der annotierten Kartoffelgene des ITAG (International Tomato Annotation Group)-Genmodells verwendet. Das Clustal W Alignment erfolgte mittels der Bioedit Software, Bootstrap 1000, *gap penalty*: Voreinstellungen. Identische Aminosäuren wurden schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren grau unterlegt. Der Schwellenwert für die Schattierung betrug 75%.



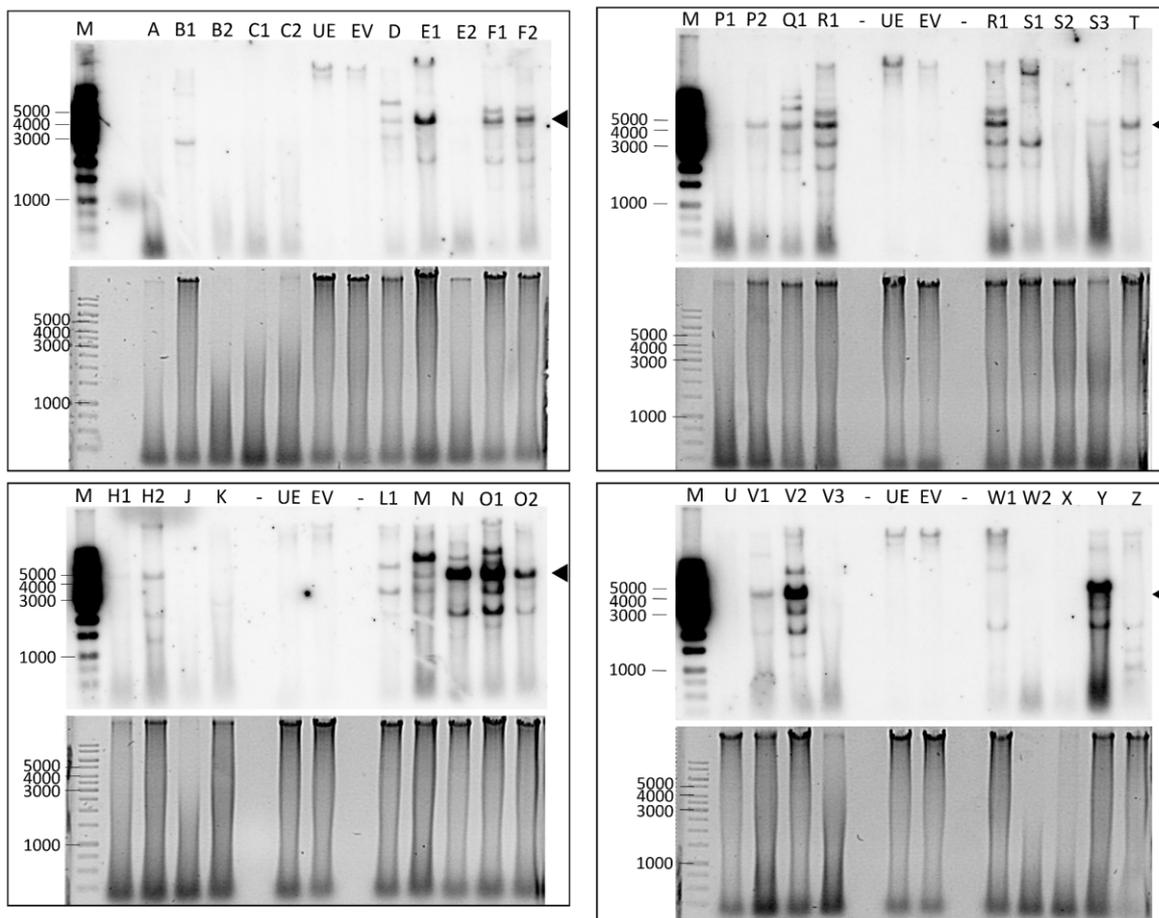
**Abbildung 6.5: Nachweis der Integration des *StIPP*-RNAi-Konstruktes (Beispielblots)**

Genomische DNA aus transformierten Kartoffelpflanzen wurde mittels des Restriktionsenzym *Bam*HI verdaut, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran gebロットet. Die Detektion des Inserts erfolgte mit einem <sup>32</sup>P-ATP-markiertem *Bam*HI-*pHG12-StIPP*-RNAi-Fragment. Die erwartete Fragmentgröße betrug etwa 1800 bp. Von 73 regenerierten Pflanzen wurden 66 untersucht. Bei 33 Pflanzen konnte ein Signal für ein mögliches Insert detektiert werden.



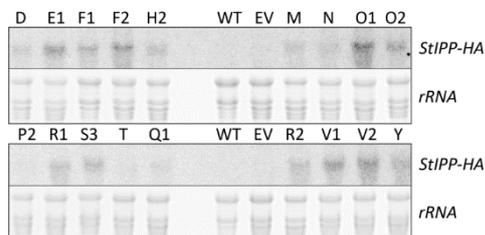
**Abbildung 6.6: Kinetik der relativen Expression des *StIPP*-Gens nach Pep-13-Infiltration von *StIPP*-RNAi-*S. tuberosum*-Pflanzen**

Die qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die 19 h nach Pep-13-Infiltration aus Blattscheiben von Kontroll- (WT, EV) und transgenen Kartoffelpflanzen mit reduzierter *StIPP*-Expression (*StIPP*-RNAi) isoliert wurde. EV - Leervektorlinie *pHG8 j3*. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1α*. 1 Exp. n ≥ 2, dargestellt sind MW und StAbw.



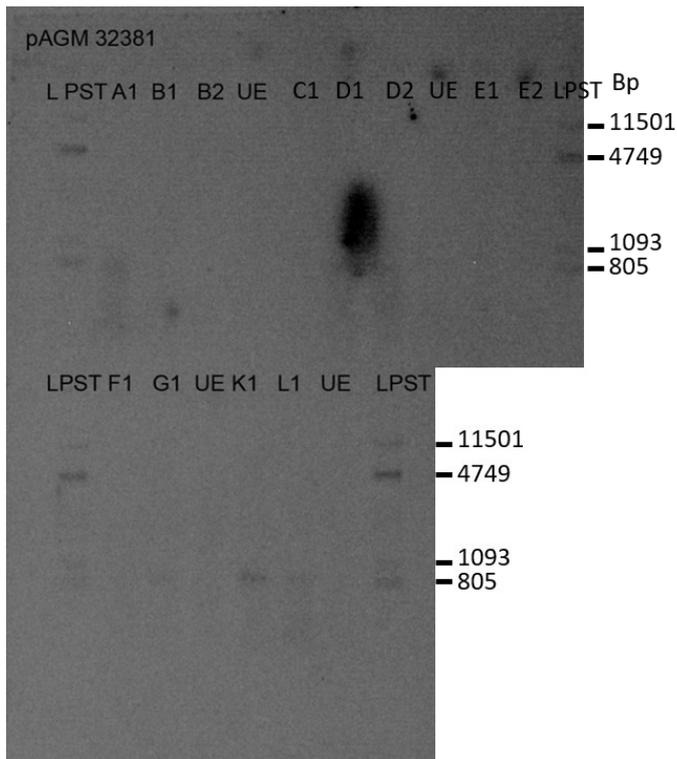
**Abbildung 6.7: Nachweis der Integration des 35S-*StIPP*-HA-Konstruktes**

Genomische DNA aus transformierten Kartoffelpflanzen wurde mittels des Restriktionsenzym *Pst*I verdaut, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion des Inserts erfolgte mit einem  $^{32}$ P-ATP-markiertem *Pst*I-*pGWB14-StIPP\_oS*-Fragment. Die erwartete Fragmentgröße betrug etwa 4200 bp. Von 37 regenerierten Pflanzen von 24 unabhängigen Kallie, trugen 14 unabhängige Linien ein Insert bei korrekter Laufhöhe.



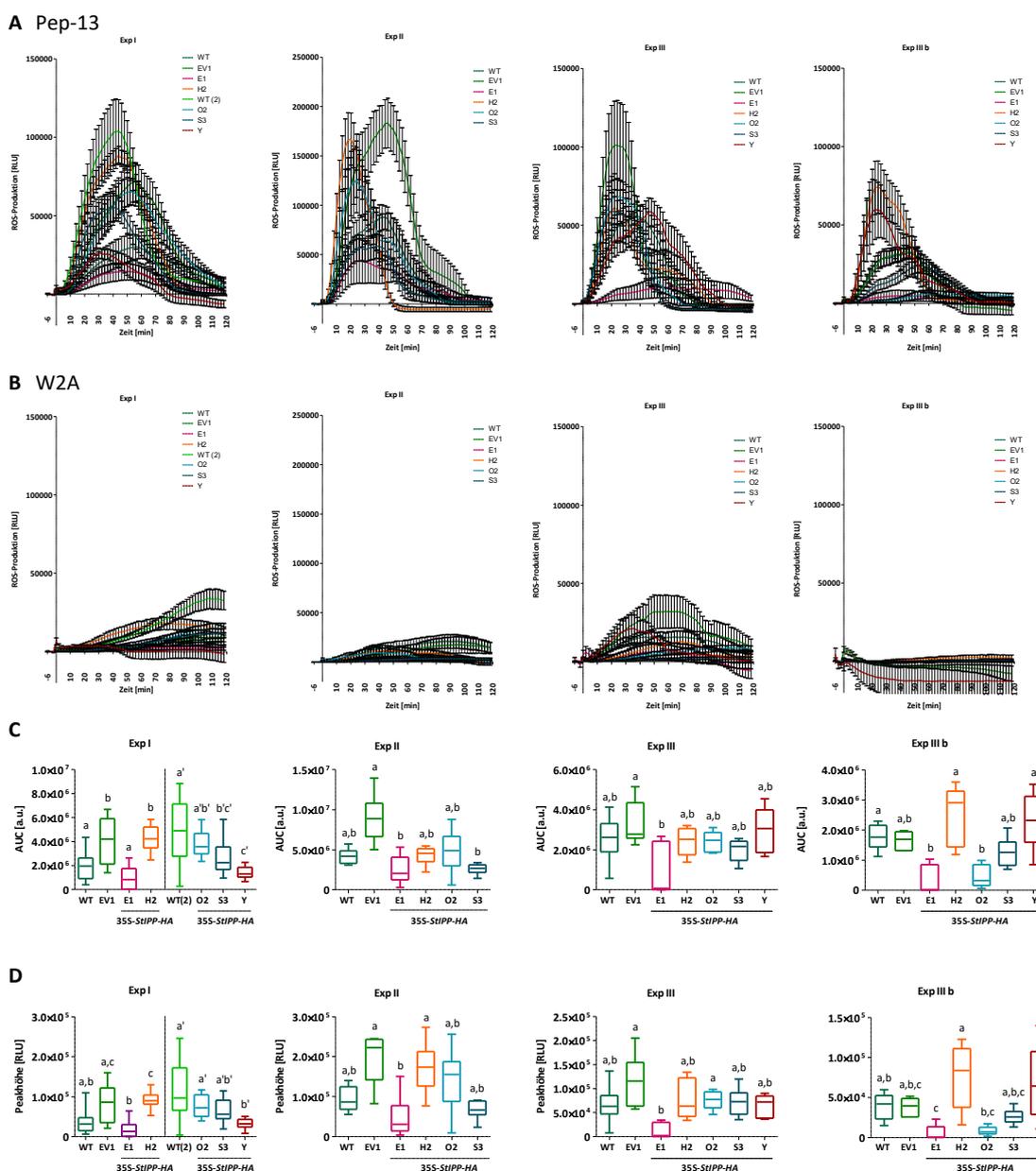
**Abbildung 6.8: Nachweis des Transkriptes des 35S-*StIPP*-HA-Konstruktes**

RNA aus transformierten Kartoffelpflanzen wurde mittels der TRIZOL-Methode isoliert, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion des Inserts erfolgte mit einem  $^{32}$ P-ATP-markiertem *Pst*I-*pGWB14-StIPP\_oS*-Fragment. Von 37 regenerierten Pflanzen von 24 unabhängigen Kallie, trugen 14 unabhängige Linien ein Insert bei korrekter Laufhöhe. Von 18 getesteten Linien wiesen 17 Linien einen *StIPP*-HA-Transkriptgehalt auf. In den Spuren des Wildtyps und Leervektorlinie, sowie der der *StIPP*-Überexpressionslinie P2 war kein Transkript detektierbar.



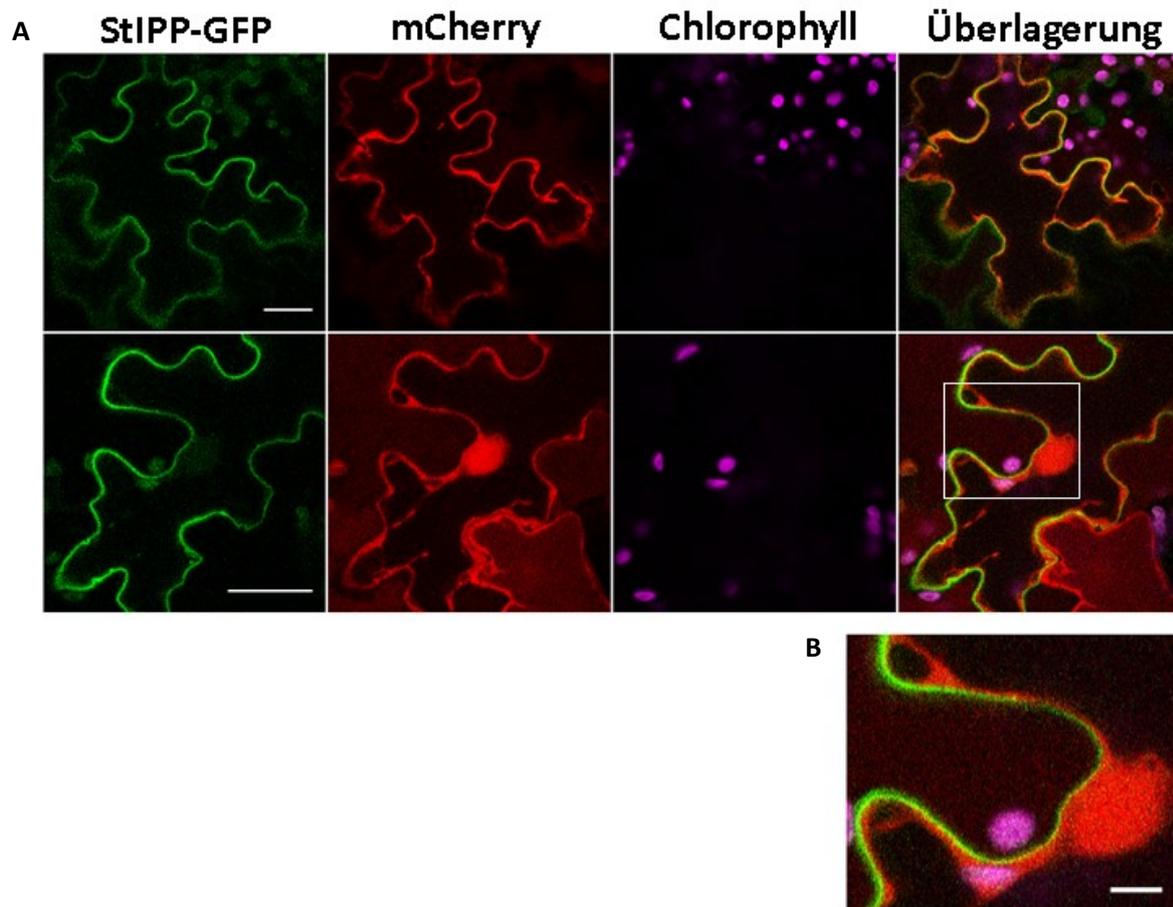
**Abbildung 6.9: Nachweis der Integration des 35S-StIPP-mCherry-Konstruktes**

Genomische DNA aus transformierten Kartoffelpflanzen wurde mittels des Restriktionsenzym *Nco*I verdaut, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion des Inserts erfolgte mit einem <sup>32</sup>P-ATP-markiertem *Nco*I-pAGM32381-StIPP-mCherry-Fragment. Die erwartete Fragmentgröße betrug 889 bp. Von 12 regenerierten Pflanzen von 9 unabhängigen Kallien, trugen 4 unabhängige Linien ein Insert bei korrekter Laufhöhe von über 800 Basenpaaren: die Linien A1, G1, K1, L1.



**Abbildung 6.10: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in *StIPP*-HA-Überexpressions-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung**

ROS-Produktion wurde in 3 Wochen alten stabilen *S. tuberosum*-Transformanten (unabhängige *StIPP*-HA-Linien E1, H2, O2, S3, Y; Leervektorkontrolllinien pGTV B2 (EV1)) sowie WT-Pflanzen nach Behandlung mit 5 nM Pep-13 (A) oder 5 nM W2A (B) gemessen. Die Bestimmung der ROS-Produktion nach Pep-13- (A) oder W2A- (B) Behandlung erfolgte im zeitlichen Verlauf von 118 min und ist in relative Lichteinheiten (*relative light units* – RLU) dargestellt. Die Normalisierung erfolgte anhand der gemittelten gebildeten ROS-Produktion vor Behandlung durch Subtraktion von den einzelnen Werten nach Elizitierung. Gezeigt sind die Mittelwerte und SEM aus 12 Blattscheiben von einer Pflanze (Exp. I) bzw. 6 Blattscheiben (Exp. II und III und III b) je Genotyp für Pep-13 und für W2A. C) Die Gesamt-ROS-Akkumulation in Blattscheiben nach Pep-13 wurde durch Integration der Flächen unter den Kurven aus (A) berechnet. AUC - *area under the curve*, peak-Fläche; a. u. - *arbitrary units*, willkürliche Einheiten. D) Gezeigt ist die maximale transiente ROS-Produktion nach fig22-Behandlung. Die Box-Plots zeigen den Median sowie die 25 % und 75 %-Perzentilen (Boxen) als auch die 5 % und 95 %-Perzentilen (Antennen). Die Werte ergeben sich aus 12 Blattscheiben (Exp. I) bzw. 6 Blattscheiben (Exp. II und III) je Genotyp. Die Statistischen Tests auf Signifikanz erfolgten mittels one-way-ANOVA ( $P \leq 0,05$ ) und Newman-Keuls-Post-Hoc-Test bei normalverteilten Werten (Exp. I Abb. C) bzw. mittels

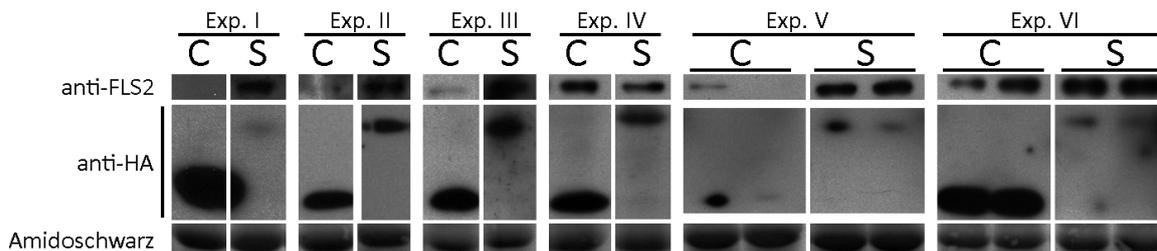


**Abbildung 6.11: Transiente StIPP-GFP-Transformation in Kartoffel**

A) StIPP-GFP und freies mCherry wurden mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation transient in *S. tuberosum*-Pflanzen unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors exprimiert. Maßbalken = 50 nm.  
 B) Ausschnitt aus (A). Maßbalken = 10 nm.

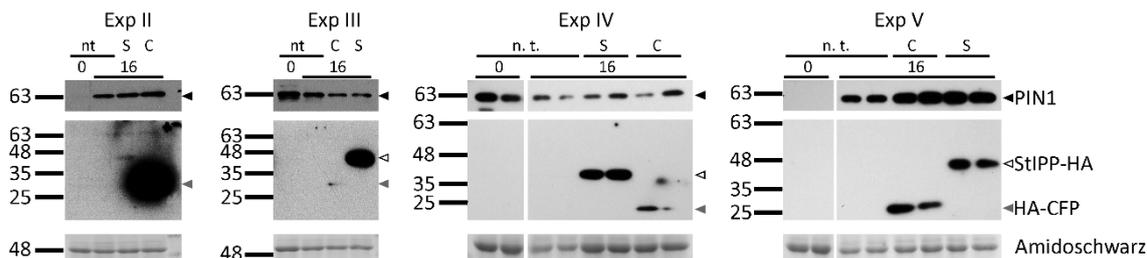
**noch Abb. 6.10:**

Kruskal-Wallis-Test ( $P \leq 0,05$ ) mit Dunns-Post-Hoc-Test (übrige Abb.) bei nicht-normalverteilten Werten. Boxen mit den gleichen Buchstaben unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.



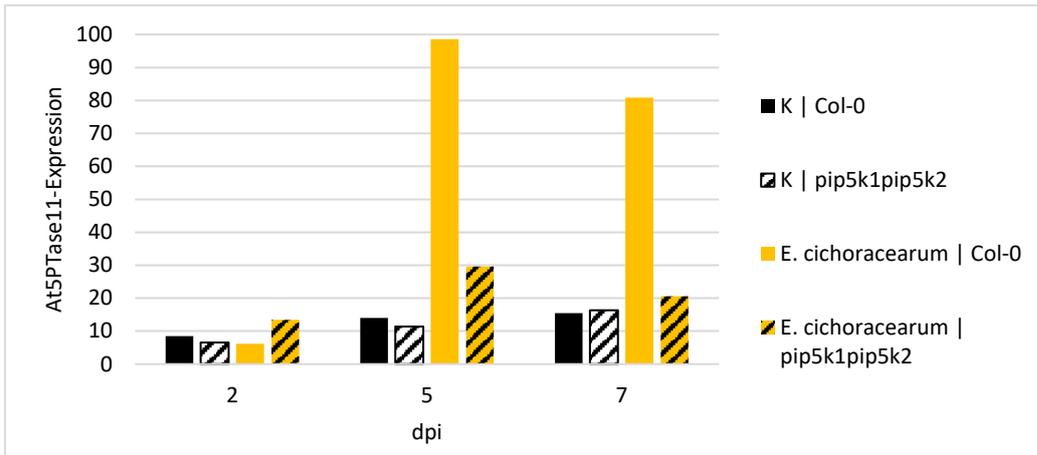
**Abbildung 6.12: Überexpression der *StIPP* in *A. thaliana*-Protoplasten resultiert in einer erhöhten FLS2-Menge**

Ein *StIPP*-HA-bzw. HA-CFP-Fusionskonstrukt wurde unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors transient in Protoplasten von *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen exprimiert. 16 Stunden nach Transformation wurden der Gesamtproteingehalt durch SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot hinsichtlich der FLS2-Abundanz mittels  $\alpha$ -FLS2-Antikörper analysiert. Der Nachweis der Expression der Fusionskonstrukte erfolgte im Anschluss mittels  $\alpha$ -HA-Antikörper auf derselben Membran. Dafür wurde die Membran zur Entfernung des FLS2-Antikörpers zuvor gestrippt. Ähnliche Ergebnisse wurden in 5 von 6 Experimenten erhalten. Die Amidoschwarz-Färbung zeigt die große Untereinheit der RuBisCo und diente zur Kontrolle für gleichmäßige Beladung.



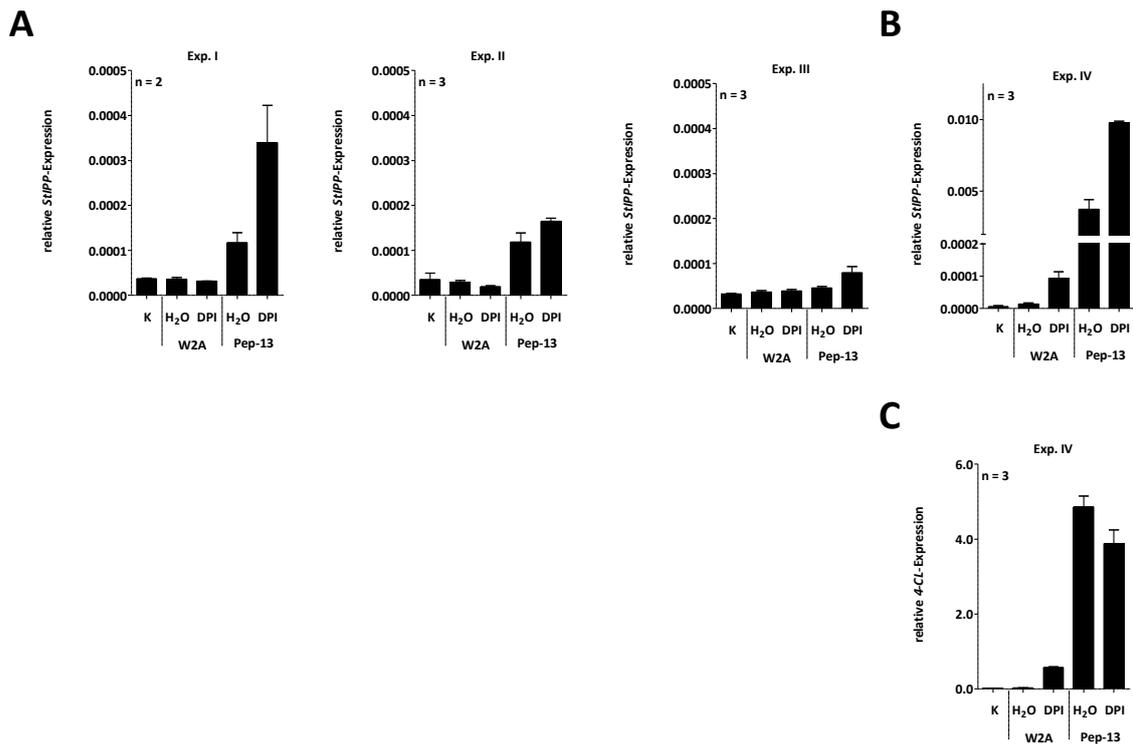
**Abbildung 6.13: Überexpression der *StIPP* in *A. thaliana*-Protoplasten resultiert in keiner veränderten PIN1-Menge**

Ein *StIPP*-HA-bzw. HA-CFP-Fusionskonstrukt wurde unter Kontrolle des *CaMV* 35S-Promotors transient in Protoplasten von *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen exprimiert. 16 Stunden nach Transformation wurden der Gesamtproteingehalt durch SDS-PAGE und nachfolgendem Immunoblot hinsichtlich der PIN1-Abundanz mittels  $\alpha$ -PIN1-Antikörper analysiert. Der Nachweis der Expression der Fusionskonstrukte erfolgte zuvor mittels  $\alpha$ -HA-Antikörper auf derselben Membran. Ähnliche Ergebnisse wurden in 5 von 5 Experimenten erhalten. Die Amidoschwarz-Färbung zeigt die große Untereinheit der RuBisCo und diente zur Kontrolle für gleichmäßige Beladung.



**Abbildung 6.14:** Der Transkriptgehalt von *At5PTase11* nach *E. cichoracearum*-Inokulation ist in *pip5k1 pip5k2*-Doppelmutanten im Vergleich zum Col-0-WT reduziert

Gezeigt ist der normalisierte Transkriptgehalt von *At5PTase11* im *A. thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) und in Col-0-Pflanzen, in denen die Gene PIP5K1 und PIP5K2 ausgeschaltet sind (*pip5k1\_pip5k2*), zwei, fünf und sieben Tage nach Inokulation (dpi) mit *E. cichoracearum* oder Kontrollbehandlung (K). Der *5PTase11*-Transkriptgehalt fünf und sieben Tage nach *E. cichoracearum*-Inokulation ist in den Doppelmutanten im Vergleich zum WT signifikant um etwa 70 % respektive 75 % reduziert. Die Daten stammen aus der Veröffentlichung von Qin *et al.* (2020).



**Abbildung 6.15:** Relative Gen-Expression nach Pep-13- und W2A-Infiltration in Wildtypkartoffelzellkulturzellen in Abhängigkeit von der NADPH-Aktivität.

Die qRT-PCR wurde mit RNA durchgeführt, die aus Zellkultur von Wildtyp-Kartoffelpflanzen isoliert wurde, welche entweder unbehandelt waren (K) oder mit 10 nM Pep-13 bzw. W2A elizitiert wurden. Um die Abhängigkeit von der NADPH-Oxidase zu bestimmen wurden die Zellen 5 min vor Elizitierung mit 10  $\mu$ M Diphenyliodoniumchlorid (DPI) bzw. dem entsprechenden Volumen H<sub>2</sub>O behandelt. Die Ernte erfolgte 4 h nach Elizitierung. A) *StIPP*-Expression in WT-Zellkulturlinie A. B) *StIPP*-Expression bzw. (C) *4-CL*-Expression in WT-Kartoffelzellkulturlinie B. Die Normalisierung erfolgte anhand des Referenzgens *EF1 $\alpha$* . Die Anzahl der Replikate je Experiment ist in der jeweiligen Abb. indiziert, dargestellt sind MW und SEM.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Membrantransport während der pflanzlichen Immunantwort. ....	5
Abbildung 1.2: Schemata der Interaktion zwischen <i>P. infestans</i> und Wirtspflanze .....	8
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Biosynthese und Degradation von Phosphatidylinositolen.....	12
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung bekannter pflanzlicher Phosphatidylinositolphosphatase-Familien.....	14
Abbildung 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen der StIPP gegen die Sequenz aus <i>S. tuberosum</i> Phureja .....	35
Abbildung 3.2: Putative Gen- und Proteinorganisation der StIPP .....	35
Abbildung 3.3: Kinetik der relativen Transkriptgehalte des StIPP-Gens nach Pep-13- und W2A-Infiltration von <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen .....	37
Abbildung 3.4: Kinetik der relativen Expression des <i>StIPP</i> -Gens in <i>S. tuberosum</i> nach Infektion mit <i>P. infestans</i> .....	38
Abbildung 3.5: Kinetik der relativen Expression des <i>StIPP</i> -Gens in <i>S. tuberosum</i> nach Verwundung .....	38
Abbildung 3.6: Expression des rekombinanten StIPP-Proteins in <i>E. coli</i> .....	39
Abbildung 3.7: StIPP zeigt <i>in vitro</i> keine Aktivität gegenüber den verwendeten löslichen Inositolphosphaten .....	41
Abbildung 3.8: Phosphataseaktivität der StIPP gegenüber Phosphoinositiden .....	42
Abbildung 3.9: Autoradiogramm der mit mittels DC aufgetrennten Lipide .....	44
Abbildung 3.10: Molekular-phylogenetische Analyse der StIPP-Sequenz .....	45
Abbildung 3.11: Etablierung stabiler <i>StIPP</i> -RNAi-Kartoffellinien. ....	47
Abbildung 3.12: StIPP-überexprimierende <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen .....	48
Abbildung 3.13: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>P. infestans</i> -Haustorien in infizierten <i>S. tuberosum</i> -Zellen.....	49
Abbildung 3.14: Relative <i>P. infestans</i> -Biomasse in <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen mit verringerter <i>StIPP</i> -Expression .....	50
Abbildung 3.15: Relative <i>P.-infestans</i> -Biomasse in <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen mit erhöhter <i>StIPP</i> -Expression .....	51
Abbildung 3.16: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in <i>StIPP</i> -RNAi-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung. ....	55
Abbildung 3.17: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in <i>StIPP-mCherry</i> -Überexpressions-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung .....	57
Abbildung 3.18: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in <i>StIPP</i> -RNAi-Pflanzen nach flg22- und H2O-Behandlung.....	59
Abbildung 3.19: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in <i>StIPP-mCherry</i> -Überexpressions-Pflanzen nach flg22- und H2O-Behandlung .....	61
Abbildung 3.20: Co-expression von StIPP-GFP und freiem mCherry in <i>N. benthamiana</i> Blatt-Epidermiszellen .....	63
Abbildung 3.21: StIPP-GFP akkumuliert um <i>P. infestans</i> Penetrationsstellen .....	64

Abbildung 3.22: StIPP-GFP co-lokalisiert mit RFP-AvrBlb2 an der Plasmamembran, Extrahaustoriellen Membran und an haustoriellen Penetrationsstellen .....	65
Abbildung 3.23: StIPP-GFP co-lokalisiert mit einem PtdIns4P -Markerprotein an penetrierenden Hyphen. ....	68
Abbildung 3.24: StIPP-GFP co-lokalisiert mit einem PtdIns(4,5)P <sub>2</sub> -Markerprotein an penetrierenden Hyphen .....	69
Abbildung 3.25: Überexpression der <i>StIPP</i> in <i>A. thaliana</i> -Mesophyll-Protoplasten resultiert in einer erhöhten FLS2-Abundanz.....	70
Abbildung 3.26: Überexpression der <i>StIPP</i> in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten resultiert in keiner veränderten PIN1-Menge.....	71
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der möglichen Funktion von StIPP während der Abwehrantwort.....	84
Abbildung 6.1: Nukleotidsequenz der <i>StIPP</i> -cDNA .....	86
Abbildung 6.2: Vergleich der Nukleotidsequenzen der klonierten <i>StIPP</i> -cDNA gegen die homologe Sequenz aus <i>S. tuberosum</i> Phureja .....	87
Abbildung 6.3: Transiente Expression in <i>Nicotiana tabacum</i> -Pollenschläuchen.....	88
Abbildung 6.4: Vergleich der Aminosäuresequenzen der putative 5-phosphatasen aus <i>S. tuberosum</i> Phureja .....	89
Abbildung 6.5: Nachweis der Integration des <i>StIPP</i> -RNAi-Konstruktes (Beispielblots) .....	90
Abbildung 6.6: Kinetik der relativen Expression des <i>StIPP</i> -Gens nach Pep-13-Infiltration von <i>StIPP</i> -RNAi- <i>S. tuberosum</i> -Pflanzen .....	90
Abbildung 6.7: Nachweis der Integration des 35S- <i>StIPP</i> -HA-Konstruktes .....	91
Abbildung 6.8: Nachweis des Transkriptes des 35S- <i>StIPP</i> -HA-Konstruktes.....	91
Abbildung 6.9: Nachweis der Integration des 35S- <i>StIPP</i> -mCherry-Konstruktes .....	92
Abbildung 6.10: Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in <i>StIPP</i> -HA-Überexpressions-Pflanzen nach Pep-13- und W2A-Behandlung .....	93
Abbildung 6.11: Transiente <i>StIPP</i> -GFP-Transformation in Kartoffel .....	94
Abbildung 6.12: Überexpression der <i>StIPP</i> in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten resultiert in einer erhöhten FLS2-Menge.....	95
Abbildung 6.13: Überexpression der <i>StIPP</i> in <i>A. thaliana</i> -Protoplasten resultiert in keiner veränderten PIN1-Menge.....	95
Abbildung 6.14: Der Transkriptgehalt von <i>At5PTase11</i> nach <i>E. cichoracearum</i> -Inokulation ist in <i>pip5k1 pip5k2</i> -Doppelmutanten im Vergleich zum Col-0-WT reduziert.....	96
Abbildung 6.15: Relative Gen-Expression nach Pep-13- und W2A-Infiltration in Wildtypkartoffelzellkulturzellen in Abhängigkeit von der NADPH-Aktivität.....	96

---

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Verwendete Medien.....	18
Tabelle 2.2: Verwendete Oligonukleotide .....	19
Tabelle 2.3: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendete Vektoren .....	19
Tabelle 2.4: Standardzusammensetzung PCR-Ansatz .....	24
Tabelle 2.5: Standard-Thermalprofil im Thermocycler für PCR mit DreamTaq-DNA-Polymerase (Fermentas Thermo Scientific).....	24
Tabelle 2.6: Verwendete Sonden und Oligonukleotide für die Transkriptbestimmung mittels qRT-PCR .....	26
Tabelle 2.7 Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.....	27
Tabelle 3.1: Für die Synthese und Degradation von Phosphoinositiden annotierte Gene in <i>S. tuberosum</i> L. cv. Désirée WT.....	34

## 9 Literaturverzeichnis

- Abd-El-Haliem, A.M., Vossen, J.H., van Zeijl, A., Dezhsetan, S., Testerink, C., Seidl, M.F., Beck, M., Strutt, J., Robatzek, S. and Joosten, M.** (2016) Biochemical characterization of the tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase C (PI-PLC) family and its role in plant immunity. *Biochimica et biophysica acta*, **1861**, 1365-1378.
- Altmann, S.** (2009) Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenaseabgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L. *Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.*
- Antignani, V., Klocko, A.L., Bak, G., Chandrasekaran, S.D., Dunivin, T. and Nielsen, E.** (2015) Recruitment of PLANT U-BOX13 and the PI4Kbeta1/beta2 phosphatidylinositol-4 kinases by the small GTPase RabA4B plays important roles during salicylic acid-mediated plant defense signaling in Arabidopsis. *The Plant cell*, **27**, 243-261.
- Bacete, L., Melida, H., Miedes, E. and Molina, A.** (2018) Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **93**, 614-636.
- Bak, G., Lee, E.J., Lee, Y., Kato, M., Segami, S., Sze, H., Maeshima, M., Hwang, J.U. and Lee, Y.** (2013) Rapid structural changes and acidification of guard cell vacuoles during stomatal closure require phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate. *The Plant cell*, **25**, 2202-2216.
- Beck, M., Zhou, J., Faulkner, C., MacLean, D. and Robatzek, S.** (2012) Spatio-temporal cellular dynamics of the Arabidopsis flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting. *The Plant cell*, **24**, 4205-4219.
- Becktell, M.C., Smart, C.A., Haney, C.H. and Fry, W.E.** (2006) Host-pathogen interactions between *Phytophthora infestans* and the Solanaceous hosts *Calibrachoa x Hybridus*, *Petunia x hybrida*, and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Dis*, **90**, 24-32.
- Bednarek, P., Kwon, C. and Schulze-Lefert, P.** (2010) Not a peripheral issue: secretion in plant-microbe interactions. *Current opinion in plant biology*, **13**, 378-387.
- Belfield, E.J., Hughes, R.K., Tsesmetzis, N., Naldrett, M.J. and Casey, R.** (2007) The gateway pDEST17 expression vector encodes a -1 ribosomal frameshifting sequence. *Nucleic acids research*, **35**, 1322-1332.
- Ben Khaled, S., Postma, J. and Robatzek, S.** (2015) A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity. *Annu Rev Phytopathol*, **53**, 379-402.
- Bentham, A.R., De la Concepcion, J.C., Mukhi, N., Zdrzalek, R., Draeger, M., Gorenkin, D., Hughes, R.K. and Banfield, M.J.** (2020) A molecular roadmap to the plant immune system. *The Journal of biological chemistry*, **295**, 14916-14935.
- Berdy, S.E., Kudla, J., Gruissem, W. and Gillaspay, G.E.** (2001) Molecular characterization of At5PTase1, an inositol phosphatase capable of terminating inositol trisphosphate signaling. *Plant physiology*, **126**, 801-810.
- Bi, G., Su, M., Li, N., Liang, Y., Dang, S., Xu, J., Hu, M., Wang, J., Zou, M., Deng, Y., Li, Q., Huang, S., Li, J., Chai, J., He, K., Chen, Y.H. and Zhou, J.M.** (2021) The ZAR1 resistosome is a calcium-permeable channel triggering plant immune signaling. *Cell*, **184**, 3528-3541 e3512.

- Bigeard, J., Colcombet, J. and Hirt, H.** (2015) Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular plant*, **8**, 521-539.
- Blackman, L.M., Cullerne, D.P., Torrena, P., Taylor, J. and Hardham, A.R.** (2015) RNA-Seq Analysis of the Expression of Genes Encoding Cell Wall Degrading Enzymes during Infection of Lupin (*Lupinus angustifolius*) by *Phytophthora parasitica*. *PLoS one*, **10**, e0136899.
- Bloch, D., Pleskot, R., Pejchar, P., Potocky, M., Trpkosova, P., Cwiklik, L., Vukasinovic, N., Sternberg, H., Yalovsky, S. and Zarsky, V.** (2016) Exocyst SEC3 and Phosphoinositides Define Sites of Exocytosis in Pollen Tube Initiation and Growth. *Plant physiology*, **172**, 980-1002.
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N. and Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *The Plant cell*, **12**, 1425-1440.
- Boevink, P.C., Birch, P.R.J., Turnbull, D. and Whisson, S.C.** (2020) Devastating intimacy: the cell biology of plant-*Phytophthora* interactions. *The New phytologist*, **228**, 445-458.
- Boller, T. and Felix, G.** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology*, **60**, 379-406.
- Boronenkov, I.V. and Anderson, R.A.** (1995) The sequence of phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase defines a novel family of lipid kinases. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 2881-2884.
- Bos, J.I., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C., Kamoun, S. and Birch, P.R.** (2010) *Phytophthora infestans* effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 9909-9914.
- Boss, W.F. and Im, Y.J.** (2012) Phosphoinositide signaling. *Annual review of plant biology*, **63**, 409-429.
- Boutrot, F. and Zipfel, C.** (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **55**, 257-286.
- Bozkurt, T.O., Belhaj, K., Dagdas, Y.F., Chaparro-Garcia, A., Wu, C.H., Cano, L.M. and Kamoun, S.** (2015) Rerouting of plant late endocytic trafficking toward a pathogen interface. *Traffic*, **16**, 204-226.
- Bozkurt, T.O. and Kamoun, S.** (2020) The plant-pathogen haustorial interface at a glance. *Journal of cell science*, **133**.
- Bozkurt, T.O., Richardson, A., Dagdas, Y.F., Mongrand, S., Kamoun, S. and Raffaele, S.** (2014) The Plant Membrane-Associated REMORIN1.3 Accumulates in Discrete Perihaustorial Domains and Enhances Susceptibility to *Phytophthora infestans*. *Plant physiology*, **165**, 1005-1018.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J. and Kamoun, S.** (2012) Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Current opinion in plant biology*, **15**, 483-492.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M., Huitema, E., van der Hoorn, R.A. and Kamoun, S.** (2011) *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the

- haustorial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 20832-20837.
- Brearley, C.A. and Hanke, D.E.** (1993) Pathway of synthesis of 3,4- and 4,5-phosphorylated phosphatidylinositols in the duckweed *Spirodela polyrhiza* L. *The Biochemical journal*, **290 ( Pt 1)**, 145-150.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. and Nurnberger, T.** (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *The EMBO journal*, **21**, 6681-6688.
- Carland, F. and Nelson, T.** (2009) CVP2- and CVL1-mediated phosphoinositide signaling as a regulator of the ARF GAP SFC/VAN3 in establishment of foliar vein patterns. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **59**, 895-907.
- Chaparro-Garcia, A., Schwizer, S., Sklenar, J., Yoshida, K., Petre, B., Bos, J.I., Schornack, S., Jones, A.M., Bozkurt, T.O. and Kamoun, S.** (2015) *Phytophthora infestans* RXLR-WY Effector AVR3a Associates with Dynamin-Related Protein 2 Required for Endocytosis of the Plant Pattern Recognition Receptor FLS2. *PloS one*, **10**, e0137071.
- Chaparro-Garcia, A., Wilkinson, R.C., Gimenez-Ibanez, S., Findlay, K., Coffey, M.D., Zipfel, C., Rathjen, J.P., Kamoun, S. and Schornack, S.** (2011) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. *PloS one*, **6**, e16608.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G.** (2006) The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant cell*, **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S. and Kemmerling, B.** (2009) One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in plant science*, **14**, 535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-500.
- Cho, M.H., Chen, Q., Okpodu, C.M. and Boss, W.F.** (1992) Separation and quantification of [3H]inositol phospholipids using thin-layer-chromatography and a computerized 3H imaging scanner. *LC-GC*, **10**, 464-468.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical biochemistry*, **162**, 156-159.
- Collemare, J., O'Connell, R. and Lebrun, M.H.** (2019) Nonproteinaceous effectors: the terra incognita of plant-fungal interactions. *The New phytologist*, **223**, 590-596.
- Communi, D. and Erneux, C.** (1996) Identification of an active site cysteine residue in human type I Ins(1,4,5)P3 5-phosphatase by chemical modification and site-directed mutagenesis. *The Biochemical journal*, **320 ( Pt 1)**, 181-186.
- Communi, D., Lecocq, R. and Erneux, C.** (1996) Arginine 343 and 350 are two active residues involved in substrate binding by human Type I D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 11676-11683.
- Cui, H., Tsuda, K. and Parker, J.E.** (2015) Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual review of plant biology*, **66**, 487-511.
- D'Ambrosio, J.M., Couto, D., Fabro, G., Scuffi, D., Lamattina, L., Munnik, T., Andersson, M.X., Alvarez, M.E., Zipfel, C. and Laxalt, A.M.** (2017) Phospholipase C2 Affects

- MAMP-Triggered Immunity by Modulating ROS Production. *Plant physiology*, **175**, 970-981.
- de Jong, C.F., Laxalt, A.M., Bargmann, B.O., de Wit, P.J., Joosten, M.H. and Munnik, T.** (2004) Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **39**, 1-12.
- Dhonukshe, P., Aniento, F., Hwang, I., Robinson, D.G., Mravec, J., Stierhof, Y.D. and Friml, J.** (2007) Clathrin-mediated constitutive endocytosis of PIN auxin efflux carriers in Arabidopsis. *Curr Biol*, **17**, 520-527.
- Dodds, P.N., Rafiqi, M., Gan, P.H., Hardham, A.R., Jones, D.A. and Ellis, J.G.** (2009) Effectors of biotrophic fungi and oomycetes: pathogenicity factors and triggers of host resistance. *The New phytologist*, **183**, 993-1000.
- Dongus, J.A. and Parker, J.E.** (2021) EDS1 signalling: At the nexus of intracellular and surface receptor immunity. *Current opinion in plant biology*, **62**, 102039.
- Dowd, P.E., Coursol, S., Skirpan, A.L., Kao, T.H. and Gilroy, S.** (2006) Petunia phospholipase c1 is involved in pollen tube growth. *The Plant cell*, **18**, 1438-1453.
- Du, Y., Mpina, M.H., Birch, P.R., Bouwmeester, K. and Govers, F.** (2015) Phytophthora infestans RXLR Effector AVR1 Interacts with Exocyst Component Sec5 to Manipulate Plant Immunity. *Plant physiology*, **169**, 1975-1990.
- Du, Y., Overdijk, E.J.R., Berg, J.A., Govers, F. and Bouwmeester, K.** (2018) Solanaceous exocyst subunits are involved in immunity to diverse plant pathogens. *J Exp Bot*, **69**, 655-666.
- Dubiella, U., Seybold, H., Durian, G., Komander, E., Lassig, R., Witte, C.P., Schulze, W.X. and Romeis, T.** (2013) Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 8744-8749.
- Dyson, M.R., Shadbolt, S.P., Vincent, K.J., Perera, R.L. and McCafferty, J.** (2004) Production of soluble mammalian proteins in Escherichia coli: identification of protein features that correlate with successful expression. *BMC Biotechnol*, **4**, 32.
- Ercetin, M.E. and Gillaspay, G.E.** (2004) Molecular characterization of an Arabidopsis gene encoding a phospholipid-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase. *Plant physiology*, **135**, 938-946.
- Eschen-Lippold, L., Altmann, S. and Rosahl, S.** (2010) DL-beta-aminobutyric acid-induced resistance of potato against Phytophthora infestans requires salicylic acid but not oxylipins. *Mol Plant Microbe Interact*, **23**, 585-592.
- Eschen-Lippold, L., Landgraf, R., Smolka, U., Schulze, S., Heilmann, M., Heilmann, I., Hause, G. and Rosahl, S.** (2012a) Activation of defense against Phytophthora infestans in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. *The New phytologist*, **193**, 985-996.
- Eschen-Lippold, L., Lubken, T., Smolka, U. and Rosahl, S.** (2012b) Characterization of potato plants with reduced StSYR1 expression. *Plant signaling & behavior*, **7**, 559-562.
- Fratini, M., Krishnamoorthy, P., Stenzel, I., Riechmann, M., Matzner, M., Bacia, K., Heilmann, M. and Heilmann, I.** (2021) Plasma membrane nano-organization specifies phosphoinositide effects on Rho-GTPases and actin dynamics in tobacco pollen tubes. *The Plant cell*, **33**, 642-670.
- Fry, W.E., Birch, P.R., Judelson, H.S., Grunwald, N.J., Danies, G., Everts, K.L., Gevens, A.J., Gugino, B.K., Johnson, D.A., Johnson, S.B., McGrath, M.T., Myers, K.L., Ristaino,**

- J.B., Roberts, P.D., Secor, G. and Smart, C.D.** (2015) Five Reasons to Consider *Phytophthora infestans* a Reemerging Pathogen. *Phytopathology*, **105**, 966-981.
- Gerth, K., Lin, F., Menzel, W., Krishnamoorthy, P., Stenzel, I., Heilmann, M. and Heilmann, I.** (2017) Guilt by Association: A Phenotype-Based View of the Plant Phosphoinositide Network. *Annual review of plant biology*, **68**, 349-374.
- Ghislain, M., Byarugaba, A.A., Magembe, E., Njoroge, A., Rivera, C., Roman, M.L., Tovar, J.C., Gamboa, S., Forbes, G.A., Kreuze, J.F., Barekye, A. and Kiggundu, A.** (2019) Stacking three late blight resistance genes from wild species directly into African highland potato varieties confers complete field resistance to local blight races. *Plant Biotechnol J*, **17**, 1119-1129.
- Golani, Y., Kaye, Y., Gilhar, O., Ercetin, M., Gillaspay, G. and Levine, A.** (2013) Inositol polyphosphate phosphatidylinositol 5-phosphatase9 (At5ptase9) controls plant salt tolerance by regulating endocytosis. *Molecular plant*, **6**, 1781-1794.
- Gonorazky, G., Guzzo, M.C., Abd-El-Halim, A.M., Joosten, M.H. and Laxalt, A.M.** (2016) Silencing of the tomato phosphatidylinositol-phospholipase C2 (SIPLC2) reduces plant susceptibility to *Botrytis cinerea*. *Molecular plant pathology*, **17**, 1354-1363.
- Goss, E.M., Tabima, J.F., Cooke, D.E., Restrepo, S., Fry, W.E., Forbes, G.A., Fieland, V.J., Cardenas, M. and Grunwald, N.J.** (2014) The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **111**, 8791-8796.
- Granke, L.L., Windstam, S.T., Hoch, H.C., Smart, C.D. and Hausbeck, M.K.** (2009) Dispersal and movement mechanisms of *Phytophthora capsici* sporangia. *Phytopathology*, **99**, 1258-1264.
- Gu, Y., Zavaliev, R. and Dong, X.** (2017) Membrane Trafficking in Plant Immunity. *Molecular plant*, **10**, 1026-1034.
- Guo, T., Chen, H.C., Lu, Z.Q., Diao, M., Chen, K., Dong, N.Q., Shan, J.X., Ye, W.W., Huang, S. and Lin, H.X.** (2020) A SAC Phosphoinositide Phosphatase Controls Rice Development via Hydrolyzing PI4P and PI(4,5)P2. *Plant physiology*, **182**, 1346-1358.
- Halim, V.A.** (2006) The Role of Salicylic Acid and Octadecanoids for Pathogen Defense in Potato. *Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg*.
- Halim, V.A., Altmann, S., Ellinger, D., Eschen-Lippold, L., Miersch, O., Scheel, D. and Rosahl, S.** (2009) PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **57**, 230-242.
- Halim, V.A., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nurnberger, T., Scheel, D. and Rosahl, S.** (2004) The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Physiol Mol Plant P*, **64**, 311-318.
- Hao, H., Fan, L., Chen, T., Li, R., Li, X., He, Q., Botella, M.A. and Lin, J.** (2014) Clathrin and Membrane Microdomains Cooperatively Regulate RbohD Dynamics and Activity in Arabidopsis. *The Plant cell*, **26**, 1729-1745.
- Haverkort, A.J., Boonekamp, P.M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L.A.P., Kessel, G.J.T., Visser, R.G.F. and van der Vossen, E.A.G.** (2008) Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Res*, **51**, 47-57.

- He, B., Xi, F., Zhang, X., Zhang, J. and Guo, W. (2007) Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane. *The EMBO journal*, **26**, 4053-4065.
- Heilmann, I., Stevenson-Paulik, J. and Perera, I.Y. (2000) Plant PtdIns 3-kinase goes nuclear. *The Plant cell*, **12**, 1511-1512.
- Heilmann, M. and Heilmann, I. (2015) Plant phosphoinositides-complex networks controlling growth and adaptation. *Biochimica et biophysica acta*, **1851**, 759-769.
- Heilmann, M. and Heilmann, I. (2022) Regulators regulated: Different layers of control for plasma membrane phosphoinositides in plants. *Current opinion in plant biology*, **67**, 102218.
- Hempel, F., Stenzel, I., Heilmann, M., Krishnamoorthy, P., Menzel, W., Golbik, R., Helm, S., Dobritsch, D., Baginsky, S., Lee, J., Hoehenwarter, W. and Heilmann, I. (2017) MAPKs Influence Pollen Tube Growth by Controlling the Formation of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in an Apical Plasma Membrane Domain. *The Plant cell*, **29**, 3030-3050.
- Hirsch, C.D., Hamilton, J.P., Childs, K.L., Cepela, J., Crisovan, E., Vaillancourt, B., Hirsch, C.N., Habermann, M., Neal, B. and Buell, C.R. (2014) Spud DB: A Resource for Mining Sequences, Genotypes, and Phenotypes to Accelerate Potato Breeding. *Plant Genome-U.S.*, **7**.
- Hofgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic acids research*, **16**, 9877.
- Hogenhout, S.A., Van der Hoorn, R.A., Terauchi, R. and Kamoun, S. (2009) Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Mol Plant Microbe Interact*, **22**, 115-122.
- Horbach, R., Navarro-Quesada, A.R., Knogge, W. and Deising, H.B. (2011) When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. *J Plant Physiol*, **168**, 51-62.
- Hung, C.Y., Aspesi, P., Jr., Hunter, M.R., Lomax, A.W. and Perera, I.Y. (2014) Phosphoinositide-signaling is one component of a robust plant defense response. *Frontiers in plant science*, **5**, 267.
- Im, Y.J., Davis, A.J., Perera, I.Y., Johannes, E., Allen, N.S. and Boss, W.F. (2007) The N-terminal membrane occupation and recognition nexus domain of Arabidopsis phosphatidylinositol phosphate kinase 1 regulates enzyme activity. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 5443-5452.
- Ischebeck, T., Seiler, S. and Heilmann, I. (2010a) At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma*, **240**, 13-31.
- Ischebeck, T., Stenzel, I. and Heilmann, I. (2008) Type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinases mediate Arabidopsis and Nicotiana tabacum pollen tube growth by regulating apical pectin secretion. *The Plant cell*, **20**, 3312-3330.
- Ischebeck, T., Stenzel, I., Hempel, F., Jin, X., Mosblech, A. and Heilmann, I. (2011) Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate influences Nt-Rac5-mediated cell expansion in pollen tubes of Nicotiana tabacum. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **65**, 453-468.
- Ischebeck, T., Vu, L.H., Jin, X., Stenzel, I., Lofke, C. and Heilmann, I. (2010b) Functional cooperativity of enzymes of phosphoinositide conversion according to synergistic effects on pectin secretion in tobacco pollen tubes. *Molecular plant*, **3**, 870-881.

- Ischebeck, T., Werner, S., Krishnamoorthy, P., Lerche, J., Meijon, M., Stenzel, I., Lofke, C., Wiessner, T., Im, Y.J., Perera, I.Y., Iven, T., Feussner, I., Busch, W., Boss, W.F., Teichmann, T., Hause, B., Persson, S. and Heilmann, I.** (2013) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate influences PIN polarization by controlling clathrin-mediated membrane trafficking in Arabidopsis. *The Plant cell*, **25**, 4894-4911.
- Jaillais, Y. and Ott, T.** (2020) The Nanoscale Organization of the Plasma Membrane and Its Importance in Signaling: A Proteolipid Perspective. *Plant physiology*, **182**, 1682-1696.
- Jones, D.T., Taylor, W.R. and Thornton, J.M.** (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*, **8**, 275-282.
- Judelson, H.S. and Ah-Fong, A.M.V.** (2019) Exchanges at the Plant-Oomycete Interface That Influence Disease. *Plant physiology*, **179**, 1198-1211.
- Judelson, H.S. and Blanco, F.A.** (2005) The spores of Phytophthora: weapons of the plant destroyer. *Nature reviews. Microbiology*, **3**, 47-58.
- Kadota, Y., Shirasu, K. and Zipfel, C.** (2015) Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol*, **56**, 1472-1480.
- Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A.** (2002) GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in plant science*, **7**, 193-195.
- Kaye, Y., Golani, Y., Singer, Y., Leshem, Y., Cohen, G., Ercetin, M., Gillaspay, G. and Levine, A.** (2011) Inositol polyphosphate 5-phosphatase7 regulates the production of reactive oxygen species and salt tolerance in Arabidopsis. *Plant physiology*, **157**, 229-241.
- König, S., Hoffmann, M., Mosblech, A. and Heilmann, I.** (2008) Determination of content and fatty acid composition of unlabeled phosphoinositide species by thin-layer chromatography and gas chromatography. *Analytical biochemistry*, **378**, 197-201.
- Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolias, K., Carpenter, C. and Chua, N.H.** (1999) Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth. *The Journal of cell biology*, **145**, 317-330.
- Krishnamoorthy, P., Sanchez-Rodriguez, C., Heilmann, I. and Persson, S.** (2014) Regulatory roles of phosphoinositides in membrane trafficking and their potential impact on cell-wall synthesis and re-modelling. *Annals of botany*, **114**, 1049-1057.
- Kroon, L.P., Brouwer, H., de Cock, A.W. and Govers, F.** (2012) The genus Phytophthora anno 2012. *Phytopathology*, **102**, 348-364.
- Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., Eschen-Lippold, L., Senning, M., Sonnewald, S., Weigel, B., Frolova, N., Strehmel, N., Hause, G., Scheel, D., Bottcher, C. and Rosahl, S.** (2014) The ABC transporter ABCG1 is required for suberin formation in potato tuber periderm. *The Plant cell*, **26**, 3403-3415.
- Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Tremousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levallant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., Raffaele, S., Berthome, R., Coute, Y., Parker, J.E. and Deslandes, L.** (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell*, **161**, 1074-1088.
- Leesutthiphonchai, W., Vu, A.L., Ah-Fong, A.M.V. and Judelson, H.S.** (2018) How Does Phytophthora infestans Evade Control Efforts? Modern Insight Into the Late Blight Disease. *Phytopathology*, **108**, 916-924.

- Liese, A. and Romeis, T. (2013) Biochemical regulation of in vivo function of plant calcium-dependent protein kinases (CDPK). *Biochimica et biophysica acta*, **1833**, 1582-1589.
- Lipka, V., Kwon, C. and Panstruga, R. (2007) SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 147-174.
- Liu, J., Zuo, X., Yue, P. and Guo, W. (2007) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane for exocytosis in mammalian cells. *Mol Biol Cell.*, **18**, 4483-4492.
- Löfke, C., Ischebeck, T., König, S., Freitag, S. and Heilmann, I. (2008) Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *The Biochemical journal*, **413**, 115-124.
- Lu, Y.J., Schornack, S., Spallek, T., Geldner, N., Chory, J., Schellmann, S., Schumacher, K., Kamoun, S. and Robatzek, S. (2012) Patterns of plant subcellular responses to successful oomycete infections reveal differences in host cell reprogramming and endocytic trafficking. *Cellular microbiology*, **14**, 682-697.
- Ma, S., Lapin, D., Liu, L., Sun, Y., Song, W., Zhang, X., Logemann, E., Yu, D., Wang, J., Jirschitzka, J., Han, Z., Schulze-Lefert, P., Parker, J.E. and Chai, J. (2020) Direct pathogen-induced assembly of an NLR immune receptor complex to form a holoenzyme. *Science*, **370**.
- Ma, Z., Song, T., Zhu, L., Ye, W., Wang, Y., Shao, Y., Dong, S., Zhang, Z., Dou, D., Zheng, X., Tyler, B.M. and Wang, Y. (2015) A *Phytophthora sojae* Glycoside Hydrolase 12 Protein Is a Major Virulence Factor during Soybean Infection and Is Recognized as a PAMP. *The Plant cell*, **27**, 2057-2072.
- Macho, A.P. and Zipfel, C. (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol Cell*, **54**, 263-272.
- Macho, A.P. and Zipfel, C. (2015) Targeting of plant pattern recognition receptor-triggered immunity by bacterial type-III secretion system effectors. *Curr Opin Microbiol*, **23**, 14-22.
- Majerus, P.W., Kisseleva, M.V. and Norris, F.A. (1999) The role of phosphatases in inositol signaling reactions. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 10669-10672.
- Mbengue, M., Bourdais, G., Gervasi, F., Beck, M., Zhou, J., Spallek, T., Bartels, S., Boller, T., Ueda, T., Kuhn, H. and Robatzek, S. (2016) Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**, 11034-11039.
- Meijer, H.J., Berrie, C.P., Iurisci, C., Divecha, N., Musgrave, A. and Munnik, T. (2001) Identification of a new polyphosphoinositide in plants, phosphatidylinositol 5-monophosphate (PtdIns5P), and its accumulation upon osmotic stress. *The Biochemical journal*, **360**, 491-498.
- Meijer, H.J. and Munnik, T. (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annual review of plant biology*, **54**, 265-306.
- Menzel, W., Stenzel, I., Helbig, L.M., Krishnamoorthy, P., Neumann, S., Eschen-Lippold, L., Heilmann, M., Lee, J. and Heilmann, I. (2019) A PAMP-triggered MAPK cascade inhibits phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate production by PIP5K6 in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*, **224**, 833-847.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N. (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is

- essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 19613-19618.
- Monino-Lopez, D., Nijenhuis, M., Kodde, L., Kamoun, S., Salehian, H., Schentsnyi, K., Stam, R., Lokossou, A., Abd-El-Halim, A., Visser, R.G.F. and Vossen, J.H.** (2021) Allelic variants of the NLR protein Rpi-chc1 differentially recognize members of the Phytophthora infestans PexRD12/31 effector superfamily through the leucine-rich repeat domain. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **107**, 182-197.
- Mosblech, A., Konig, S., Stenzel, I., Grzeganeck, P., Feussner, I. and Heilmann, I.** (2008) Phosphoinositide and inositolpolyphosphate signalling in defense responses of Arabidopsis thaliana challenged by mechanical wounding. *Molecular plant*, **1**, 249-261.
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I. and Heilmann, I.** (2011) Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in Arabidopsis thaliana. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **65**, 949-957.
- Mueller-Roeber, B. and Pical, C.** (2002) Inositol phospholipid metabolism in Arabidopsis. Characterized and putative isoforms of inositol phospholipid kinase and phosphoinositide-specific phospholipase C. *Plant physiology*, **130**, 22-46.
- Mukhtar, M.S., Carvunis, A.R., Dreze, M., Eppele, P., Steinbrenner, J., Moore, J., Tasan, M., Galli, M., Hao, T., Nishimura, M.T., Pevzner, S.J., Donovan, S.E., Ghamsari, L., Santhanam, B., Romero, V., Poulin, M.M., Gebreab, F., Gutierrez, B.J., Tam, S., Monachello, D., Boxem, M., Harbort, C.J., McDonald, N., Gai, L., Chen, H., He, Y., European Union Effectoromics, C., Vandenhaute, J., Roth, F.P., Hill, D.E., Ecker, J.R., Vidal, M., Beynon, J., Braun, P. and Dangl, J.L.** (2011) Independently evolved virulence effectors converge onto hubs in a plant immune system network. *Science*, **333**, 596-601.
- Munnik, T.** (2001) Phosphatidic acid: an emerging plant lipid second messenger. *Trends in plant science*, **6**, 227-233.
- Munnik, T. and Nielsen, E.** (2011) Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current opinion in plant biology*, **14**, 489-497.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, **104**, 34-41.
- Nguyen, Q.M., Iswanto, A.B.B., Son, G.H. and Kim, S.H.** (2021) Recent Advances in Effector-Triggered Immunity in Plants: New Pieces in the Puzzle Create a Different Paradigm. *Int J Mol Sci*, **22**.
- Nietzschmann, L., Gorzolka, K., Smolka, U., Matern, A., Eschen-Lippold, L., Scheel, D. and Rosahl, S.** (2019) Early Pep-13-induced immune responses are SERK3A/B-dependent in potato. *Sci Rep*, **9**, 18380.
- Noack, L.C. and Jaillais, Y.** (2017) Precision targeting by phosphoinositides: how PIs direct endomembrane trafficking in plants. *Current opinion in plant biology*, **40**, 22-33.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, **198**, 249-266.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994) High-Affinity Binding of a Fungal Oligopeptide Elicitor to Parsley Plasma-Membranes Triggers Multiple Defense Responses. *Cell*, **78**, 449-460.

- Ortiz, D., de Guillen, K., Cesari, S., Chalvon, V., Gracy, J., Padilla, A. and Kroj, T. (2017) Recognition of the Magnaporthe oryzae Effector AVR-Pia by the Decoy Domain of the Rice NLR Immune Receptor RGA5. *The Plant cell*, **29**, 156-168.
- Peng, Y., van Wersch, R. and Zhang, Y. (2018) Convergent and Divergent Signaling in PAMP-Triggered Immunity and Effector-Triggered Immunity. *Mol Plant Microbe Interact*, **31**, 403-409.
- Petre, B., Contreras, M.P., Bozkurt, T.O., Schattat, M.H., Sklenar, J., Schornack, S., Abdel-Halim, A., Castells-Graells, R., Lozano-Duran, R., Dagdas, Y.F., Menke, F.L.H., Jones, A.M.E., Vossen, J.H., Robatzek, S., Kamoun, S. and Win, J. (2021) Host-interactor screens of Phytophthora infestans RXLR proteins reveal vesicle trafficking as a major effector-targeted process. *The Plant cell*, **33**, 1447-1471.
- Petutschnig, E.K., Jones, A.M., Serazetdinova, L., Lipka, U. and Lipka, V. (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in Arabidopsis thaliana and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, **285**, 28902-28911.
- Pogany, M., von Rad, U., Grun, S., Dongo, A., Pintye, A., Simoneau, P., Bahnweg, G., Kiss, L., Barna, B. and Durner, J. (2009) Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-Alternaria pathosystem. *Plant physiology*, **151**, 1459-1475.
- Potato Genome Sequencing, C., Xu, X., Pan, S., Cheng, S., Zhang, B., Mu, D., Ni, P., Zhang, G., Yang, S., Li, R., Wang, J., Orjeda, G., Guzman, F., Torres, M., Lozano, R., Ponce, O., Martinez, D., De la Cruz, G., Chakrabarti, S.K., Patil, V.U., Skryabin, K.G., Kuznetsov, B.B., Ravin, N.V., Kolganova, T.V., Beletsky, A.V., Mardanov, A.V., Di Genova, A., Bolser, D.M., Martin, D.M., Li, G., Yang, Y., Kuang, H., Hu, Q., Xiong, X., Bishop, G.J., Sagredo, B., Mejia, N., Zagorski, W., Gromadka, R., Gawor, J., Szczesny, P., Huang, S., Zhang, Z., Liang, C., He, J., Li, Y., He, Y., Xu, J., Zhang, Y., Xie, B., Du, Y., Qu, D., Bonierbale, M., Ghislain, M., Herrera Mdel, R., Giuliano, G., Pietrella, M., Perrotta, G., Facella, P., O'Brien, K., Feingold, S.E., Barreiro, L.E., Massa, G.A., Diambra, L., Whitty, B.R., Vaillancourt, B., Lin, H., Massa, A.N., Geoffroy, M., Lundback, S., DellaPenna, D., Buell, C.R., Sharma, S.K., Marshall, D.F., Waugh, R., Bryan, G.J., Destefanis, M., Nagy, I., Milbourne, D., Thomson, S.J., Fiers, M., Jacobs, J.M., Nielsen, K.L., Sonderkaer, M., Iovene, M., Torres, G.A., Jiang, J., Veilleux, R.E., Bachem, C.W., de Boer, J., Borm, T., Kloosterman, B., van Eck, H., Datema, E., Hekkert, B., Goverse, A., van Ham, R.C. and Visser, R.G. (2011) Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature*, **475**, 189-195.
- Pribat, A., Sormani, R., Rousseau-Guetin, M., Julkowska, M.M., Testerink, C., Joubes, J., Castroviejo, M., Laguerre, M., Meyer, C., Germain, V. and Rothan, C. (2012) A novel class of PTEN protein in Arabidopsis displays unusual phosphoinositide phosphatase activity and efficiently binds phosphatidic acid. *The Biochemical journal*, **441**, 161-171.
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z. and Zhou, J.M. (2017) Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current opinion in plant biology*, **38**, 92-100.
- Qin, L., Zhou, Z., Li, Q., Zhai, C., Liu, L., Quilichini, T.D., Gao, P., Kessler, S.A., Jaillais, Y., Datla, R., Peng, G., Xiang, D. and Wei, Y. (2020) Specific Recruitment of Phosphoinositide Species to the Plant-Pathogen Interfacial Membrane Underlies Arabidopsis Susceptibility to Fungal Infection. *The Plant cell*, **32**, 1665-1688.

- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. and Scheel, D.** (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **68**, 100-113.
- Rausche, J., Stenzel, I., Stauder, R., Fratini, M., Trujillo, M., Heilmann, I. and Rosahl, S.** (2021) A phosphoinositide 5-phosphatase from *Solanum tuberosum* is activated by PAMP-treatment and may antagonize phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate at *Phytophthora infestans* infection sites. *The New phytologist*, **229**, 469-487.
- Reidick, C., Boutouja, F. and Platta, H.W.** (2017) The class III phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem*, **398**, 677-685.
- Riemer, E., Pullagurla, N.J., Yadav, R., Rana, P., Jessen, H.J., Kamleitner, M., Schaaf, G. and Laha, D.** (2022) Regulation of plant biotic interactions and abiotic stress responses by inositol polyphosphates. *Frontiers in plant science*, **13**, 944515.
- Rizzo, D.M., Lichtveld, M., Mazet, J.A.K., Togami, E. and Miller, S.A.** (2021) Plant health and its effects on food safety and security in a One Health framework: four case studies. *One Health Outlook*, **3**, 6.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tor, M., de Vries, S. and Zipfel, C.** (2011) The Arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens. *The Plant cell*, **23**, 2440-2455.
- Saavedra, L., Balbi, V., Dove, S.K., Hiwatashi, Y., Mikami, K. and Sommarin, M.** (2009) Characterization of phosphatidylinositol phosphate kinases from the moss *Physcomitrella patens*: PpPIP1 and PpPIP2. *Plant Cell Physiol*, **50**, 595-609.
- Saavedra, L., Catarino, R., Heinz, T., Heilmann, I., Bezanilla, M. and Malho, R.** (2015) Phosphatase and Tensin Homolog Is a Growth Repressor of Both Rhizoid and Gametophore Development in the Moss *Physcomitrella patens*. *Plant physiology*, **169**, 2572-2586.
- Sarris, P.F., Duxbury, Z., Huh, S.U., Ma, Y., Segonzac, C., Sklenar, J., Derbyshire, P., Cevik, V., Rallapalli, G., Saucet, S.B., Wirthmueller, L., Menke, F.L.H., Sohn, K.H. and Jones, J.D.G.** (2015) A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell*, **161**, 1089-1100.
- Sasek, V., Janda, M., Delage, E., Puyaubert, J., Guivarc'h, A., Lopez Maseda, E., Dobrev, P.I., Caius, J., Boka, K., Valentova, O., Burketova, L., Zachowski, A. and Ruelland, E.** (2014) Constitutive salicylic acid accumulation in pi4klIbeta1beta2 Arabidopsis plants stunts rosette but not root growth. *The New phytologist*, **203**, 805-816.
- Schellenberger, R., Touchard, M., Clement, C., Baillieul, F., Cordelier, S., Crouzet, J. and Dorey, S.** (2019) Apoplastic invasion patterns triggering plant immunity: plasma membrane sensing at the frontline. *Molecular plant pathology*, **20**, 1602-1616.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D. and Rosahl, S.** (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 4273-4280.
- Senju, Y., Kalimeri, M., Koskela, E.V., Somerharju, P., Zhao, H., Vattulainen, I. and Lappalainen, P.** (2017) Mechanistic principles underlying regulation of the actin cytoskeleton by phosphoinositides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, E8977-E8986.

- Sheard, L.B., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben-Nissan, G., Hinds, T.R., Kobayashi, Y., Hsu, F.F., Sharon, M., Browse, J., He, S.Y., Rizo, J., Howe, G.A. and Zheng, N. (2010) Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature*, **468**, 400-405.
- Shimada, T.L., Betsuyaku, S., Inada, N., Ebine, K., Fujimoto, M., Uemura, T., Takano, Y., Fukuda, H., Nakano, A. and Ueda, T. (2019) Enrichment of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in the Extra-Invasive Hyphal Membrane Promotes Colletotrichum Infection of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **60**, 1514-1524.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. and Mauch, F. (2003) Quantification of induced resistance against Phytophthora species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Molecular plant pathology*, **4**, 237-248.
- Simon, M.L., Platre, M.P., Assil, S., van Wijk, R., Chen, W.Y., Chory, J., Dreux, M., Munnik, T. and Jaillais, Y. (2014) A multi-colour/multi-affinity marker set to visualize phosphoinositide dynamics in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **77**, 322-337.
- Simon, M.L., Platre, M.P., Marques-Bueno, M.M., Armengot, L., Stanislas, T., Bayle, V., Caillaud, M.C. and Jaillais, Y. (2016) A PtdIns(4)P-driven electrostatic field controls cell membrane identity and signalling in plants. *Nat Plants*, **2**, 16089.
- Song, L., Wang, Y., Guo, Z., Lam, S.M., Shui, G. and Cheng, Y. (2021) NCP2/RHD4/SAC7, SAC6 and SAC8 phosphoinositide phosphatases are required for PtdIns4P and PtdIns(4,5)P2 homeostasis and Arabidopsis development. *The New phytologist*, **231**, 713-725.
- Sousa, E., Kost, B. and Malho, R. (2008) Arabidopsis phosphatidylinositol-4-monophosphate 5-kinase 4 regulates pollen tube growth and polarity by modulating membrane recycling. *The Plant cell*, **20**, 3050-3064.
- Spallek, T., Beck, M., Ben Khaled, S., Salomon, S., Bourdais, G., Schellmann, S. and Robatzek, S. (2013) ESCRT-I mediates FLS2 endosomal sorting and plant immunity. *PLoS Genet*, **9**, e1004035.
- Stenzel, I., Ischebeck, T., Konig, S., Holubowska, A., Sporysz, M., Hause, B. and Heilmann, I. (2008) The type B phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 3 is essential for root hair formation in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, **20**, 124-141.
- Stenzel, I., Ischebeck, T., Quint, M. and Heilmann, I. (2011) Variable Regions of PI4P 5-Kinases Direct PtdIns(4,5)P(2) Toward Alternative Regulatory Functions in Tobacco Pollen Tubes. *Frontiers in plant science*, **2**, 114.
- Stenzel, I., Ischebeck, T., Vu-Becker, L.H., Riechmann, M., Krishnamoorthy, P., Fratini, M. and Heilmann, I. (2020) Coordinated Localization and Antagonistic Function of NtPLC3 and PI4P 5-Kinases in the Subapical Plasma Membrane of Tobacco Pollen Tubes. *Plants (Basel)*, **9**.
- Stevenson-Paulik, J., Bastidas, R.J., Chiou, S.T., Frye, R.A. and York, J.D. (2005) Generation of phytate-free seeds in Arabidopsis through disruption of inositol polyphosphate kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 12612-12617.
- Synek, L., Pleskot, R., Sekeres, J., Serrano, N., Vukasinovic, N., Ortmannova, J., Klejchova, M., Pejchar, P., Batystova, K., Gutkowska, M., Jankova-Drdova, E., Markovic, V., Pecenkova, T., Santrucek, J., Zarsky, V. and Potocky, M. (2021) Plasma membrane phospholipid signature recruits the plant exocyst complex via the EXO70A1 subunit.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **118**.
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2006) *Plant Physiology, Fourth Edition* Sunderland: Sinauer Associates, Inc. .
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., FilipSKI, A. and Kumar, S.** (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, **30**, 2725-2729.
- Tejos, R., Sauer, M., Vanneste, S., Palacios-Gomez, M., Li, H., Heilmann, M., van Wijk, R., Vermeer, J.E., Heilmann, I., Munnik, T. and Friml, J.** (2014) Bipolar Plasma Membrane Distribution of Phosphoinositides and Their Requirement for Auxin-Mediated Cell Polarity and Patterning in Arabidopsis. *The Plant cell*, **26**, 2114-2128.
- Thole, J.M. and Nielsen, E.** (2008) Phosphoinositides in plants: novel functions in membrane trafficking. *Current opinion in plant biology*, **11**, 620-631.
- Thole, J.M., Vermeer, J.E., Zhang, Y., Gadella, T.W., Jr. and Nielsen, E.** (2008) Root hair defective4 encodes a phosphatidylinositol-4-phosphate phosphatase required for proper root hair development in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell*, **20**, 381-395.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, **22**, 4673-4680.
- Torres, M.A.** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant*, **138**, 414-429.
- Trempel, F., Kajiura, H., Ranf, S., Grimmer, J., Westphal, L., Zipfel, C., Scheel, D., Fujiyama, K. and Lee, J.** (2016) Altered glycosylation of exported proteins, including surface immune receptors, compromises calcium and downstream signaling responses to microbe-associated molecular patterns in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol*, **16**, 31.
- Trujillo, M.** (2016) Analysis of the Immunity-Related Oxidative Bursts by a Luminol-Based Assay. *Methods in molecular biology*, **1398**, 323-329.
- Underwood, W. and Somerville, S.C.** (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot*, **59**, 3501-3508.
- van den Bogaart, G., Meyenberg, K., Risselada, H.J., Amin, H., Willig, K.I., Hubrich, B.E., Dier, M., Hell, S.W., Grubmuller, H., Diederichsen, U. and Jahn, R.** (2011) Membrane protein sequestering by ionic protein-lipid interactions. *Nature*, **479**, 552-555.
- van der Burgh, A.M., Postma, J., Robatzek, S. and Joosten, M.** (2019) Kinase activity of SOBIR1 and BAK1 is required for immune signalling. *Molecular plant pathology*, **20**, 410-422.
- van der Luit, A.H., Piatti, T., van Doorn, A., Musgrave, A., Felix, G., Boller, T. and Munnik, T.** (2000) Elicitation of suspension-cultured tomato cells triggers the formation of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate. *Plant physiology*, **123**, 1507-1516.
- van Leeuwen, W., Okresz, L., Bogre, L. and Munnik, T.** (2004) Learning the lipid language of plant signalling. *Trends in plant science*, **9**, 378-384.
- van Leeuwen, W., Vermeer, J.E., Gadella, T.W., Jr. and Munnik, T.** (2007) Visualization of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the plasma membrane of suspension-cultured tobacco BY-2 cells and whole Arabidopsis seedlings. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **52**, 1014-1026.

- van West, P., de Jong, A.J., Judelson, H.S., Emons, A.M. and Govers, F. (1998) The ipiO gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fungal genetics and biology : FG & B*, **23**, 126-138.
- Vermeer, J.E., Thole, J.M., Goedhart, J., Nielsen, E., Munnik, T. and Gadella, T.W., Jr. (2009) Imaging phosphatidylinositol 4-phosphate dynamics in living plant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **57**, 356-372.
- Voigt, C.A. (2014) Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in plant science*, **5**, 168.
- Vossen, J.H., Abd-El-Halim, A., Fradin, E.F., van den Berg, G.C., Ekengren, S.K., Meijer, H.J., Seifi, A., Bai, Y., ten Have, A., Munnik, T., Thomma, B.P. and Joosten, M.H. (2010) Identification of tomato phosphatidylinositol-specific phospholipase-C (PI-PLC) family members and the role of PLC4 and PLC6 in HR and disease resistance. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **62**, 224-239.
- Wang, S., Boevink, P.C., Welsh, L., Zhang, R., Whisson, S.C. and Birch, P.R.J. (2017) Delivery of cytoplasmic and apoplastic effectors from *Phytophthora infestans* haustoria by distinct secretion pathways. *The New phytologist*, **216**, 205-215.
- Wang, W., Liu, N., Gao, C., Cai, H., Romeis, T. and Tang, D. (2020) The Arabidopsis exocyst subunits EXO70B1 and EXO70B2 regulate FLS2 homeostasis at the plasma membrane. *The New phytologist*, **227**, 529-544.
- Wang, Y., Li, X., Fan, B., Zhu, C. and Chen, Z. (2021) Regulation and Function of Defense-Related Callose Deposition in Plants. *Int J Mol Sci*, **22**.
- Wang, Y., Xu, Y., Sun, Y., Wang, H., Qi, J., Wan, B., Ye, W., Lin, Y., Shao, Y., Dong, S., Tyler, B.M. and Wang, Y. (2018) Leucine-rich repeat receptor-like gene screen reveals that *Nicotiana glauca* RXEG1 regulates glycoside hydrolase 12 MAMP detection. *Nat Commun*, **9**, 594.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, **27**, 581-590.
- Williams, M.E., Torabinejad, J., Cohick, E., Parker, K., Drake, E.J., Thompson, J.E., Hortter, M. and Dewald, D.B. (2005) Mutations in the Arabidopsis phosphoinositide phosphatase gene SAC9 lead to overaccumulation of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> and constitutive expression of the stress-response pathway. *Plant physiology*, **138**, 686-700.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S. and Shirasu, K. (2011) Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 14682-14687.
- Yamaguchi, T., Minami, E., Ueki, J. and Shibuya, N. (2005) Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol*, **46**, 579-587.
- Yang, F., Kimberlin, A.N., Elowsky, C.G., Liu, Y., Gonzalez-Solis, A., Cahoon, E.B. and Alfano, J.R. (2019) A Plant Immune Receptor Degraded by Selective Autophagy. *Molecular plant*, **12**, 113-123.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. and Sheen, J. (2007) Arabidopsis mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, **2**, 1565-1572.

- Yuan, P., Jauregui, E., Du, L., Tanaka, K. and Poovaiah, B.W.** (2017) Calcium signatures and signaling events orchestrate plant-microbe interactions. *Current opinion in plant biology*, **38**, 173-183.
- Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M., Wang, R., Wang, L., Welti, R., Zhang, W. and Wang, X.** (2009) Phospholipase  $\alpha 1$  and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant cell*, **21**, 2357-2377.
- Zhao, Y., Yan, A., Feijo, J.A., Furutani, M., Takenawa, T., Hwang, I., Fu, Y. and Yang, Z.** (2010) Phosphoinositides regulate clathrin-dependent endocytosis at the tip of pollen tubes in Arabidopsis and tobacco. *The Plant cell*, **22**, 4031-4044.
- Zhong, R., Burk, D.H., Morrison, W.H., 3rd and Ye, Z.H.** (2004) FRAGILE FIBER3, an Arabidopsis gene encoding a type II inositol polyphosphate 5-phosphatase, is required for secondary wall synthesis and actin organization in fiber cells. *The Plant cell*, **16**, 3242-3259.
- Zhong, R., Burk, D.H., Nairn, C.J., Wood-Jones, A., Morrison, W.H., 3rd and Ye, Z.H.** (2005) Mutation of SAC1, an Arabidopsis SAC domain phosphoinositide phosphatase, causes alterations in cell morphogenesis, cell wall synthesis, and actin organization. *The Plant cell*, **17**, 1449-1466.
- Zhong, R. and Ye, Z.H.** (2003) The SAC domain-containing protein gene family in Arabidopsis. *Plant physiology*, **132**, 544-555.
- Zhong, R. and Ye, Z.H.** (2004) Molecular and biochemical characterization of three WD-repeat-domain-containing inositol polyphosphate 5-phosphatases in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1720-1728.
- Zhou, J.J. and Luo, J.** (2018) The PIN-FORMED Auxin Efflux Carriers in Plants. *Int J Mol Sci*, **19**.

---

## Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Juliane Rausche (Dipl.-Biol.)

Nationalität: deutsch

Geschlecht: weiblich

### Ausbildung & wissenschaftlicher Werdegang

05/2018 - 10/2018	IHK-zertifizierte Fortbildung zur Expertin für Geoinformationssysteme, Codematix GmbH, Jena
01/2013 – 04/2018	Doktorandin am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) Abteilung „Stress- und Entwicklungsbiologie“ Forschungsgruppe „Induzierte Pathogenabwehr“
08/2012 – 01/2013	Gastwissenschaftlerin (EU-Stipendiat „Leonardo da Vinci“) am Institut für Pflanzliche Molekular-Biologie, České Budějovice, Abteilung Molekulare Genetik
04/2012 – 08/2012	Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Pflanzenphysiologie, MLU Halle-Wittenberg
03/2011 – 02/2012	Diplomarbeit in der Abteilung Pflanzenphysiologie bei Prof. Dr. Humbeck, MLU Halle-Wittenberg Thema:
10/2006 - 01/2012	Diplomstudium Biologie, MLU Halle-Wittenberg
10/2005 - 09/2006	Diplomstudium Biomathematik, Universität Greifswald
2005	Abitur am Gymnasium am Markt, Hettstedt

---

## Publikationen und Präsentationen

### Fachartikel

**Rausche, J., Stenzel, I., Stauder, R., Fratini, M., Trujillo, M., Heilmann, I. and Rosahl, S.** (2021) A phosphoinositide 5-phosphatase from *Solanum tuberosum* is activated by PAMP-treatment and may antagonize phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate at *Phytophthora infestans* infection sites. *The New phytologist*, **229**, 469-487.

**Zschesche, W., Barth, O., Daniel, K., Bohme, S., Rausche, J. and Humbeck, K.** (2015) The zinc-binding nuclear protein HIPP3 acts as an upstream regulator of the salicylate-dependent plant immunity pathway and of flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist*, **207**, 1084-1096.

**J. Matousek, S. Radisek, J. Jakse, G.S. Duraisamy, K. Uhlířová, L. Orctová, P. Svoboda, J. Patzak, J. Rausche** (2013) Biolistic Transfer of Hop Viroid Disease Syndrome from Slovenian Cultivar 'Celeia' to Czech Hop 'Osvald's 72': Pathogenesis Symptoms and Identification of Dominant Sequence upon Transfer of HpSVd Component. *Acta Horticulturae*,. **1010**, 121-127.

### Posterpräsentationen

**Juliane Rausche, Ron Stauder, Ingo Heilmann, Sabine Rosahl.** The role of phosphoinositides in Pep-13-mediated defense responses. 9<sup>th</sup> Plant Science Students Conference (PSSC), IPB Halle (Saale) 2013

**Juliane Rausche, Ron Stauder, Ingo Heilmann, Sabine Rosahl.** The role of phosphoinositides in Pep-13-mediated defense responses. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Rhodos, (Griechenland) 2014

**Juliane Rausche, Ingo Heilmann, Sabine Rosahl.** Phosphoinositides in pathogen-mediated defense responses in potato. Plant Lipids: Structure, Metabolism & Function, Gordon Research Conference, Galveston, Texas (USA) 2015

**Juliane Rausche, Linda Nietzschmann, Ingo Heilmann, Sabine Rosahl.** PAMP-mediated pathogen defense in *Solanum tuberosum*. Internationales SFB-Meeting, Halle (Saale), Deutschland, 2015 (Poster)

---

## Eidesstattliche Erklärung

Sehr geehrte Damen und Herren,  
hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe von mir verfasst wurde. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Mit dieser Dissertationsschrift bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung eines Doktorgrades.

Halle (Saale), den

---

Juliane Rausche

---

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei alle namentlich und nicht namentlich genannten bedanken, die in den vergangenen Jahren zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen voran möchte ich Prof. Dr. Sabine Rosahl und dem zu früh verstorbenen Prof. Dr. Dierk Scheel danken, die mir die Promotion im Rahmen des SFB648 und darüber hinaus ermöglicht haben. Dies schließt nicht nur die Betreuung und das Überlassen des interessanten Themas, sondern auch die zahlreichen Diskussionen, Ratschläge und Freiheiten, die mir beide ermöglicht haben ein. Prof. Dr. Rosahl möchte ich zusätzlich für die nette Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, ein stets offenes Ohr und die zahlreichen Ideen danken.

Ebenfalls großer Dank geht an Prof. Dr. Ingo Heilmann, der als mein Mentor im Rahmen des SFB 648 und auch als Kooperationspartner durch konstruktive Diskussion zum Gelingen dieser Arbeit beitrug. Beiden, Prof. Dr. Rosahl und Prof. Dr. Heilmann, gebührt auch ein großer Dank für ihre stets positive Sichtweise, durch die ich jede Besprechung motiviert verließ.

Allen Gutachtern der vorliegenden Arbeit danke ich für Ihre aufgebrachte Zeit zur Begutachtung der Arbeit.

Dr. Irene Stenzel, Dr. Katharina Bürstenbinder und Dr. S. Marillonnet danke ich für die Zurverfügungstellung für diese Arbeit wichtiger Vektoren. Prof. Dr. Marco Trujillo danke ich für den FLS2-Antikörper. Dr. Yasin Dagdas danke ich für den *P. infestans* Isolat 88069. Dr. Gerd Hause danke ich für die elektronenmikroskopische Analysen.

Dr. Jennifer Lerche, Dr. Tobias Heinz, Dr. Irene Stenzel, Dr. Franziska Meyer, Dr. Katharina Gerth und Dr. Mareike Heilmann danke ich für die freundliche Aufnahme als Laborgast und die Hilfe bei der Aufklärung der enzymatischen Aktivität.

Der gesamten, nun ehemaligen, Arbeitsgruppe „Induzierte Pathogenabwehr“ (Desy, Ulrike, Andreas, Linda, Melli, Ramona) danke ich für die schöne Arbeitsatmosphäre, die auch durch Spaß bei der Arbeit und der gemeinsamen Kaffeepause mit den Kolleginnen und Kollegen aus der AG „Zelluläre Signaltransduktion“ geschaffen wurde. Ihnen und allen weiteren Kolleginnen und Kollegen aus Haus C möchte ich auch für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung im Laboralltag danken. Besonderer Dank gilt Ulrike Smolka für die bis zuletzt unermüdliche Hilfsbereitschaft bei methodischen Fragen. Ebenso möchte ich Dr. Lennart Eschen-Lippold für sein immer „offenes Ohr“ bei methodischen Problemen danken. Außerdem danke ich allen Gärtnerinnen und Gärtnern, IT-Fachleuten, Handwerkern, der Verwaltung für ihre Unterstützung im Arbeitsalltag.

Meiner Familie und Freunden danke ich für ihr Verständnis und liebevolle Ermutigung. Dabei gilt der größte Dank Paul, der mich immer geduldig bei allen Entscheidungen unterstützt, und Hermann. Danke dafür, dass ihr zwei so wunderbar seid und dass ihr mir die notwendige Zeit und Kraft gegeben habt, diese Arbeit abzuschließen.