

**„Die Reaktionen von *Arabidopsis thaliana* auf ein  
nekroseinduzierendes Protein aus *Phytophthora sojae* (PsojNip)“**

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

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

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

von

Frau Franziska Handmann  
geb. am: 18.01.1979 in: Meißen

Gutachter /in

1. Prof. Dr. D. Scheel, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle
2. Prof. Dr. W. Roos, Martin-Luther-Universität Halle
3. PD Dr. E. Glawischnig, Technische Universität München

Halle (Saale), 05.11.2009



## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	
<b>1.1</b>	<b>Das grundlegende Prinzip der Pathogenabwehr</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Die aktivierten Signalwege</b>	<b>3</b>
1.2.1	Die frühen Signaltransduktionswege	3
1.2.2	Die Phytohormone	6
1.2.3	Die antimikrobiellen Phytoalexine	11
1.2.4	Änderungen des Transkriptionsprofils	13
1.2.5	Der Zelltod bei inkompatiblen und kompatiblen Interaktionen	14
<b>1.3</b>	<b>Die Pathogenerkennung</b>	<b>16</b>
1.3.1	Die Induktion von PTI durch exogene und endogene Elizitoren	16
1.3.2	Die Induktion der ETI durch Avr- und R-Proteine	18
1.3.3	Toxine und andere Effektoren	19
<b>1.4</b>	<b>PsojNip und PaNie als Mitglieder der NLP-Familie</b>	<b>20</b>
<b>1.5</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>24</b>
2.1.1	Chemikalien	24
2.1.2	Plasmide	24
2.1.3	Oligonukleotide	25
2.1.4	Bakterien	26
2.1.5	Pflanzen	26
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>27</b>
2.2.1	Kultivierung von Pflanzen und Zellkulturen	27
2.2.1.1	<i>Anzucht von Arabidopsis-Pflanzen</i>	27
2.2.1.2	<i>Zellsuspensionskulturen</i>	28
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	28
2.2.2.1	<i>Plasmidpräparation</i>	28
2.2.2.2	<i>Transformation von E. coli</i>	28
2.2.2.3	<i>Polymerasekettenreaktion</i>	29
2.2.2.4	<i>Restriktionsverdau</i>	29

2.2.2.5	<i>Auftrennung von DNA-Fragmenten</i>	29
2.2.2.6	<i>Sequenzierung von Plasmid-DNA</i>	30
2.2.2.7	<i>Herstellung von Expressionsvektoren für His<sub>6</sub>- und GST-fusioniertes PsojNip</i>	30
2.2.2.8	<i>Ortsgerichtete Mutagenese</i>	30
2.2.3	<b>Proteinmethoden</b>	30
2.2.3.1	<i>Expression von PsojNip und PaNie</i>	30
2.2.3.2	<i>Reinigung von inclusion bodies</i>	30
2.2.3.3	<i>Solubilisierung der inclusion bodies</i>	31
2.2.3.4	<i>Rückfaltungsanalysen</i>	31
2.2.3.5	<i>Rückfaltung der denaturierten Proteine und Aufbereitung der nativen Proteine</i>	32
2.2.3.6	<i>Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial</i>	32
2.2.3.7	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	32
2.2.3.8	<i>Eindimensionale denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</i>	33
2.2.3.9	<i>Färbung von Polyacrylamidgelen</i>	33
2.2.3.10	<i>Immunodetektion von Proteinen</i>	34
2.2.3.11	<i>Proteolytischer Verdau</i>	35
2.2.4	<b>Untersuchung der aktivierten Abwehrreaktionen</b>	35
2.2.4.1	<i>Elizitierung von Pflanzen und Suspensionskulturen</i>	35
2.2.4.2	<i>Detektion des Zelltodes</i>	35
2.2.4.3	<i>Bestimmung des Anstiegs der zytosolischen Kalziumkonzentration</i>	36
2.2.4.4	<i>Bestimmung des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	36
2.2.4.5	<i>Bestimmung der Salicylsäurekonzentration</i>	37
2.2.4.6	<i>Bestimmung der JA- und OPDA-Konzentration</i>	38
2.2.4.7	<i>Bestimmung des Camalexingehaltes in Arabidopsis-Pflanzen</i>	39
2.2.4.8	<i>Bestimmung von Phytoalexinen im Medium von Petersiliezellkulturen</i>	39
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Die Expression und Renaturierung von PsojNip</b>	<b>40</b>
3.1.1	Die Proteine PsojNip und PaNie im Vergleich	40
3.1.2	Studien zur löslichen Expression von PsojNip in <i>E.coli</i>	41
3.1.3.	Analyse zur Rückfaltung von PsojNip	44
3.1.3.1	<i>Theorie der in vitro-Faltung</i>	44
3.1.3.2	<i>Der Einfluss des Denaturierungsgagens auf die in vitro-Faltung</i>	45
3.1.3.3	<i>Bestimmung der optimalen Faltungsbedingungen</i>	47

3.1.4	Die Stabilität von PsojNip und PaNie	51
3.1.4.1	<i>Die Hitzestabilität der Proteine</i>	51
3.1.4.2	<i>Die Proteasestabilität der Proteine</i>	53
3.1.5	Der Einfluss der Cysteine auf die <i>in vitro</i> -Faltung und die Aktivität von PsojNip	54
<b>3.2</b>	<b>Die Reaktionen von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Elizitierung mit PsojNip und PaNie im Vergleich zu flg22</b>	<b>55</b>
3.2.1	Der durch PsojNip und PaNie ausgelöste Zelltod	55
3.2.2	Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration	59
3.2.3	Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	60
3.2.4	Die Aktivierung von MAP-Kinasen	64
3.2.5	Die Induktion der Salicylsäureakkumulation	65
3.2.6	Die Induktion der Jasmonatakkumulation	70
3.2.7	Die Induktion der Phytoalexinakkumulation in <i>Arabidopsis thaliana</i> und Petersilie	72
3.2.7.1	<i>Die Optimierung der Camalexinbestimmung</i>	72
3.2.7.2	<i>Die Camalexinkonzentrationen in <i>A. thaliana</i>-Pflanzen und die Furanocoumarinkonzentrationen in Petersiliezellkultur</i>	73
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Expression, <i>in vitro</i>-Faltung und Stabilität von PsojNip</b>	<b>76</b>
4.1.1	Eine lösliche Expression von PsojNip in <i>E. coli</i> ist nicht möglich	76
4.1.2	Die Analyse zur <i>in vitro</i> -Faltung von PsojNip	78
4.1.2.1	<i>Die Wahl des geeigneten Solubilisierungsmittels</i>	78
4.1.2.2	<i>Die Rückfaltungsanalyse</i>	78
4.1.3	Die Funktion der Cysteine für die Aktivität von PsojNip	80
4.1.4	Die Stabilität von PsojNip und dem homologen Protein PaNie	81
<b>4.2</b>	<b>Die durch PsojNip und PaNie aktivierten Abwehrmechanismen im Vergleich zur Elizitierung mit dem PAMP flg22</b>	<b>82</b>
4.2.1	Die aktivierten Abwehrreaktionen	82
4.2.1.1	<i>Das Zusammenspiel der frühen Signaltransduktionswege in der Antwort auf Elizitierung mit PsojNip, PaNie und flg22</i>	83
4.2.1.2	<i>NLPs und flg22 induzieren unterschiedlich die Akkumulation von Phytohormonen</i>	85
4.2.1.3	<i>Die Rolle von R-Gen-beeinflussenden Faktoren auf die flg22-induzierte Antwort ist unterschiedlich zur Antwort auf PsojNip und PaNie</i>	90

4.2.1.4	<i>Der Zelltod, induziert durch PsojNip und PaNie, ist unabhängig von bekannten Regulationsmechanismen</i>	91
4.3	<b>PsojNip und PaNie: PAMPs, Effektoren oder Toxine?</b>	<b>92</b>
4.4	<b>Flg22 und die NLPs PsojNip und PaNie induzieren verschiedene Reaktionen in <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>97</b>
5	<b>Zusammenfassung</b>	<b>99</b>
6	<b>Literatur</b>	<b>100</b>
7	<b>Anhang</b>	<b>125</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1	Schematische Darstellung der pflanzlichen Abwehr	3
Abb. 1-2	Die Biosynthese der Salicylsäure	7
Abb. 1-3	Die Biosynthese der Jasmonsäure	9
Abb. 1-4	Die Biosynthese von Ethylen	10
Abb. 1-5	Die Biosynthese von Camalexin in <i>A. thaliana</i>	12
Abb. 1-6	Zusammenfassung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Genotypen	23
Abb. 2-1	Schematische Darstellung des Gradienten zur Bestimmung der SA- und Camalexinkonzentration	37
Abb. 3-1	Sequenzvergleich von PsojNip und PaNie mit „ExpASY clustal 2.0.8 multiple sequence alignment“	41
Abb. 3-2	Die Expression von PsojNip unter verschiedenen Bedingungen	42
Abb. 3-3	Versuche zur löslichen Expression von PsojNip und <i>inclusion body</i> -Reinigung	43
Abb. 3-4	Präzipitatbildung bei der <i>in vitro</i> -Faltung	46
Abb. 3-5	Zusammenfassung der getesteten Renaturierungslösungen und Darstellung der positiven Rückfaltungsergebnisse	49
Abb. 3-6	Optimierung der Rückfaltungsbedingungen	50
Abb. 3-7	Die Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Hitzeeinwirkung	51
Abb. 3-8	Die nekrosebildende Aktivität in Abhängigkeit von der Hitzeeinwirkung	52
Abb. 3-9	Die extrazelluläre H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Konzentration in Abhängigkeit von der Hitzeeinwirkung	52
Abb. 3-10	Die proteolytische Spaltung von PsojNip und PaNie	53
Abb. 3-11	Der Einfluss der Cysteine auf die Faltbarkeit und die Aktivität von PsojNip	54
Abb. 3-12	Die konzentrationsabhängige Zelltodausprägung durch PsojNip und PaNie	55
Abb. 3-13	Die Nekrosebildung nach Infiltration von je 2 µM PsojNip oder PaNie	56
Abb. 3-14	Die Zelltodinduktion in den verschiedenen Genotypen 4 h nach PsojNip- oder PaNie-Behandlung	57

Abb. 3-15	Zeitverlauf des Zelltodes ausgelöst durch PsojNip und PaNie in verschiedenen Genotypen	58
Abb. 3-16	Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration	59
Abb. 3-17	Die Induktion des <i>oxidative burst</i>	61
Abb. 3-18	Die H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Produktion der verschiedenen Genotypen nach Elizitierung mit flg22 und PsojNip	62
Abb. 3-19	DAB-Färbungen ausgewählter Genotypen nach Elizitierung mit je 2 µM PsojNip und PaNie	63
Abb. 3-20	Die Aktivierung von MAP-Kinasen nach Elizitierung der Genotypen mit 2 µM flg22, PsojNip oder PaNie	65
Abb. 3-21	Die Konzentration freier und konjugierter SA in Col-0 24 h nach Infiltration von Wasser, 2 µM flg22, PsojNip oder PaNie	66
Abb. 3-22	Die Konzentrationen freier und konjugierter SA in den verschiedenen Genotypen 24 h nach Behandlung mit Wasser, 2 µM flg22, PsojNip PaNie	68
Abb. 3-23	Die Konzentrationen von freier und konjugierter Salicylsäure in Ler-0 <i>sgf1b</i> und <i>rar1</i> 24 h nach Elizitierung mit 2 µM flg22, PsojNip und PaNie	69
Abb. 3-24	Die Konzentrationen von JA und OPDA in Wildtyppflanzen 24 h nach Infiltration von Wasser, 2 µM flg22, PsojNip und PaNie	70
Abb. 3-25	Die Konzentrationen von JA und OPDA in den verschiedenen Genotypen 24 h nach Behandlung mit Wasser, 2 µM flg22, PsojNip oder PaNie	71
Abb. 3-26	Optimierung der Camalexinbestimmung	73
Abb. 3-27	Die Phytoalexinkonzentration in <i>A. thaliana</i> -Pflanzen und Petersiliezell-Kulturen 24 h nach Elizitierung mit PsojNip, PaNie und flg22 oder Pep13	74
Abb. 3-28	Die Camalexinkonzentration in den verschiedenen Genotypen	75
Abb. 4-1	Das Zusammenspiel der frühen Signalwege nach Elizitierung mit flg22, PsojNip und PaNie	85
Abb. 4-2	Modell der Antworten von <i>A. thaliana</i> auf Elizitierung mit flg22, PsojNip und PaNie	98

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Beispiele exogener Elizitoren	16
Tabelle 1-2	Zusammenfassung der durch NLPs ausgelösten Abwehrreaktionen	21
Tabelle 2-1	Verwendete Plasmide	24
Tabelle 2-2	Verwendete Oligonukleotide	25
Tabelle 2-3	Verwendete Bakterienstämme	26
Tabelle 2-4	Verwendete Genotypen	26
Tabelle 3-1	Zusammenfassung der gebräuchlichsten Additive	44
Tabelle 4-1	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchung der Hitze- und Proteasestabilität von PsojNip und PaNie	81

**Abkürzungen**

ABA	Abszinsinsäure	ETR	<i>ethylene response</i>
Abb.	Abbildung	ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>
Arg	Arginin	EXPASY	<i>Expert Protein Analysis System</i>
ACC	1-Aminocyclopropan- 1carbonsäure	FB1	Fumonisin B1
ACS	ACC-Synthase	FLS2	<i>flagellin sensitive</i>
ACO	ACC-Oxidase	FRK	<i>flg22-induced receptor like kinase</i>
AOC	Allenoxidcylase	g	Erdbeschleunigung (9,81 m x s <sup>-1</sup> )
AOS	Allenoxidsynthase	Gdm-Cl	Guanidinium Hydrochlorid
ATP	Adenosintriphosphat	GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathicity</i>
Avr	Avirulenz	GSH	Glutathion, reduziert
Brij58	Polyoxyethylen-20-cetyl-ether	GSH1	$\gamma$ -Glutamylsynthetase
bzw.	Beziehungsweise	GSSG	Glutathion, oxidiert
C	Cystein	GST	Glutathion-S-Transferase
Ca.	circa	HIN	<i>harpin-induced protein</i>
CC	<i>coiled-coil</i>	His	Histidin
CD	Circulardichroismus	HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
CDPK	<i>Calcium-dependent protein kinase</i>	HSP	Hitzeschockprotein
CHIB	basische Chitinase	HR	Hypersensitive Reaktion
COI1	<i>Coronatin-insensitive 1</i>	HRP	Meerrettichperoxidase ( <i>Horserraddish Peroxidase</i> )
Col-0	Columbia (Ökotyp)	HSR	<i>hypersensitive related</i>
Cys	Cystein	HST	<i>host-selective toxin</i>
DAB	Diaminobenzidin	IAOX	Indol-3-acetaldoxim
DAMP	<i>damage associated molecular pattern</i>	IB	<i>inclusion body</i>
DDE	<i>delayed dehiscence</i>	ICS1	Isochorismatsynthase
DNase	Desoxyribonuclease	Ile	Isoleucin
dNTP	Desoxyribonukleotide	I-Medium	Induktionsmedium
DPI	Diphenyliodonium	INF1	Elicitin aus <i>Phytophthora infestans</i>
DTT	Dithiothreitol	IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
dw	Trockengewicht ( <i>dry weight</i> )	IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-triphosphat
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>	ISR	induzierte systemische Resistenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	JA	Jasmonsäure
EDS	<i>enhanced disease susceptibility</i>	JAZ	<i>Jasmonate-ZIM-domain protein</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
EIN	ethyleninsensitiv	LC-MS/MS	<i>liquid chromatography</i> gekoppelt mit Massenspektrometrie
EIL	<i>ethylene-insensitive like</i>	Ler-0	Landsberg (Ökotyp)
EMS	Ethylmethansulfonat	LOX	Lipoxygenase
ERF1	<i>Ethylene responsive factor</i>		
ETI	<i>effector triggered immunity</i>		

LRR	<i>leucine-rich repeat</i>	PEG	Polyethylenglykol
MAMP	<i>microbial- associated molecular pattern</i>	pI	isoelektrischer Punkt
MAPK	<i>Mitogen activated kinase</i>	p.i.	<i>post induction</i>
MAP2K	<i>Mitogen activated kinasekinase</i>	PI	Phosphatidylinositol
MAP3K	<i>Mitogen activated kinasekinase</i>	PIN	Proteinaseinhibitor
MeOH	Methanol	PIP	Phosphatidylinositol-4-phosphat
MES	2-(N-Morpholino)- ethansulfonsäure	PIP2	Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat
MS	Murashige and Skoog	PLC	Phospholipase C
MGDG	Monogalactosyldiacylglycerol	PLD	Phospholipase D
MPK	MAP-Kinase	PM	Plasmamembran
NADPH	Nicotinamidadeninukleotid- phosphat	PR-Gene	<i>Pathogen-related genes</i>
NB	Nukleotidbindestelle	PsojNip	<i>Necrosis inducing protein1</i> aus <i>Phytophthora sojae</i>
NEP	<i>Necrosis and Ethylene inducing protein1</i>	PTI	<i>PAMP-triggered immunity required for Mla12 resistance</i>
NDR1	<i>Non-race specific disease resistance</i>	RAR1	<i>respiratory burst oxidase homologue</i>
Nip	<i>Necrosis inducing protein1</i> aus <i>Phytophthora sojae</i>	RBOH	
NLP	<i>NEP1-like protein</i>	R-Gen	Resistenzgen
NO	Stickstoffmonoxyd	RIN	<i>RPM1-interacting receptor-like kinase</i>
NPP1	Nekroseinduzierendes Polypeptid aus <i>Phytophthora sojae</i>	RLK	
NPR1	<i>non-expressor of pr1</i>	RLE	Relative Lichteinheiten
OGA	Oligogalacturonid	RPM	<i>resistance to P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i>
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
OPDA	12-Oxo-Phytodiensäure	RP-HPLC	<i>Reversed Phase-HPLC</i>
OPR3	OPDA-Reduktase	RPP	<i>resistance to Hyaloperonospora parasitica</i>
OXI	<i>oxidative signal inducible</i>	RPS	<i>resistance to Pseudomonas syringae</i>
PA	Phosphatidylsäure	RPT	<i>resistance to P. syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PAD	<i>Phytoalexin deficient</i>	S	Serin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	SA	Salicylsäure
PAL	Phenylalaninammoniumlyase	SAG	glykosylierte Salicylsäure
PAMP	<i>pathogen- associated molecular pattern</i>	SAM	S-Adenosylmethionin
PaNie	<i>Necrosis inducing elicitor</i> aus <i>Pythium aphanidermatum</i>	SAR	Systemisch akquirierte Resistenz
PBS	<i>AvrpPHB susceptible 1</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
PC	Phosphatidylcholin	SGT1B	<i>suppressor of G<sub>2</sub>-allele of skp1</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>	Ser	Serin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	SID2	SA-Induktionsdefizient
PDF	<i>plant defensin 1</i>	SIPK	<i>salicylic acid-induced protein kinase</i>
		SOD	Superoxiddismutase
		Tab.	Tabelle
		TBST	<i>Tris buffered Saline</i>

TCA	Trichloressigsäure	VSP	vegetatives Speicherprotein
T-DNA	Transfer-DNA	% v/v	Volumen pro Volumen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl- Ethylendiamin	% w/v	Gewicht pro Volumen
Tg	Trockengewicht	WIPK	<i>wound-induced protein kinase</i>
THI	Thionin	z.B.	zum Beispiel
TIR	Toll- und Interleukin1-Rezeptor	ZK	Zellkern
Tris	Tris(hydroxymethyl- aminomethan)	<u>Pathogene</u>	
TTSS	<i>type-three secretion system</i>	<i>H. parasitica</i>	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>
u.a.	und andere	<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Tomate
ü.N.	über Nacht	<i>Psm</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. Maculicola
V, Val	Valin	<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
vs.	versus	<i>P.sojae</i>	<i>Phytophthora sojae</i>

# 1 Einleitung

Pflanzenkrankheiten als direkte Bedrohung der Lebenssituation wurden schon im Altertum intensiv untersucht. So beschrieb beispielsweise der Aristoteles-Schüler Theophrast (371-268 v. Chr.) in seinen Schriften „Die Geschichte der Pflanzen“ und „Die Lebensbedingungen der Pflanzen“ detailliert die Sortenanfälligkeit von Getreide gegenüber Pilzkrankheiten sowie deren Bekämpfungsmöglichkeiten. Zudem sind verschiedene Opferrituale bekannt. Eines der wichtigsten Feste der Römer war die „Robigalia“, bei dem die Göttin Robigo um Schutz des Getreides vor Krankheiten, vermutlich speziell des „roten“ Getreiderostes (robigo), angefleht wurde (Ploss, 1968).

Auch heute noch ist die Phytopathologie ein wichtiges Feld. Zwar ist man nicht mehr auf Götterbeschwörung angewiesen, aber um die großen jährlichen Ertragsverluste zu minimieren (*Phytophthora* verursacht z.B. 20 % Ernteeinbußen pro Jahr weltweit), ist ein intensiver Pflanzenschutzmitteleinsatz notwendig.

Ein Verständnis der molekularen Mechanismen von Resistenz und Suszeptibilität bietet die Möglichkeit, über den Einsatz gentechnisch veränderter Pflanzen die Verwendung chemischer Stoffe zu reduzieren.

## 1.1 Das grundlegende Prinzip der Pathogenabwehr

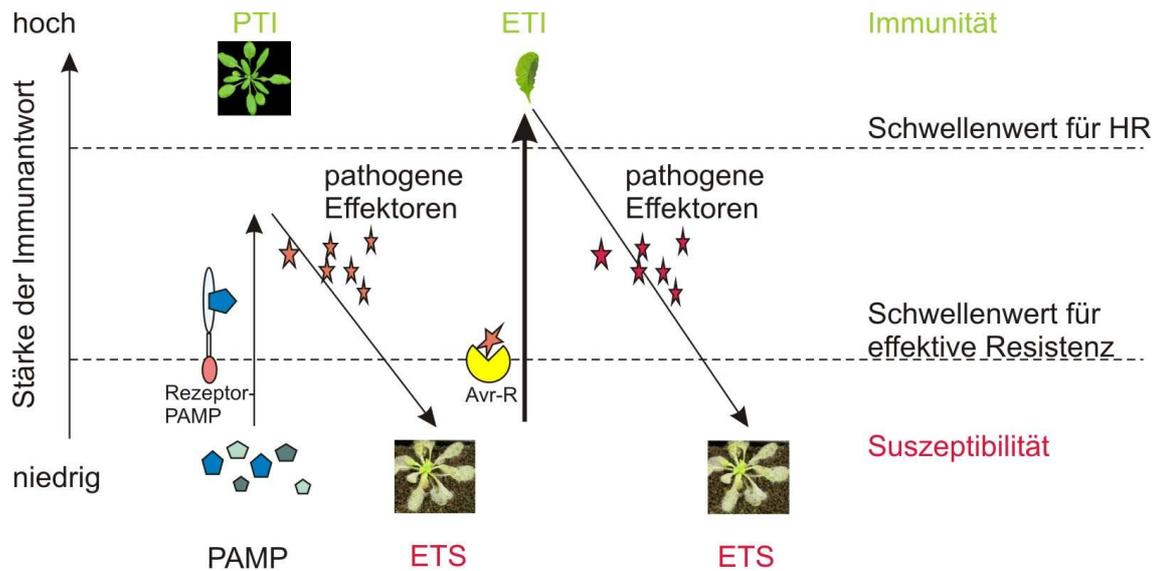
Pflanzen bieten Mikroorganismen durch ihren Nährstoffreichtum eine hervorragende Lebensgrundlage, weshalb sie sich ständig Angriffen ausgesetzt sehen. Letztendlich ist jedoch nur eine geringe Zahl von Krankheitserregern in der Lage, Pflanzen zu besiedeln. Die meisten Krankheitserreger scheitern an passiven, präformierten Abwehrmechanismen, die das Eindringen oder das Wachstum von Schädlingen erschweren. Neben physikalischen Barrieren, wie Epidermis oder Borke (Martin, 1964; Ride, 1983), gibt es eine Reihe permanent vorliegender Komponenten mit antimikrobieller Wirkung. Zu dieser Gruppe zählen z.B. Phenole, phenolische Glykoside oder Saponine. Diese befinden sich meist eingelagert in der Zellwand, den Vakuolen oder anderen Organellen (Ingham, 1973; Osbourn, 1996). Darüber hinaus haben Pflanzen im Laufe der Evolution komplexe induzierbare Abwehrmechanismen entwickelt, die die weitgehende Resistenz der Pflanzen sicherstellen. Hierbei wird grundlegend zwischen der *PAMP-triggered immunity* (PTI) und der *effector-triggered immunity* (ETI) unterschieden.

*PAMP-triggered immunity* stellt eine Verteidigung gegen eine Vielzahl der Angreifer dar. Wie der Name zeigt, ist für die Ausprägung dieser Resistenz die Erkennung des Pathogens anhand von *pathogen associated molecular pattern* (PAMP) notwendig. PAMPs gehören zu den Elizitoren, sind also Auslöser von Abwehrmechanismen (Ebel et al., 1997). Als PAMPs werden Moleküle von Pathogenen bezeichnet, die hochkonserviert und für das Überleben der Mikroben essentiell sind. Erkannt werden diese Strukturen über Rezeptoren (siehe Kapitel 1.3) (Felix, 1993; Nürnberger et al., 1994; Gomez-Gomez et al., 2000). Die Erkennung führt zur Aktivierung verschiedener Abwehrreaktionen, die das Eindringen von Krankheitserregern vermeiden oder das Wachstum einschränken sollen. In Kapitel 1.2 wird ausführlich auf die Reaktionen eingegangen.

Einige Pathogene konnten sich im Laufe der Evolution an die PTI adaptieren und entwickelten Virulenzfaktoren, die gezielt die pflanzliche Abwehr unterwandern, was zu einer als *effector-triggered susceptibility* (ETS) bezeichneten Suszeptibilität führt (Nomura et al., 2005; Nomura et al., 2006).

Durch diesen evolutionären Druck wiederum entwickelten sich bei Pflanzen spezifische Resistenzgene (R-Gene). Die Produkte der R-Gene erkennen durch direkte oder vermittelte Interaktion die Virulenzfaktoren von Pathogenen (Avr-Proteine). Dadurch kommt es zu einer Aktivierung von Abwehrreaktionen, die meist in einer hypersensitiven Reaktion (HR), einer Form des programmierten Zelltodes, resultieren. Diese *effector-triggered immunity* (ETI), ermöglicht einzelnen Sorten suszeptibler Pflanzenarten die erfolgreiche Abwehr von Krankheitserregern. H.H. Flor beschrieb die Gen-für-Gen-Hypothese als Grundlage für diese Resistenz (Flor, 1971).

Veranschaulichen lässt sich das Prinzip der Abwehr mit dem auf der nachfolgenden Seite dargestellten Zick-Zack-Schema nach Jones et al. (Abb. 1-1) (Jones et al., 2006).



**Abb. 1-1 Schematische Darstellung der pflanzlichen Abwehr**

Das dargestellte Schema wurde nach Jones et al. (2006) verändert. Die Erkennung von PAMPs durch die Pflanze induziert PTI. Können Pathogene durch Pathogenizitätsfaktoren PTI blockieren, ist die Pflanze suszeptibel (ETS). Bei der ETI exprimieren Pflanzen R-Gene, deren Genprodukte (R-Proteine) spezifisch die *avr*-Genprodukte von Krankheitserregern erkennen und somit Abwehrmechanismen auslösen. Manche Pathogene können auch ETI umgehen und Pflanzen erfolgreich besiedeln.

Die Fotos wurden entnommen:

Infizierte *Arabidopsis thaliana*: [www.biology.ed.ac.uk/research/institutes/plant](http://www.biology.ed.ac.uk/research/institutes/plant); nichtinfizierte *A. thaliana*: [www.zmbp.uni-tuebingen.de/PlantPhysiology](http://www.zmbp.uni-tuebingen.de/PlantPhysiology); Blatt mit HR: Freeman, B.C. and Beattie, G.A. 2008 "An Overview of Plant Defenses against Pathogens and Herbivores" The Plant Health Instruction.

## 1.2 Die aktivierten Signalwege

Welche Mechanismen bedingen die Resistenz von Pflanzen? Ionenströme, Kinaseaktivitäten, Aktivierung von Genen und Phytohormone u.a. bilden eine Signalkaskade, die grundsätzlich bei PTI und ETI ähnlich verläuft. Es wird aber davon ausgegangen, dass die Immunantwort bei ETI schneller und stärker erfolgt als bei PTI und mit einer hypersensitiven Reaktion einhergeht (Block et al., 2008). Im folgenden Kapitel sollen wichtige Reaktionen aufgezeigt und relevante Mutanten vorgestellt werden.

### 1.2.1 Die frühen Signaltransduktionswege der Abwehr

Die erste Response ist eine Änderung der Membranpermeabilität, die Ionenströme ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{H}^+$ -Einstrom sowie  $\text{K}^+$ - und  $\text{Cl}^-$ -Ausstrom) verursacht. Diese Modifikationen der zytosolischen Ionenzusammensetzung sind notwendig für die Aktivierung von Abwehrreaktionen (Atkinson et al., 1996; Jabs et al., 1997; Zimmermann et al., 1997; Blume et

al., 2000; Grant et al., 2000). Wird der Einstrom extrazellulären Kalziums durch den Kanalinhistor  $\text{LaCl}_3$  oder den Chelator EGTA verhindert, bleiben komplexe Abwehrantworten wie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) aus (Atkinson et al., 1990; Levine et al., 1996; Jiang et al., 2003). Detektiert wird der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration über kalziumbindende Proteine wie Kalmodulin oder kalziumabhängige Proteinkinasen (*calcium-dependent protein kinase*, CDPK), bei denen die Kalziumbindung über das sogenannte EF-Motiv erfolgt. Die biologische Relevanz der CDPKs in der Pathogenabwehr wurde von der Gruppe um Romeis gezeigt (Romeis et al., 2000; Romeis et al., 2001). Der durch  $\text{Ca}^{2+}$  eingeleitete Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration stimuliert eine weitere Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Levels (Levine et al., 1996), was vermutlich der Signalverstärkung dient.

Reaktive Sauerstoffspezies umfassen u.a.  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^-$  und werden als Nebenprodukte verschiedener Stoffwechselwege kontinuierlich gebildet. Die zügige Detoxifizierung z.B. durch Katalasen verhindert zytotoxische Effekte (Apel et al., 2004). Werden Pflanzen biotischem oder abiotischem Stress ausgesetzt, kommt es zu einem schnellen Anstieg der ROS-Konzentration, dem *oxidative burst*, hervorgerufen durch Oxidasen und Peroxidasen (Allan et al., 1997; Bolwell et al., 2002; Koch et al., 2006). Bei einem Pathogenangriff sind die wichtigsten ROS-Quellen membranständige NADPH-Oxidasen (Doke, 1983; Tenhaken et al., 1995; Torres et al., 1998), ähnlich den humanen gp91<sup>phox</sup>-Proteinen. Sie wandeln molekularen Sauerstoff unter Verbrauch von NADPH zu  $\text{O}_2^-$  um, was von Superoxiddismutasen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt wird.

Von den zehn NADPH-Oxidase-Homologen aus *Arabidopsis thaliana* (*respiratory burst oxidase homologue*, RBOH) (Torres et al., 2005) spielen RBOHD und RBOHF die wichtigste Rolle bei der Bildung von ROS als Antwort auf Pathogene. Dies wird anhand der Mutanten *atrbohD*, *atrbohF* und *atrbohD/F* deutlich, die eine stark reduzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Akkumulation nach Pathogenbefall zeigen (Torres et al., 2002). ROS, speziell  $\text{H}_2\text{O}_2$ , besitzen verschiedene Funktionen in der Zelle. Sie sind beispielsweise toxisch für Pathogene (Peng, 1992), verstärken die Zellwand durch oxidative Vernetzung (Bradley et al., 1992) und fungieren als intra- und interzelluläres Signal für HR, Salicylsäure- und Phytoalexinakkumulation (Degoussée, 1994; Levine et al., 1994). Eine Reduktion der ROS-Konzentration führt somit zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Bakterien und Oomyceten (Torres et al., 2002). Reguliert wird die ROS-Produktion sowohl durch Kalzium als auch durch Salicylsäure und Kinasen. So ist beispielsweise in Tomate und Tabak Kalzium in der Lage, *in vitro* RBOH-Proteine zu aktivieren (Sagi et al., 2001). Obwohl RBOH-Proteine zwei kalziumbindende EF-Motive im

N-Terminus aufweisen, scheint für die Aktivierung die direkte Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an RBOH nicht notwendig zu sein. Anhand von RBOH-Proteinen aus Reis konnte vielmehr gezeigt werden, dass durch den Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration eine CDPK-vermittelte Phosphorylierung des N-Terminus von RBOH erfolgt. Dadurch ist eine Interaktion des N-Terminus mit einer Rac-GTPase möglich, wodurch das RBOH-Protein aktiviert wird (Wong et al., 2007).

Die Wichtigkeit von Salicylsäure für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion wird in salicylsäureabbauenden *nabG*-Pflanzen deutlich. Bei diesem Genotyp ist die ROS-Produktion drastisch reduziert (Mur et al., 1997). Zudem wird die bakterieninduzierte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion durch Salicylsäure verstärkt (Kauss et al., 1995; Shirasu et al., 1997).

Von Desikan, Rentel und Zhang wird ein positiver Einfluss von Kinaseaktivitäten auf die ROS-Produktion diskutiert (Desikan et al., 2001; Rentel et al., 2004; Zhang et al., 2007).

Kaskaden von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinase-Kaskaden) sind generell für die pflanzliche Signaltransduktion essentiell. Durch die sequentielle Phosphorylierung der einzelnen Kaskadekomponenten (MAPKKK, MAPKK, MAPK) sowie des Zielproteins wird eine gezielte Informationsweitergabe ermöglicht. Eine Behandlung von *Arabidopsis thaliana* mit dem PAMP flg22 beispielsweise aktiviert eine MAP-Kinase-Kaskade bestehend aus einer noch nicht identifizierten MAP3K, den MAP2Ks MKK4 und MKK5 sowie den MAPKs MPK3 und MPK6. Außerdem ist eine Kaskade aus der MAP3K MEKK1, der MAP2K MKK1 und MPK4 bekannt (Nühse et al., 2000; Asai et al., 2002; Droillard et al., 2004; Ichimura et al., 2006; Suarez-Rodriguez et al., 2007). Dass die Aktivität von MAP-Kinase-Kaskaden für Stressantworten unabdingbar ist, zeigt die Mutante *mpk6*, die verstärkt sensitiv gegen *Hyaloperonospora parasitica* und *Pseudomonas syringae* pv. *Tomatoe* ist, sowie *mpk3* mit einer erhöhten Ozonsensitivität (Menke et al., 2004; Miles et al., 2005). Dies kann auf die Notwendigkeit von MAP-Kinase-Kaskaden für die Expression stressinduzierter Gene wie *WRKYs* oder *PR*-Genen zurückgeführt werden (Kapitel 1.2.4) (Asai et al., 2002; Kroj et al., 2003). Somit nehmen sie auch Einfluss auf die Signalweiterleitung von Salicylsäure und Jasmonsäure (Petersen et al., 2000; Takahashi et al., 2007).

Des Weiteren regulieren MAP-Kinase-Kaskaden die Bildung von Kallose. In *mek1*-Mutanten erfolgt beispielsweise die Kallosebildung konstitutiv (Suarez-Rodriguez et al., 2007). Kallose, ein (1-3)- $\beta$ -Glukan, wird als Antwort auf biotischen Stress zur Verstärkung der Zellwand gebildet (Aist, 1976). Die Synthese erfolgt über die (1,3)- $\beta$ -Glukansynthase und ist zudem abhängig von Kalzium und Salicylsäure (Schmele et al., 1990; Donofrio et al., 2001).

## 1.2.2 Die Phytohormone

Die gezielte Reaktion von Pflanzen auf verschiedene Stimuli wird durch ein Netzwerk unterschiedlicher Hormone geregelt. Im Hinblick auf die vorliegende Arbeit soll hier nur auf Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen eingegangen werden.

Salicylsäure (SA) ist ein Schlüsselmolekül in der Antwort auf biotrophe virulente und avirulente Mikroorganismen (Delaney et al., 1994). Durch Infektionen mit verschiedenen Pathogenen erhöhen sich die SA-Konzentrationen sowohl an der Infektionsstelle als auch systemisch in nichtinfizierten Geweben. Wird SA exogen appliziert, kommt es zur Induktion der Expression verschiedener Abwehrgene und erhöht die Resistenz der Pflanzen gegenüber Pathogenen (Ryals et al., 1996). Eine Reduktion des SA-Spiegels in Pflanzen zieht also eine verminderte Resistenz gegen einzelne Krankheitserreger nach sich. Das kann eindeutig bei *nabG*-Pflanzen beobachtet werden. *nabG*-Pflanzen exprimieren eine Salicylathydroxylase des Bakteriums *Pseudomonas putida*, die Salicylat zu Katechol abbaut (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Diese Pflanzen sind deshalb nicht in der Lage, SA zu akkumulieren und sind, einhergehend mit einer verringerten Expression der *pathogen-related genes* *PR1*, *PR2* und *PR5*, verstärkt suszeptibel gegen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psp*), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), *P. syringae* pv. *maculicola* (*Psm*) sowie gegen *Hyaloperonospora parasitica* (Delaney et al., 1994; van Wees et al., 2003). Eine Infektion von Pflanzen induziert auch in nicht befallenen Organen eine erhöhte Resistenz. Dieser Effekt wird als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) bezeichnet. Im Jahr 1990 wurde SA als für die SAR notwendige Substanz beschrieben (Metraux et al., 1990). Bestätigt wurde dies durch die Beobachtung, dass *nabG*-Pflanzen nicht in der Lage sind, SAR auszuprägen (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994). Erst 2007 konnte das Salicylsäurekonjugat Methylsalicylat als direktes Signalmolekül für die SAR in Tabak identifiziert werden (Park et al., 2007). Für die Ausprägung der SAR ist NPR1 (*non-expressor of pr1*) notwendig. Fehlt dieses Protein, ist die Expression verschiedener *PR*-Gene unterbunden und die Pflanze ist nicht in der Lage, eine SAR auszuprägen. Zudem ist sie wesentlich anfälliger gegen *Psm*-Befall (Cao et al., 1994; Pieterse et al., 2004).

Die Synthese der phenolischen Komponente SA kann ausgehend von Chorismat über zwei Wege erfolgen (Abb. 1-2). Die erste Möglichkeit ist die Bildung über den Phenylpropanoidweg, bei dem Phenylalanin durch die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) zu trans-Zimtsäure deaminiert wird (Koukol et al., 1961), welches weiter zu Salicylsäure umgewandelt wird (Yalpani et al., 1993). Der zweite Weg der SA-Biosynthese wurde 2001 von Wildermuth et al. beschrieben (Wildermuth et al. 2001). Bei diesem wird Chorismat über eine

chloroplastenlokalisierte Isochorismatsynthase (ICS1) zu Isochorismat umgewandelt (Wildermuth et al., 2001; Strawn et al., 2007), was von der Pyruvatlyase zu Salicylsäure und Pyruvat gespalten wird (Abb. 1-2). In einer EMS-Mutantenanalyse wurden von Nawrath et al. die SA-induktionsdefizienten Mutanten *sid1* und *sid2* identifiziert, die sowohl stark reduzierte SA-Level als auch eine erhöhte Anfälligkeit gegen avirulente *Pst* DC3000 und *H. parasitica* zeigen (Nawrath et al., 1999). Wildermuth konnte später nachweisen, dass *sid2* die für die SA-Biosynthese wichtige Isochorismatsynthase kodiert (Wildermuth et al., 2001).

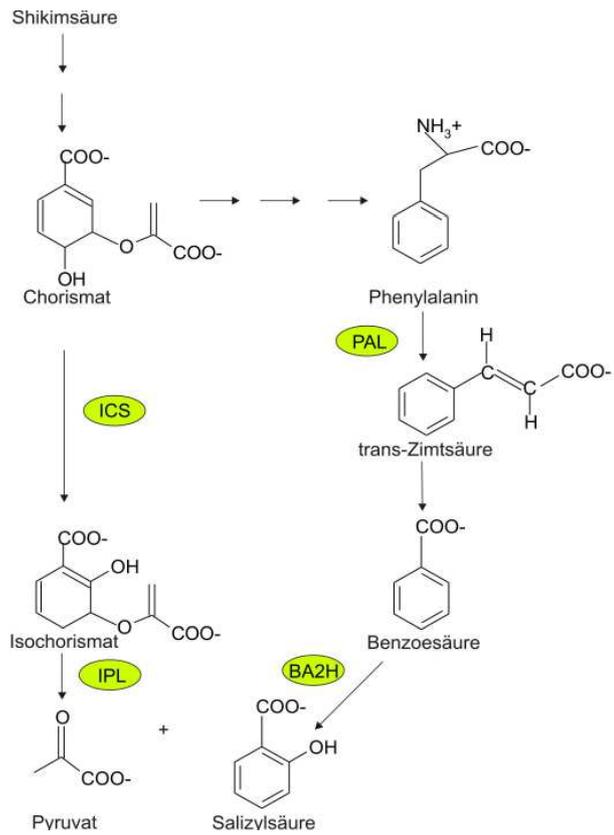


Abb. 1-2 Die Biosynthese der Salicylsäure

Für die PR1-abhängige Pathogenabwehr scheint nach Wildermuth der ICS1-abhängige Weg die Hauptrolle zu spielen.

Ausgehend von Chorismat kann die Biosynthese sowohl über einen ICS-abhängigen als auch einen PAL-abhängigen Weg verlaufen.

Der PAL-abhängige Weg, so wird vermutet, hat eine größere Bedeutung in der Zelltodausprägung nach Pilzbefall (Mauch-Mani et al., 1996; Wildermuth et al., 2001). Nach der Synthese können verschiedene SA-Konjugate gebildet werden. Neben dem bereits erwähnten Methylsalicylat ist eine 2-O- $\beta$ -Glukosid-Konjugierung wichtig, was die Speicherformen der in hohen Konzentrationen toxischen freien Salicylsäure darstellt (Seo et al., 1995). Durch eine Infektion wird neben freier auch glukosylierte SA akkumuliert.

Die Induktion der SA-Produktion wird z.B. über reaktive Sauerstoffspezies reguliert. Weiterhin ist die positive Beeinflussung durch PAD4, einem lipaseähnlichen Protein, bekannt, was ursprünglich im Zusammenhang mit Phytoalexinen isoliert wurde (Glazebrook et al., 1996; Jirage et al., 1999). Weiterführende Arbeiten von Zhou et al. charakterisierten PAD4 jedoch als positiven SA-Regulator. So sind *pad4*-Mutanten suszeptibler gegen virulente Pathogene, exprimieren *PR1* nur sehr schwach und weisen niedrige SA-Konzentrationen auf. Die Antwort auf exogen applizierte SA ist allerdings nicht eingeschränkt (Zhou et al., 1998). Das Expressionsniveau von *PAD4* ist wiederum abhängig von SA, was auf einen positiven

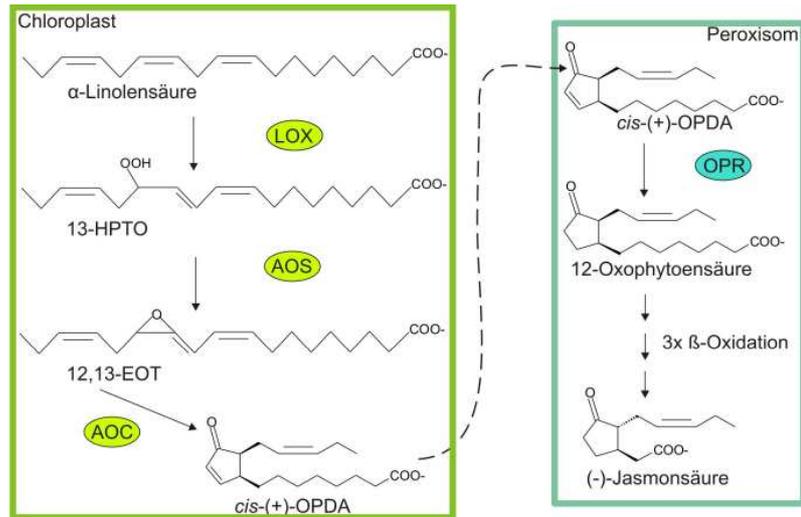
*feedback-loop* schließen lässt (Jirage et al., 1999). Einen stark hemmenden Einfluss auf den SA-Weg hat MPK4. Es konnte gezeigt werden, dass *mpk4*-Genotypen konstitutiv *PR1*, *PR2* und *PR5* exprimieren und die endogenen SA-Gehalte deutlich über denen der Wildtyppflanzen liegen (Petersen et al., 2000).

Salicylsäure selbst nimmt Einfluss auf die Aktivität verschiedener Kinasen, so z.B. der SIPK (*salicylic-acid-induced kinase*) aus Tabak, dem Orthologen der AtMPK6 (Zhang et al., 1997; Romeis et al., 1999). Auch die Produktion von ROS ist, wie bereits erwähnt, abhängig von SA (Kauss and Jeblick, 1995; Mur et al., 1997; Shirasu et al., 1997). Für die Akkumulation des Phytoalexins Camalexin in *A. thaliana* ist SA zwar notwendig, aber nicht ausreichend (Zhao et al., 1996; Thomma et al., 1999; Zhou et al., 1999).

Während der SA hauptsächlich eine Funktion in der Abwehr biotropher Pathogene zukommt, sind für die Antwort auf Befall mit nekrotrophen Pathogenen Jasmonate notwendig (Staswick et al., 1998; Vijayan et al., 1998). Als Jasmonate wird die Gesamtheit der Jasmonsäure und ihrer Derivate bezeichnet. Sie gehören zur Klasse der Oxylipine und werden als Antwort auf Verwundung (Pena-Cortes et al., 1995), UV-Stress (Conconi et al., 1996), Pathogenbefall sowie Behandlung mit verschiedenen Elizitoren (Gundlach et al., 1992; Moiseyev et al., 1997; Vijayan et al., 1998) gebildet. Daneben kommt ihnen eine große Bedeutung in der Entwicklung der Pflanze zu. *Arabidopsis*-Mutanten der JA-Biosynthese oder -Signaltransduktion sind männlich steril (Feys et al., 1994; Stintzi et al., 2000; von Malek et al., 2002). Die Unterbrechung der JA-Biosynthese oder Signalweiterleitung bewirkt eine erhöhte Pathogenanfälligkeit (Staswick et al., 1998; Thomma et al., 1998; Vijayan et al., 1998) sowie eine verminderte Antwort auf Verwundung. Ein wichtiges Beispiel dafür ist die Mutante *dde2* mit einer Mutation in der Allenoxidsynthese (Park et al., 2002). Wie auch schon Salicylsäure ist Jasmonsäure exogen appliziert in der Lage, Abwehrmechanismen zu aktivieren und somit Resistenzen zu unterstützen (Penninckx et al., 1996).

Die Bildung von Jasmonaten erfolgt über den Oktadekanoid-Weg (Abb. 1-3). In Chloroplasten wird  $\alpha$ -Linolensäure durch eine Lipoxygenase (13-LOX) zu 13-Hydroperoxyoctadecatriensäure (13-HPTO) umgewandelt, was das Substrat für die Allenoxidsynthese (AOS) ist. AOS katalysiert die Bildung von 12,13-Epoxylinolensäure (12,13-EOT). Dieses labile Molekül wird durch die Allenoxidcyclase (AOC) zu dem schon biologisch aktiven Molekül *cis*-(+)-12-oxo-Phytodiensäure (OPDA) umgesetzt (Stintzi et al., 2001). Über einen noch nicht genau aufgeklärten Mechanismus erfolgt der Transport von OPDA in die Peroxisomen, wo es durch die OPDA-Reduktase (OPR3) zu 12-oxo-

Phytoensäure (OPC8) reduziert wird. Durch drei Zyklen  $\beta$ -Oxidation wird daraus Jasmonsäure gebildet (Vick et al., 1983, 1984; Hamberg et al., 1988; Stintzi and Browse, 2000). In einer Positivrückkopplung initiiert JA die Aktivierung von JA-Biosynthese genen wie *LOX2*, *AOS* oder *OPR3*



**Abb. 1-3 Die Biosynthese der Jasmonsäure**

In den Chloroplasten wird  $\alpha$ -Linolensäure zu cis-(+)-OPDA umgewandelt. In Peroxisomen erfolgt dann die Umsetzung zu (-)-Jasmonsäure.

Weitere aktivierte Gene sind

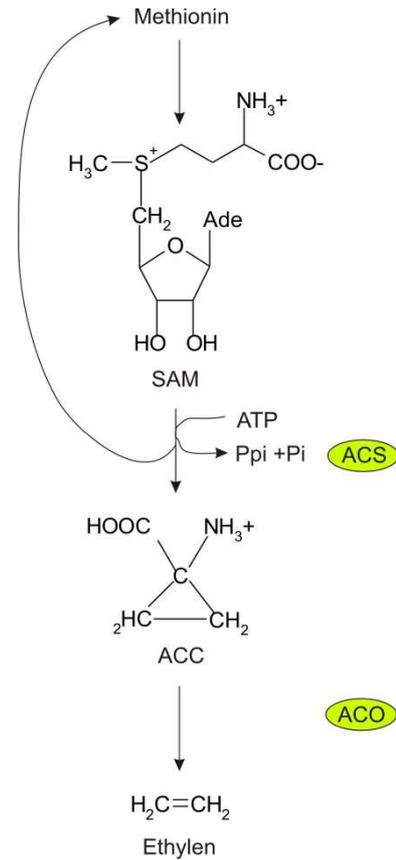
*PIN1* und *PIN2* (Proteinaseinhibitor), *PDF1.2* (antimikrobielles Defensin), *THI1.2* (Thionin) und *VSP* (vegetatives Speicherprotein) (Farmer et al., 1992; Mason et al., 1993; Epple et al., 1995; Pena-Cortes et al., 1995; Penninckx et al., 1996). Eine wichtige Aufgabe in der Aktivierung JA-abhängiger Gene kommt dabei einer MAP-Kinase-Kaskade aus MKK3 und MPK6 zu (Takahashi et al., 2007). Der wichtigste Faktor der Weiterleitung des JA-Signals ist COI1. *COI1* kodiert für ein F-Box-Protein, das zuständig für den proteasomabhängigen Abbau so genannter JAZ-Repressoren ist und so die Transkription JA-responsiver Gene ermöglicht (Xie et al., 1998; Thines et al., 2007; Chico et al., 2008).

Wie bereits erwähnt ist MPK4 ein Negativregulator des SA-Weges. Gleichzeitig stellt es einen Positivregulator für die Jasmonsäure dar (Petersen et al., 2000) und ist somit ein Koordinator von SA und JA.

Die Expression des pflanzlichen Defensins *PDF1.2* wird nicht nur durch JA induziert, sondern auch durch das Phytohormon Ethylen (Penninckx et al., 1996), einem Hormon, das ein Hauptregulator für Entwicklung und Seneszenz ist. Im Zusammenhang mit Pathogenbefall nimmt Ethylen eine ambivalente Rolle ein. Für viele inkompatible Pflanze-Pathogen-Interaktionen konnte einerseits ein Anstieg der Ethylenkonzentration nachgewiesen werden (van Loon et al., 2006a). Ethyleninsensitive Mutanten wie *etr1* (Bleecker et al., 1988) verlieren ihre Resistenz gegen eigentlich nichtpathogene *Pythium*-Arten. (Knöster et al., 2001; Geraats et al., 2002) Auch der ethyleninsensitive Genotyp *ein2* (Guzman et al., 1990) ist

hochsuszeptibel (Alonso et al., 2003). Zusätzlich führt eine exogene Ethylen-Behandlung zur Induktion von Abwehrgenen (Ecker et al., 1987). Andererseits verstärken erhöhte Ethylengehalte die Symptomausprägung in suszeptiblen Pflanzen (Knöster et al., 2001). Die Infektion von Tabak mit einem virulenten Bakterium induziert einen extremen Ethylenanstieg, der mit avirulenten Bakterien nicht zu beobachten ist (Huang et al., 2005). Die Mutante *ein2* prägt nach einer Infektion mit virulentem *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) geringere Nekrosen aus als Wildtyppflanzen (Bent et al., 1992).

Der Ausgangsstoff für die Ethylenbildung ist S-Adenosylmethionin (SAM), das durch die ACC-Synthase (ACS) unter Abspaltung von 5'-Methylthioadenosin zu 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) umgesetzt wird (Adams et al., 1979; Boller et al., 1979; Bleecker et al., 2000). ACC wird abschließend durch die ACC-Oxidase (ACO) zu Ethylen oxidiert (Hamilton et al., 1991) (Abb. 1-4). Es existieren verschiedene Isoformen der ACS, die durch Ethylen aktivierbar sind. Beispiele dafür sind die ACS2 und die ACS6 (van der Straeten et al., 1992; Arteca et al., 1999). Diese beiden Isoformen sind zudem Substrate der MPK6 (Liu et al., 2004). Dies impliziert, die Notwendigkeit von MAP-Kinase-Kaskaden für die stressaktivierte Ethylenproduktion. Die direkte Involvierung von MAP-Kinasen für die Weiterleitung des Ethylensignals wurde von Ouaked et al. bewiesen (Ouaked et al., 2003). Ethylenabhängige Gene sind neben *PDF1.2* beispielsweise *PAL* (Ecker and Davis, 1987), *ERF1*, *GST2* und *CHI-B* (Alonso et al., 1999). Für die Aktivierung des *ethylene-response-factor1* (*ERF1*) sind die Transkriptionsfaktoren EIN3 und EIN3-like (EIL) notwendig. Erst durch diese Aktivierung von *ERF1* ist die weitere Induktion ethylenabhängiger Gene, wie z.B. *PDF1.2*, möglich (Roman et al., 1995; Chao et al., 1997; Solano et al., 1998). Mutationen in diesen Transkriptionsfaktoren führen zu einer reduzierten Sensitivität gegenüber endogenem und exogenem Ethylen. Bei der Doppelmutante *ein3-eil1-1* kommt es dadurch, vergleichbar zu *ein2*, zu einer extremen Suszeptibilität (Alonso et al., 2003).



**Abb. 1-4 Die Biosynthese von Ethylen**

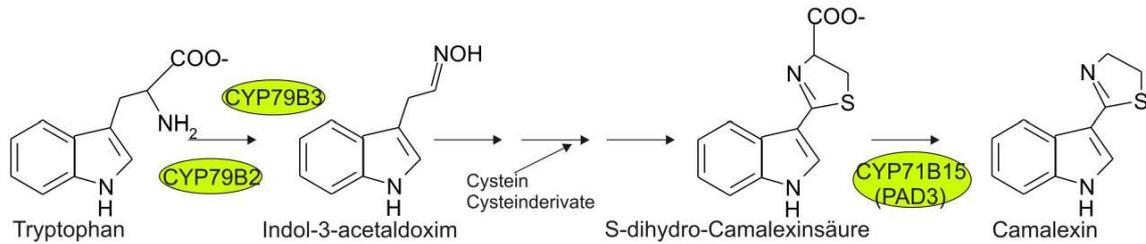
Der Ausgangsstoff für die Ethylensynthese ist Methionin, das zu SAM umgewandelt wird. ACS und ACO setzen SAM zu Ethylen um.

Die drei genannten Phytohormone agieren in einem engen Netzwerk aus Synergismen und Antagonismen. Verallgemeinernd kann gesagt werden, dass Salicylsäure antagonistisch zu Jasmonsäure und Ethylen agiert. Eine Behandlung von Pflanzen mit Acetylsalicylsäure unterbindet beispielsweise die wundinduzierte JA-Bildung und *PIN2*-Expression (Pena-Cortes et al., 1993). Jasmonate und Ethylen kooperieren in vielen Fällen, so z.B. bei der Ausprägung der induzierten systemischen Resistenz (ISR). Die ISR stellt neben der SAR eine zweite Form der induzierten Resistenz dar, benötigt als Signalmolekül allerdings JA und Ethylen (Pieterse et al., 1998). Weiter wird die Expression verschiedener Abwehrgene wie *PDF1.2* von JA und Ethylen geregelt (Xu et al., 1994; Penninckx et al., 1998). Bei der Antwort auf Verwundung wirken JA und Ethylen allerdings antagonistisch (Rojo et al., 1999)

### 1.2.3 Die antimikrobiellen Phytoalexine

Phytoalexine sind kleine, antimikrobielle Moleküle, die von Pflanzen nach Pathogenbefall produziert werden. Die Struktur der Moleküle variiert dabei von Pflanze zu Pflanze. Petersilie z.B. akkumuliert Furanocoumarine (Tietjen et al., 1983). In *Arabidopsis* wird 3-Thiazol-2'-yl-indol, auch als Camalexin bezeichnet, gebildet (Tsuji et al., 1992). Ein Anstieg der Camalexinkonzentration erfolgt sowohl nach Bakterieninfektion (Glazebrook et al., 1994) als auch nach Befall mit Pilzen (Glazebrook et al., 1997; Thomma et al., 1999) und Oomyceten (Roetschi et al., 2001). Auch die Applikation von ROS oder Schwermetallionen induziert die Camalexinproduktion (Tsuji et al., 1992). Wird die Camalexinbildung inhibiert, sind Pflanzen deutlich susceptibler gegenüber *H. parasitica* und *Alternaria brassicicola* (Glazebrook and Ausubel, 1994; Glazebrook et al., 1997; Thomma et al., 1999).

Die Biosynthese erfolgt ausgehend von Tryptophan. Über die Cytochrome P450 CYP79B2 und CYP79B3 wird daraus Indol-3-Acetaldoxim (IAOx) gebildet (Glawischnig et al., 2004), was über mehrere Schritte unter Verbrauch von Cysteinderivaten zu (S)-dihydro-Camalexinsäure umgewandelt wird. Der finale Schritt der Camalexinbiosynthese wird von der Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71B15 katalysiert (Zhou et al., 1999; Schuegger et al., 2006) (Abb. 1-5).



**Abb. 1-5 Die Biosynthese von Camalexin in *A. thaliana***

Tryptophan wird von Cytochromen P450 (CYP79B2/B3) zu IAOX umgesetzt. Die Bildung von Camalexin aus IAOX verläuft unter Verbrauch von Cysteinderivaten über die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP71B15.

Glazebrook und Ausubel identifizierten 1994 nach Infektion mit *P. syringae* phytoalexindefiziente Mutanten, von denen eine, *pad3*, einen Defekt in CYP71B15 aufweist (Glazebrook and Ausubel, 1994; Zhou et al., 1999). In derselben Analyse wurde *pad2* identifiziert, die eine Mutation im Gen der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase 1 (GSH1) trägt. GSH1 katalysiert den ersten Schritt der Glutathionbiosynthese (Parisy et al., 2007). Welche Rolle GSH für die Camalexinbildung genau spielt, ist jedoch bisher nicht bekannt. Möglich wären eine regulatorische Funktion oder eine biosynthetische Vorstufe für den schwefelhaltigen Thiazolring. Obwohl *pad2* und auch *pad3* wenig Camalexin akkumulieren, ist lediglich *pad2* verstärkt anfällig gegen *Psm* (Glazebrook and Ausubel, 1994).

Die Produktion von Phytoalexinen unterliegt vielen Regularien. In Petersilie ist z.B. die Bildung von Phytoalexinen nach Pep13-Behandlung abhängig von Kalzium (Blume et al., 2000). In *mpk3*, *mpk6* oder *mpk3/mpk6* ruft eine Infektion mit *Botrytis cinerea* nur verminderte Camalexinbildung hervor, was die Notwendigkeit von MAP-Kinase-Kaskaden für die Camalexinakkumulation zeigt (Ren et al., 2008). Die direkte Induzierbarkeit der Camalexinakkumulation durch ROS lässt auf einen unmittelbaren Zusammenhang zwischen Camalexin und ROS schließen (Zhao et al., 1998). SA, JA oder Ethylen dagegen sind nicht in der Lage, die Camalexinbildung zu stimulieren. Jedoch belegen mehrere Arbeitsgruppen eine Transkriptakkumulation von *PAD3* durch SA-Behandlung (Zhao and Last, 1996; Zhou et al., 1999). Zusätzlich wurden in *nabG*- und *pad4*-Pflanzen reduzierte Camalexingehalte nachgewiesen (Zhao and Last, 1996; Thomma et al., 1999). Werden *pad4*-Pflanzen vor einer *Psm*-Infektion mit SA behandelt, sind höhere Camalexinkonzentrationen messbar als in unbehandelten *pad4* (Zhou et al., 1998). Somit besitzt SA auf jeden Fall eine regulatorische Rolle bei der Camalexinbiosynthese. Erstaunlicherweise wurde gezeigt, dass Mutationen in *SID2* keinen negativen Effekt auf die Camalexinproduktion haben (Nawrath and Metraux, 1999). Weiterhin scheint Camalexin positiv von Ethylen reguliert zu werden (Thomma et al., 1999). Jasmonsäure dagegen hat keinen Einfluss auf die Camalexinsynthese. So zeigen *coi1*-

Mutanten nach Infektion mit *Alternaria brassicicola* Camalexinkonzentrationen vergleichbar dem Wildtyp (Thomma et al., 1999).

#### 1.2.4 Änderungen des Transkriptionsprofils

Eine Elizitierung von Pflanzen schlägt sich notwendigerweise in einer starken Änderung des Transkriptionsprofils nieder. Aber nur ein Teil der transkriptionell aktivierten Gene ist spezifisch pathogenabhängig. Neben den zu erwartenden Änderungen in der Expression verschiedener Biosynthese- und Signalgene werden die Familien der *WRKYs* und *Pathogen-related (PR)*-Genen transkriptionell aktiviert (Penninckx et al., 1996).

*WRKYs* stellen eine heterogene Gruppe von Transkriptionsfaktoren dar, die durch *WRKY*-Domänen (*WRKYGQK*) (Rushton et al., 1995) und ein Zinkfingermotiv (de Pater et al., 1996) charakterisiert sind. Sie binden an sogenannte *W*-Boxelemente, die in Promotoren vieler pathogenassoziiierter Gene vorhanden sind (Rushton et al., 1995; Eulgem et al., 1999). Eine Induktion von *WRKYs* durch *flg22*-Behandlung, z.B. *WRKY6*, *WRKY29* und *FRK1* (*flg22-induced receptor-like kinase*), wurde mehrfach beschrieben (Asai et al., 2002; Qutob et al., 2006). Auch durch die NLPs *NPP1* und *Nep1* (Kapitel 1.4) werden *WRKYs* transkriptionell aktiviert (Bae et al., 2006; Qutob et al., 2006).

Notwendig für die Aktivierung von *WRKYs* sind intakte MAP-Kinase-Kaskaden. Wird die MAP-Kinase-Aktivität z.B. durch einen Inhibitor verhindert oder die Phosphorylierung durch eine Phosphatase reduziert, ist die Transkription von *WRKY29* und *FRK1* nach *flg22*-Elizitierung deutlich vermindert (Asai et al., 2002).

Eine Aktivierung durch *WRKYs* wurde auch für *PR1* beschrieben (Rushton et al., 1996; Eulgem et al., 1999), was zu der ubiquitär verbreiteten Familie der *PR*-Gene zählt. Diese werden nach Pathogenbefall transkriptionell aktiviert. Des Weiteren werden Gene nur dann den *PR*-Genen zugeordnet, wenn sie in mindestens zwei unabhängigen Pflanze-Pathogen-Systemen exprimiert werden (Buchter et al., 1997; van Loon et al., 1999). Die *PR*-Proteine gehören unterschiedlichen Proteinfamilien an, wobei nicht jede Familie in jeder Pflanzenart vorkommt. Eine Zusammenfassung der *PR*-Proteinfamilien ist bei van Loon et al. zu finden (van Loon et al., 2006b). Die Funktion des intensiv beschriebenen *PR1* ist jedoch bis heute nicht aufgeklärt.

Die Aktivierung von *PR*-Proteinen unterliegt unterschiedlichen Regularien. *PR1* z.B. wird ausschließlich durch Salicylsäure induziert. Eine Aktivierung ist in *nabG*-Pflanzen nicht detektierbar, wohingegen eine Blockierung des JA- oder Ethylen-Weges keinen negativen Einfluss hat (Penninckx et al., 1996). Die basische Chitinase *CHI-B* ist dagegen abhängig von

Ethylen (Chen et al., 1995; Buchter et al., 1997), *PR3* und *PR4* von Jasmonsäure. Die Expression von *PR3* und *PR4* ist in *coi1* unterbunden, während der Abbau von SA in *nahG*-Pflanzen die Expression dieser *PR*-Gene nicht verhindert (Thomma et al., 1998).

### 1.2.5 Der Zelltod bei inkompatiblen und kompatiblen Interaktionen

Zelltod tritt sowohl während der Pflanzenentwicklung als auch als Reaktion auf biotischen oder abiotischen Stress auf. Sowohl kompatible als auch inkompatible Pflanze-Pathogen-Interaktionen können mit Zelltod lokal an der Infektionsstelle einhergehen, wobei Zelltod während einer kompatiblen Interaktion oft durch Toxine induziert wird. Die im Rahmen einer Resistenz wichtige hypersensitive Respons (HR) benötigt die R-Gen-vermittelte Resistenz (Lindgren et al., 1986; Huang et al., 1988) und ist eine Form des genetisch programmierten Zelltodes (*programmed cell death*, PCD) (Dietrich et al., 1994; Greenberg et al., 1994). Auch der Zelltod während einer erfolgreichen Pathogenese kann eine Form des PCD sein, stellt aber ein Symptom dar und tritt wesentlich später auf als die HR. Die Ausprägung einer PCD erfordert einen aktiven Stoffwechsel der Pflanzenzelle (He et al., 1993; Levine et al., 1994; Zeyen et al., 1995) und zeigt morphologisch ähnliche Änderungen wie die Apoptose in tierischen Zellen. Merkmale sind endonukleolytische Spaltung der DNA (*DNA-Laddering*), Membranzerstörung, Zerstörung und Verformung von Organellen und die Ausbildung von Apoptosekörpern (Levine et al., 1996; Ryerson et al., 1996; Hano et al., 2008). Aber auch der Zelltod als Symptom einer Suszeptibilität kann teilweise dem programmierten Zelltod zugeordnet werden und zeigt dann ähnliche morphologische Änderungen wie eine HR (Wang et al., 1996; Hano et al., 2008).

Die Aufgabe der HR ist es, an der Infektionsstelle das Wachstum biotropher Pathogene durch Nährstoffentzug einzuschränken. Pathogene, die vollständig oder teilweise ihre Lebensgrundlage aus totem Gewebe ziehen, werden vermutlich durch aus den Vakuolen freigesetzte giftige Substanzen beeinträchtigt (Hammond-Kosack et al., 1996). Es wird angenommen, dass die Initiierung der HR ca. zwei bis drei Stunden nach Pathogenkontakt erfolgt. Als makroskopisch wird eine HR bezeichnet, wenn mindestens 25 % der Zellen mit Pathogenkontakt sterben (Goodmann 1994) Die Regulation der HR erfolgt durch verschiedene Signale. Eine wichtige Rolle spielt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Ist der Kalziumstrom durch Kanalinhibitoren blockiert, bleibt der Zelltod aus (Levine et al., 1996). Der Einfluss von ROS auf die HR wird dagegen kontrovers diskutiert und ist vom jeweiligen Pflanze-Pathogen-System abhängig (Torres et al., 2002). Es wird vermutet, dass ROS sowohl eine Rolle in der Zelltodinduktion haben als auch durch Zelltod freigesetzt werden (Levine et al., 1994; Shapiro

et al., 2001). Salicylsäure wird als Positivregulator der HR angesehen. Eine verminderte Akkumulation von SA durch die Expression einer Salicylathydroxylase in Tabakpflanzen unterbindet die Ausprägung der HR als Antwort auf Bakterien, biotrophe Oomyceten oder Tabakmosaikvirus (Delaney et al., 1994; Mur et al., 1997). Eine exogene Behandlung von Pflanzen mit Salicylsäure verstärkt wiederum die HR (Shirasu et al., 1997). Die positive Rolle der SA bei der Bildung einer HR scheint allerdings abhängig von der spezifischen *avr*-R-Gen-Interaktionen zu sein. Werden *nabG*-Pflanzen mit *Psm*, die unterschiedliche *avr*-Proteine exprimieren, infiziert, ist nicht in jedem Fall die HR unterdrückt (Rate et al., 1999; Rate et al., 2001). Auch MAP-Kinase-Kaskaden spielen für die HR eine wichtige Rolle. Die MAP3K NbMAPKKK $\alpha$  aus *Nicotiana benthamiana* wurde in einem genetischen *screen* aufgrund beeinträchtigter HR identifiziert (del Pozo et al., 2004). Die HR ist allerdings nicht zwingend notwendig für eine erfolgreiche Bekämpfung von Pathogenen. Mutanten wie *dnd1* (*defense- no death*) entwickeln zwar keine HR, sind aber in der Lage, Pathogene effektiv abzuwehren (Yu et al., 1998).

Obwohl eine erfolgreiche Infektion mit nekrotrophen oder hemibiotrophen Pathogenen fast immer mit dem Tod von Wirtszellen einhergeht, ist der Zelltod für eine erfolgreiche Pathogenese nicht unbedingt notwendig. Auch PCD einer kompatiblen Interaktion unterliegt diversen Regularien. Wie schon im Kapitel 1.2.2 erwähnt ist Ethylen eine wichtige Komponente für die Symptomausprägung. Ebenso sind Phytohormone für den toxinvermittelten Zelltod notwendig. Der durch Fumonisin B1 induzierte Zelltod ist beispielsweise abhängig von Ethylen, SA und JA (Asai et al., 2000).

Die Unterscheidung der HR von PCD während einer kompatiblen Interaktion ist oft nicht eindeutig möglich. Eine Differenzierung beider Zelltodarten ist nur über die Expression HR-spezifischer Markergene wie *HIN1* oder *AtMYB30* möglich (Gopalan et al., 1996; Daniel et al., 1999).

### 1.3 Die Pathogenerkennung

Der Aktivierung der beschriebenen Abwehrmechanismen geht die Erkennung des Pathogens voraus. Wie in Kapitel 1.1 schon erwähnt wurde, ist eine Induktion durch PAMPs (PTI) oder Erkennung pathogener Effektoren (ETI) möglich.

#### 1.3.1 Die Induktion von PTI durch exogene und endogene Elizitoren

Elizitoren, Moleküle, die generell die pflanzliche Abwehr aktivieren, werden grob in endogene und exogene Elizitoren unterteilt, wobei die letztgenannten die wichtigere Gruppe darstellt. Nur in manchen Fällen werden Pathogene indirekt über enzymatische Aktivitäten erkannt. Hydrolytische Enzyme der Pathogene spalten dabei partiell die pflanzliche Zellwand und setzen so Bestandteile (z.B. Glukan oder Oligogalakturonan) frei, die eine Abwehrantwort auslösen. In diesem Fall wird von endogenen Elizitoren gesprochen (Ebel and Scheel, 1997). In der Literatur ist mittlerweile eine Vielzahl exogener Elizitoren unterschiedlicher Struktur beschrieben, wobei die meisten den PAMPs (Tabelle 1-1) zugeordnet werden. In Tabelle 1-1 sind Beispiele für exogene Elizitoren zusammengefasst.

**Tabelle 1-1 Beispiele exogener Elizitoren**

Gruppe	Beispiel	Referenz
Glykolipide	Lipopolysaccharide	(Meyer et al., 2001) (Newman et al., 2002) (Zeidler et al., 2004)
Fette	Ergosterol	(Granado et al., 1995)
Chitin		(Felix et al., 1993) (Yamada et al., 1993)
Zucker	Verzweigte Heptaglukane verschiedener <i>Phytophthora</i> - und <i>Pythium</i> -Spezies	(Sharp et al., 1984) (Cosio et al., 1990)
Proteine	Bakterielles Flagellin Elongationsfaktor Elicatine verschiedener Oomyceten  42 kDa Transglutaminase aus <i>Phytophthora megasperma</i> (Glykoprotein) (GP42)	(Felix et al., 1999) (Kunze et al., 2004) (Ricci et al., 1989) (Osman et al., 2001) (Parker et al., 1991)

Für einige der proteinogenen Elizitoren konnten Peptidsequenzen identifiziert werden, die ausreichend für die Signalperzeption sind. Als erster Peptidelizitor wurde ein 13 Aminosäuren umfassendes Peptid (Pep13) des GP42 identifiziert (Nürnberg et al., 1994). Diese Peptidsequenz ist in Transglutaminasen verschiedener *Phytophthora*-Arten hochkonserviert (Brunner et al., 2002). In Petersilie und Kartoffel induziert Pep13 verschiedene Abwehrmechanismen (Jabs et al., 1997; Brunner et al., 2002; Halim et al., 2004). Aus dem N-Terminus des Flagellins von *Pseudomonas syringae* wurde 1999 von Felix et al. ein 22 Aminosäuren langes Peptid (flg22) isoliert, das in *Arabidopsis thaliana* und Tomate komplexe Immunantworten auslöst (Felix et al., 1999; Nühse et al., 2000; Asai et al., 2002; Zipfel et al., 2004; Ranf et al., 2008). Weiterführende Untersuchungen zeigten bei *Arabidopsis*-Keimlingen eine Wachstumshemmung durch flg22-Behandlung (Gomez-Gomez et al., 1999). Als drittes Beispiel soll elf18 erwähnt werden. Elf18 stellt die ersten 18 N-terminalen Aminosäuren des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu dar und induziert in *A. thaliana* Abwehrmechanismen, die den flg22-induzierten sehr ähnlich sind (Kunze et al., 2004). Vergleichende Genomstudien mittels *Microarray* zeigten eine deutliche Überlappung zwischen flg22- und elf18-aktivierten Genen. Unter den aktivierten Genen befindet sich eine Vielzahl von Genen, die für rezeptorähnliche Kinasen (*receptor-like kinase*, RLK) kodieren (Zipfel et al., 2006).

RLKs sind membranständige Rezeptoren mit einer großen funktionellen Bandbreite. Aufgebaut sind sie, ähnlich den Rezeptoren des tierischen Immunsystems, aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne. Der extrazelluläre Bereich ist für eine spezifische Erkennung notwendig. Leucinreiche Domänen (*leucine-rich repeats*, LRR) z.B. sind in der Protein-Protein-Interaktion involviert (Kobe et al., 1994). LysM-Domänen dagegen sind wichtig für die Chitinerkennung (Kaku et al., 2006). Über die Kinasedomäne wird das Signal intrazellulär weitergereicht. Während der tierische Rezeptor eine Tyrosinkinase aufweist, besitzen pflanzliche RLKs eine Serin/Threoninkinase (Nürnberg et al., 2001; Shiu et al., 2001a; Fritz-Laylin et al., 2005). Insgesamt existieren in *Arabidopsis* über 600 LRR-RLKs (Shiu et al., 2001b), von denen ungefähr ein Drittel in der Pathogenabwehr involviert ist (Shiu et al., 2004). Bislang konnten jedoch nur RLKs für flg22 (FLS2) (Gomez-Gomez and Boller, 2000), elf18 (ERF) (Zipfel et al., 2006) und Chitin (CERK1) (Miya et al., 2007) charakterisiert werden. Identifiziert wurden diese Rezeptoren über *Arabidopsis*-Mutanten mit stark reduzierter Responsivität auf den jeweiligen PAMP. Auf diese Weise konnte für FLS2 gezeigt werden, dass sowohl eine intakte LRR- als auch eine intakte Kinasedomäne für die Signalperzeption benötigt wird (Gomez-Gomez et al., 2001).

### 1.3.2 Die Induktion der ETI durch Avr- und R-Proteine

Effektoren von Krankheitserregern sind sowohl aus Bakterien als auch Pilzen und Oomyceten bekannt. Sie greifen direkt in den pflanzlichen Metabolismus ein und inhibieren so die PTI (de Torres et al., 2006; He et al., 2006; Nomura et al., 2006). Erst wenn diese Effektoren durch pflanzliche R-Gen-Produkte erkannt werden, werden Abwehrmechanismen ausgelöst. In diesem Fall werden die Effektoren als Avirulenzproteine (Avr) bezeichnet (Lahaye et al., 2001). Im Umkehrschluss erfolgt bei fehlenden oder inaktiven R- oder Avr-Proteinen eine Krankheitsausbildung.

Von GRAM-negativen Bakterien ist bekannt, dass sie die Effektoren über das Typ-III-Sekretionssystem (*Type-three secretion system*, TTSS) in das Zytosol der Wirtszelle injizieren (Galan et al., 1999). Kodiert wird das TTSS von *hrp-* (*HR and pathogenicity*) und *hrc-* (*HRP and conserved*) Genen. Mutationen in diesen Genen setzen deutlich die Virulenz von Pathogenen herab. In den vergangenen Jahren konnte eine Vielzahl von Effektoren und deren Wirkungsweise identifiziert werden. Angriffspunkt kann neben der Kalloosedeposition die Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade sein, wodurch die Signaltransduktion und die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen unterbunden werden (Hauck et al., 2003; He et al., 2006).

Die Erkennung von Avr-Proteinen in der Pflanzenzelle kann direkt oder indirekt erfolgen. Bei einer direkten Erkennung fungieren die korrespondierenden R-Proteine als Rezeptoren. Beispiele dafür sind die Interaktion zwischen Pi-ta aus Reis und Avr-Pita aus *Magnaporthea grisea* sowie RRS1 aus *A. thaliana* und PopP2 des Bakteriums *Ralstonia solanacearum* (Jia et al., 2000; Deslandes et al., 2003). Strukturell weisen diese Rezeptoren sowohl eine C-terminale leucinreiche Strukturen (LRR) als auch eine Nukleotidbindestellen (NB) auf (Bent et al., 1994; Grant et al., 1995). Daneben unterteilen sich die R-Proteine anhand des N-terminalen Bereiches in Proteine mit einer *coiled-coil*-Domäne (CC-NB-LRR) und in Proteine mit einer Domäne ähnlich dem Toll- und Interleukin1-Rezeptor (TIR-NB-LRR). Der CC-Struktur kommt hauptsächlich die Aufgabe der Proteinbindung zu, während TIR-Domänen vermutlich in der Signaltransduktion involviert sind (Martin et al., 2003).

Die indirekte Erkennung von Avr-Proteinen wird durch die *Guard*-Hypothese beschrieben (Dangl et al., 2001). Demnach werden pflanzliche Zielproteine von mikrobiellen Avr-Proteinen z.B. durch Proteolyse oder Phosphorylierung modifiziert. Diese Veränderung wird von R-Proteinen erkannt, wodurch Abwehrmechanismen aktiviert werden. Beispielsweise spaltet die Cysteinprotease AvrPphB aus *P. syringae* die pflanzliche Proteinkinase PBS1 (Shao et al., 2003). Diese Veränderung wird von RPS5 erkannt (Ade et al., 2007). Ein weiteres

Beispiel für Proteolyse ist RIN4, dessen Spaltung durch AvrRpt2 von RPS2 registriert wird. Eine Phosphorylierung von RIN4 durch AvrRpm1 oder AvrB aktiviert dagegen RPM1 (Axtell et al., 2003b; Axtell et al., 2003a; Mackey et al., 2003).

Die Regulation der R-Gen-vermittelten Resistenz erfolgt durch verschiedene Faktoren. Zwei davon, RAR1 (*required for Mla12 resistance*) und SGT1B (*suppressor of G<sub>2</sub>-allele of skp1*), werden hier kurz vorgestellt. Das Zinkfingerprotein RAR1 und das F-Box-Protein SGT1B sind in eukaryotischen Zellen hochkonserviert und interagieren sowohl miteinander als auch mit dem Hitzeschockprotein HSP90. SGT1B komplexiert zudem mit zwei Komponenten der E3 Ubiquitinligase, SKP1 und CUL1. (Azevedo et al., 2002; Hubert et al., 2003). Dadurch beeinflussen sie die Stabilität sowohl von CC-NB-LRR- als auch von TIR-NB-LRR-R-Proteinen (Muskett et al., 2002; Tör et al., 2002; Takahashi et al., 2003). Ein prominentes Beispiel ist die geringe Abundanz von RPM1 in *rar1*- oder *hsp90*-Mutanten (Hubert et al., 2003). Mutationen in *RAR1* oder *SGT1B* führen nicht nur in *Arabidopsis* zu eingeschränkter Resistenz gegenüber avirulenten *Pst*DC3000 und *H. parasitica* (Muskett et al., 2002). Auch in Gerste und Tabak ziehen diese Mutationen eine erhöhte Suszeptibilität nach sich (Shirasu et al., 1999; Azevedo et al., 2002; Liu et al., 2002). Diese Beobachtung ist auf eine Reduktion des Zelltods und verminderte ROS-Akkumulation zurückzuführen (Muskett et al., 2002; Tör et al., 2002; Tornero et al., 2002). Weitere Informationen sind in Shirasu et al. (Shirasu et al., 2003) zusammengefasst. Als weitere wichtige Signalelemente für die R-Gen-vermittelte Resistenz dienen zum einen die lipaseähnlichen Proteine EDS1 und PAD4, die für die Funktion von R-Proteinen der TIR-NB-LRR-Klasse notwendig sind (Parker et al., 1996; Aarts et al., 1998; Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999; Feys et al., 2001) und zum anderen das membrangebundene NDR1, was für CC-NB-LRR-R-Proteine benötigt wird (Parker et al., 1996; Century et al., 1997; Aarts et al., 1998; Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999; Feys et al., 2001).

### 1.3.3 Toxine und andere Effektoren

Pflanzliche Abwehrreaktionen können auch durch mikrobielle Toxine induziert werden. Deren Aufgabe ist die Zerstörung der Pflanzenzelle zur Unterstützung des Pathogenwachstums.

Es werden grundlegend wirtsspezifische (*host-selective toxins*, HST) und unspezifische Toxine unterschieden. HSTs sind ausschließlich in Pflanzen aktiv, die Wirte für das Pathogen sind. Die Sensitivität einer Wirtspflanze gegen ein HST und somit gegen das Pathogen wird durch ein spezielles Gen determiniert. Fehlt dieses Gen, kommt es zwar zu Chlorosen, nicht aber zum Zelltod (Lamari et al., 1991). Strukturell sind HSTs sehr verschieden. Meist sind es aber

kleine Moleküle des Sekundärstoffwechsels. Als Protein-Toxine wurden bisher nur Ptr ToxA und Ptr ToxB des Pilzes *Pyrenophora tritici* beschrieben (Ballance et al., 1989; Strelkov et al., 1998). Fast alle der bislang untersuchten HSTs werden von Pilzen produziert (Walton, 1996). Nichtspezifische Toxine dagegen schädigen breitflächig verschiedene Pflanzenarten. Ein Beispiel hierfür sind Trichothecene des Pilzes *Fusarium*, die toxisch für alle Monokotyledonen sind (Wakulinski, 1989).

Sowohl HSTs als auch nichtspezifische Toxine lösen neben dem Zelltod Signale für die Pathogenabwehr aus. Neben ROS wird die Akkumulation von Jasmonsäure, Salicylsäure oder Ethylen aktiviert (Romanoko, 1959; Shain et al., 1975; Williamson et al., 1992; Nishiuchi et al., 2006). Teilweise ist der durch HSTs induzierte Zelltod abhängig von der Initiierung dieser Stoffwechselwege (Asai et al., 2000).

#### 1.4 PsojNip und PaNie als Mitglieder der NLP-Familie

In der großen Diversität pathogener Moleküle befindet sich die stetig wachsende Familie der sogenannten NLPs. Vertreter dieser Familie sind in Bakterien, Pilzen und Oomyceten zu finden. Das erste beschriebene Mitglied, Nep1 (*Necrosis and ethylene inducing protein 1*), wurde 1995 von Bailey et al. aus *Fusarium oxysporum* isoliert (Bailey, 1995). Die Abkürzung NLP steht demnach für *Nep1-like protein*. Das funktionelle Hauptcharakteristikum der NLP-Proteine ist eine starke Induktion von Zelltod sowie die Ethylenproduktion in Dikotyledonen, wobei die Effektivität zwischen verschiedenen NLPs schwankt (Bailey, 1995; Koch et al., 1998; Fellbrich et al., 2002; Qutob et al., 2002). Zum jetzigen Zeitpunkt ist eine eindeutige Zuordnung dieser Proteine zu PAMPs oder Toxinen nicht möglich. Sie werden deshalb in der Literatur als Virulenzfaktoren eingestuft. Es konnte gezeigt werden, dass eine Expression des *Fusarium*-Nep1 in *Colletotrichum coccodes* dessen Virulenz drastisch erhöht. Während Wildtyp-Stämme milde Symptome in Saftpappel, Tomaten- oder Tabakpflanzen auslösten, induzierten Nep1-exprimierende Stämme starken Zelltod (Amsellem et al., 2002). Ergänzend muss erwähnt werden, dass ein Verlust von Nip (*necrosis inducing protein*) in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* die Fähigkeit zur Zelltodinduktion und somit die Pathogenizität des Bakteriums deutlich herabsetzt (Mattinen et al., 2004). Es gibt Forschungsansätze, eine durch Nep1 induzierte Hypervirulenz von Pathogenen für die biologische Unkrautbekämpfung zu nutzen (Bailey et al., 2000; Amsellem et al., 2002). Ein weiterer Hinweis auf eine unterstützende Funktion bei der Virulenz bietet die Untersuchung der Expressionskinetik von Nip aus dem Hemibiotroph *Phytophthora sojae* (PsojNip). Qutob et al. konnten zeigen, dass das Protein beim Übergang des

Pathogens von der biotrophen zur nekrotrophen Lebensweise exprimiert wird (Qutob et al., 2002).

Die Sequenzen der NLPs zwischen den verschiedenen Organismen sind konserviert. Alle zeichnen sich durch ein N-terminales Signalpeptid und die NPP1-Domäne (GHRHDWE) aus (Gijzen et al., 2006), wobei die Funktion der NPP1-Domäne bislang unklar ist. Durch die Anzahl der Cysteine lassen sich NLPs in zwei Gruppen teilen: TypI mit 2 und TypII mit 4 konservierten Cysteinen. Letztere kommt nur in Pilzen und Bakterien, aber nicht in Oomyceten vor (Gijzen and Nurnberger, 2006). Gut untersuchte Vertreter des TypI sind NPP1 (*Phytophthora parasitica*) (AAK19753), PaNie (*Pythium aphanidermatum*) (AAD53944), PsojNip (*Phytophthora sojae*) (AAM48170) sowie Nep1 (*Fusarium oxysporum*) (AAC97382). Die durch diese NLPs induzierten Abwehrreaktionen sind in Tabelle 1-2 zusammengefasst.

**Tabelle 1-2 Zusammenfassung der durch NLPs ausgelösten Abwehrreaktionen**

Die Ergebnisse wurden aus folgenden Veröffentlichungen zusammengestellt: (Jennings et al., 2001); (Fellbrich et al., 2002); (Keates et al., 2003); (Wörle, 2004); (Bae et al., 2006); (Qutob et al., 2006). + steht für die Induktion der genannten Abwehrmechanismen, - für keine Induktion. Nicht analysierte Reaktionen sind mit n.d. gekennzeichnet.

	Nep1	NPP1	PaNie	PsojNip
Zelltod	+	+	+	+
Reduktion des Keimlings- und Wurzelwachstums/Keimungsrate	+	n.d.	n.d.	+
Ionenströme/Alkalinisierung des Zellkulturmediums	+	+	+	n.d.
ROS-Produktion	+	+	n.d.	+
Aktivierung einer MAP-Kinase-Kaskade	n.d.	+	n.d.	n.d.
Kallosedeposition	n.d.	+	+	n.d.
Salicylsäureakkumulation	n.d.	+	+	n.d.
Jasmonsäureakkumulation	n.d.	-	n.d.	n.d.
Ethylen	+	+	+	n.d.
Induktion von Abwehrgenen	+	+	n.d.	n.d.
Phytoalexine	n.d.	+	+	+
Morphologische Veränderungen teils einhergehend mit Metabolitverlusten	+	n.d.	n.d.	n.d.

Die Familie der NLPs induziert neben dem Zelltod eine Bandbreite an Abwehrreaktionen (Qutob et al., 2006). Doch trotz intensiver Forschung konnte bisher noch kein Rezeptor identifiziert werden, der für die Zelltodinduktion essentiell ist (Küfner, 2008).

## 1.5 Zielstellung der Arbeit

Der Oomycet *Phytophthora sojae* ist der Erreger der Stamm- und Wurzelfäule bei der Sojabohne und verursacht jährlich ca. 10% Ernteeinbußen. Er ist demnach einer der aggressivsten Schädlinge dieser Nutzpflanze. *Arabidopsis* ist resistent gegen die meisten *Phytophthora*-Stämme und reagiert auf Inokulationen mit diesen Pathogenen mit der Ausprägung eines HR-ähnlichen Zelltodes (Kamoun et al., 1999).

Einer der vielen Virulenzfaktoren von *P. sojae* ist PsojNip (Qutob et al., 2002). Die bislang vorliegenden Daten zu PsojNip-induzierten Abwehrantworten in *Arabidopsis* sind verglichen zu anderen NLPs gering (Qutob et al., 2002; Qutob et al., 2006). Auch eine Verknüpfung der verschiedenen Stoffwechselwege untereinander durch Analyse verschiedener *Arabidopsis*-Genotypen wurde bisher noch nicht durchgeführt.

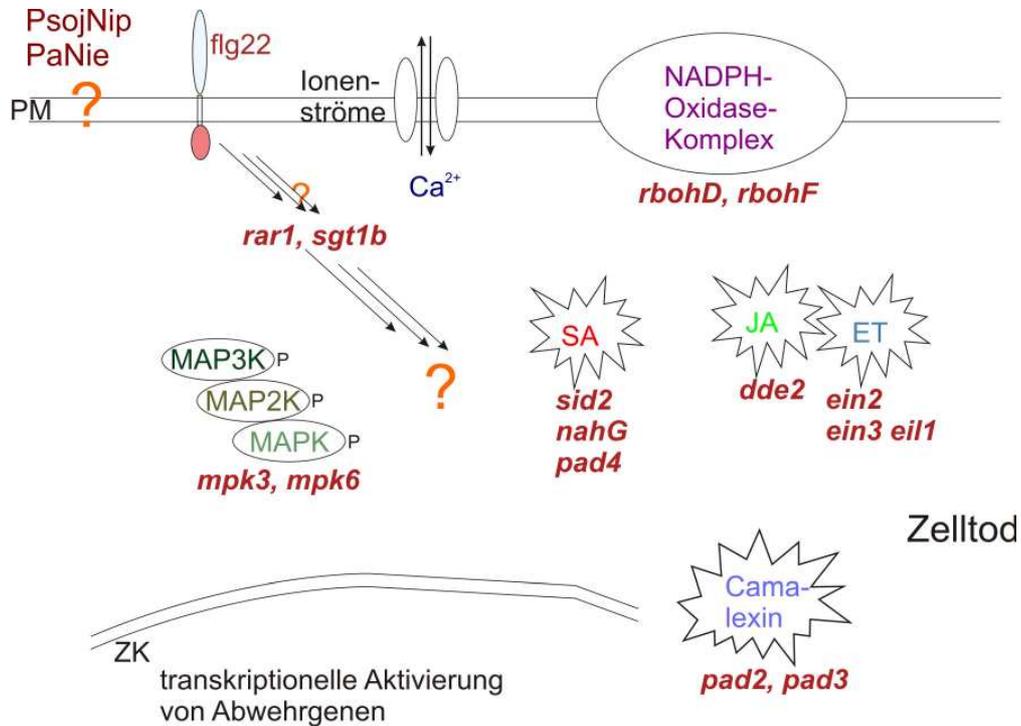
Ziel der Arbeit war es, Abwehrmechanismen und deren Synergien nach PsojNip-Infiltration in *Arabidopsis* zu untersuchen. Neben Wildtyppflanzen Col-0 und Ler-0 kamen Mutanten der bekannten Stoffwechselwege einschließlich Mutanten der R-Gen-vermittelten Resistenz zum Einsatz. Die untersuchten Reaktionen neben Zelltod und Ionenströmen, speziell  $\text{Ca}^{2+}$ , und die dazugehörigen Mutanten waren:

*oxidative burst*: *rbobD*, *rbobF*; MAP-Kinase-Kaskade: *mpk3*, *mpk6*; Salicylsäure: *sid2*, *nahG*, *pad4*; Jasmonsäure: *dde2*; Camalexin: *pad2*, *pad3*.

Hinzukamen noch Mutanten der R-Gen-vermittelten Resistenz *rar1* und *sgt1b* sowie die Mutanten *ein2* und *ein3eil1* des Ethylenweges.

Zum Vergleich wurden die Pflanzen mit PaNie, einem weiteren Mitglied der NLP-Familie, und dem gut charakterisierten Peptidelizitor flg22 behandelt. Um die Analysen durchführen zu können, waren Expressions- und Rückfaltungsstudien und damit einhergehend Untersuchungen zur Stabilität von PsojNip notwendig. Weiterhin wurde die Rolle des dritten, nichtkonservierten Cysteins in der Aktivität von PsojNip untersucht.

Das in Abb. 1-6 dargestellte Schema visualisiert die untersuchten Reaktionen sowie die verwendeten Mutanten. Da für PsojNip und PaNie bisher keine Informationen über die Induktion sowie Verknüpfungen der einzelnen Stoffwechselwege zur Verfügung stehen, wurden keine Pfeile eingefügt.



**Abb. 1-6 Zusammenfassung der für die vorliegende Arbeit verwendeten Genotypen**

Übersicht über die analysierten Stoffwechselwege und die verwendeten Mutanten. Messungen des Ethylengehaltes wurden nicht durchgeführt. P=Plasmamembran, ZK=Zellkern

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: Roth (Karlsruhe, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Sigma (München, Deutschland) und Serva (Heidelberg, Deutschland). Chemikalien für Nährmedien lieferte Duchefa (Haarlem, Niederlande)

Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden von Promega (Mannheim, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) lieferte Oligonukleotide und führte Sequenzierungen von Plasmiden durch

Flg22 und Pep13 wurden hausintern mit einem „Economy Peptide Synthesizer EPS 221“ (ABIMED, Langenfeld, Deutschland) synthetisiert.

#### 2.1.2 Plasmide

Tabelle 2-1 Verwendete Plasmide

Name	Vektor	Insertion	Charakterisierung	Herkunft	Verwendung
His <sub>6</sub> -Nip	pDEST17	PsojNip aus pTA700-Nip	N-terminale His <sub>6</sub> -Fusion	Diese Arbeit	Expression
GST-Nip	pDEST15	PsojNip aus pTA700-Nip	N-terminale GST-Fusion	Diese Arbeit	Expression
PsojNip	pPROEX HT	PsojNip	C-terminale His <sub>6</sub> -Fusion	Prof. Dr. M. Gijzen	Expression
PaNie	pQE-60	PaNie	C-terminale His <sub>6</sub> -Fusion	Prof. Dr. T. Nürnberger	Expression

### 2.1.3 Oligonukleotide

Tabelle 2-2 Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
attB1Nipfw	AAA AAG CAG GCT GTA GCG TTA TCA ACC ACG ACC	Gateway-Klonierung
attB1Niprev	AGA AAG CTG GGT GTT AAG CGT AGT AGG CGT TGC	Gateway-Klonierung
Nipfwd	AGC GTT ATC AAC CAC GAC CA	Kontrolle
Niprev	TTA AGC GTA GTA GGC GTT GC	Kontrolle
NC56S	CAC ATC AGC AAC GGC TCC CAC CCG TAC CCT GCC GTC GAC AAT AAC GGC AAC ACG	ortsgerichtete Mutagenese C56 ersetzt durch S
NC56Srev	CGT GTT GCC GTT ATT GTC GAC GGC AGG GTA CGG GTG GGA GCC GTT GCT GAT GTG	ortsgerichtete Mutagenese C56 ersetzt durch S
NC82S	AGC GAG AGC GCC GGG TCC AAG GGC TCC GGC TAC	ortsgerichtete Mutagenese C82 ersetzt durch S
NC82Srev	GTA GCC GGA GCC CTT GGA CCC GGC GCT CTC GCT	ortsgerichtete Mutagenese C82 ersetzt durch S
NipC128S	CAC GAC TGG GAG GCG TCC GTT GTC TGG GTG GAC GAC ATC GCT GCG	ortsgerichtete Mutagenese C128 ersetzt durch S
NipC128Srev	CGC AGC GAT GTC GTC CAC CCA GAC AAC GGA CGC CTC CCA GTC GTG	ortsgerichtete Mutagenese C128 ersetzt durch V
NipC193V	CAC GAC TGG GAG GCG GTC GTT GTC TGG GTG GAC GAC ATC GCT GCG	ortsgerichtete Mutagenese C128 ersetzt durch S
NipC193Vrev	CGC AGC GAT GTC GTC CAC CCA GAC AAC GAC CGC CTC CCA GTC GTG	ortsgerichtete Mutagenese C128 ersetzt durch V

## 2.1.4 Bakterien

Tabelle 2-3 Verwendete Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Resistenz	Herkunft
DH5 $\alpha$	F- $\varphi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ) <i>pboA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> $\lambda$ -		Bethesda Research Laboratories (MD, USA)
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> $\Delta$ M15 Tn10 (Tetr)]		Tetracyclin
BL21	F-, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (rB- mB-), gal		Invitrogen, (Groningen, Niederlande)
AD494	$\Delta$ <i>ara-leu7967</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> $\Delta$ <i>pboAPvuII</i> <i>pboR</i> $\Delta$ <i>malF3F'</i> [ <i>lac</i> <sup>+</sup> ( <i>lacIq</i> ) <i>pro</i> ] <i>trxB::kan</i>	Kanamycin	Kanamycin
Origami	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74</i> $\Delta$ <i>pboA PvuII pboR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[ <i>lac</i> <sup>+</sup> <i>lacI<sup>q</sup></i> <i>pro</i> ] <i>gor522::Tn10 trxB</i> (Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Kanamycin, Tetracyclin	Kanamycin, Tetracyclin
Origami(DE3)pLys	$\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 $\Delta$ <i>lacX74</i> $\Delta$ <i>pboA PvuII pboR araD139 ahpC galE galK rpsL</i> F'[ <i>lac</i> <sup>+</sup> <i>lacI<sup>q</sup></i> <i>pro</i> ] (DE3) <i>gor522::Tn10 trxB pLysS</i> (Cam <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol	Kanamycin, Tetracyclin, Chloramphenicol

## 2.1.5 Pflanzen

Neben den Wildtypen Col-0 und Ler-0 wurden folgende Genotypen verwendet:

Tabelle 2-4 Verwendete Genotypen

Linie	Ökotyp	Charakteristik	Referenz
<i>rbobD</i>	Col-0	Mutation in <i>RBOHD</i> (At1g09090) , Spm1-Insertion	Torres, M.A. et al., 2002
<i>rbobF</i>	Col-0	Mutation in <i>RBOHF</i> (At1g64060), Spm1-Insertion	Torres, M.A. et al., 2002
<i>mpk3</i>	Col-0	<i>Fast neutron</i> -Mutation <i>MPK3</i> (At3g45640)	Miles, G.P. et al. 2005
<i>mpk6</i>	Col-0	ihpRNA-Insertion <i>MPK6</i> (At2g43790)	Menke, F.L. et al. 2004

Linie	Ökotyp	Charakteristik	Referenz
<i>pad2</i>	Col-0	EMS-Mutation <i>GSH1/CAD2</i> (At4g23100)	Glazebrook, J. et al. 1994
<i>pad3</i>	Col-0	Cytochrom P450 Monooxygenase <i>CYP71B15</i> (At3g26830)	Glazebrook, J. et al. 1994
<i>pad4</i>	Col-0	EMS-Mutation Lipase-ähnliches Protein (At3g52430)	Glazebrook, J. et al. 1996
<i>sid2</i>	Col-0	EMS-Mutagenese von <i>ICS1</i> (At1g74710)	Nawrath, C. et al. 1999
<i>nabG</i>	Col-0	Expression einer Salizylhydroxylase aus <i>P.putida</i>	Delaney, T.P. et al. 1994
<i>ein2-1</i>	Col-0	EMS-Mutation Nramp Metallionentransporter (At5g03280)	Alonso, J.M. et al. 1999
<i>ein3-1 eil1-1</i>	Col-0	EMS-Mutation Transkriptionsfaktor ein3 (At3g20770) und En-I-Mutation von Transkriptionsfaktor eil1 (At2g27050)	Alonso, J.M. et al. 2003
<i>dde2-2</i>	Col-0	T-DNA-Insertion in <i>AOS1</i> (CYP74A) (At5g42650)	Park, J. et al. 2002
<i>sgf1b-1</i>	Ler-0	EMS-Mutation <i>SGT1B</i> (At4g11260)	Tör, M. et al. 2002
<i>rar1-10</i>	Ler-0	<i>Fast neutron</i> -Mutation von <i>RAR1</i> (At5g51700)	Muskett, P.R. et al. 2002

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung von Pflanzen und Zellkulturen

#### 2.2.1.1 Anzucht von *Arabidopsis*-Pflanzen

Die Pflanzen wuchsen in 5 x 5 x 5,5 - cm Töpfen auf einem Kultursubstrat bestehend aus 60 % Einheitserde GS90 und 40 % Vermiculit. Die für Experimente verwendeten Pflanzen wurden in speziellen Phytokammern bzw. Anzuchtschränken unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) angezogen und nach ca. 6 Wochen geerntet. Im Hellen betrug die Temperatur 23 °C, im Dunkeln 21 °C bei einer durchschnittlichen relativen Luftfeuchtigkeit von 60 % und einer Lichtstärke von 150 µMol/m<sup>2</sup>s.

Für die Samenbildung wuchsen die Pflanzen unter standardisierten Langtagbedingungen (16 h Licht/ 8 h Dunkelheit, 22 °C, relative Luftfeuchtigkeit 63 %) im Gewächshaus.

### **2.2.1.2 Zellsuspensionskulturen**

Als Nährmedium für *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen wurde Murashige und Skoog (MS) Medium (pH 5,7), versetzt mit Gamborg B5 Vitaminen, 1 mg/l 2,4-D und 30 g/l Saccharose verwendet. Petersilie-Zellkulturen (*Petroselinum crispum*) wurden in modifiziertem B5-Medium mit 1 mg/l 2,4-D (HA-Medium) kultiviert. Die Kulturen wurden bei 25 °C im Dunkeln geschüttelt und nach 5 d für Experimente geerntet.

Zur Bereitstellung frischer Kulturen wurden wöchentlich 30 ml Nährmedium mit 10 ml alter Zellkultur angeimpft.

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Plasmidpräparation**

Für die Plasmidpräparation wurde das Plasmid-Mini-Kit von Qiagen (Düsseldorf, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.2.2 Transformation von *E. coli***

Zur Herstellung chemokompetenter Zellen wurden 250 ml SOB-Medium (20 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub> pH 7,0) mit einer Übernachtskultur inokuliert und bei 18 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 wachengelassen. Für die Ernte wurde die Kultur zunächst 10 min auf Eis gestellt und anschließend 10 min bei 4 °C und 5000 x g sedimentiert. Das Pellet wurde in 80 ml kaltem TB-Puffer (10 mM PIPES; 15 mM CaCl<sub>2</sub>; 250 mM KCl; 55 mM MnCl<sub>2</sub>; pH 6,7) resuspendiert, erneut auf Eis inkubiert und sedimentiert. Zur Lagerung bei -80 °C wurde das Sediment in 20 ml TB-Puffer mit 7 % DMSO resuspendiert.

Für die Transformation wurden kompetente *E. coli* mit 1-5 µg DNA gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 45 sek wurden 1 ml antibiotikumfreies LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 g/l NaCl) zugegeben und die Zellen bei 37 °C geschüttelt. Die Selektion erfolgte über LB-Platten (LB-Medium mit 15 g/l Agar-Agar) mit dem entsprechenden Antibiotikum.

### **2.2.2.3 Polymerasekettenreaktion**

Um DNA-Fragmente definierter Größe zu amplifizieren, wurde die Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) eingesetzt. Diese Methode wurde für Klonierungen, ortsgerechte Mutagenese sowie die Kontrolle von *E. coli*-Transformanden verwendet. Der 20 µl Reaktionsansatz bestand aus 2 µl DNA, 1 x Reaktionspuffer, 200 µM Desoxyribonukleotide (dNTPs), je 20 ng Oligonukleotide und 1 U *Taq*-DNA-Polymerase und Wasser. Für Klonierungen wurde *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Durchgeführt wurde die PCR mit einem *Thermocycler* (GeneAmp PCR System 2400 und 9700, Perkin Elmer, MA, USA) mit folgendem Programm: 2 min 95 °C initiale Denaturierung, 2 min 95 °C Denaturierung, 30 sek Hybridisierung, 1 min/kb 72 °C Elongation (*Taq*), 7 min abschließende Elongation. Die verwendete Temperatur bei der Hybridisierung richtete sich nach den Oligonukleotiden. Wurde *Pfu*-Polymerase eingesetzt, erfolgte die Elongation für 2 min/kb. Die Schritte Denaturierung bis Elongation wurden 30-40 x wiederholt.

Für die Kontrolle von *E. coli*-Transformanden, wurden direkt *E. coli*-Zellen eingesetzt. Der initiale Denaturierungsschritt wurde dafür auf 5 min verlängert.

### **2.2.2.4 Restriktionsverdau**

Für den analytischen Restriktionsverdau wurden Enzyme von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet.

### **2.2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele (Agarose SeaKem® LE Agarose (Cambrex Bio Science, ME, USA) in 1x TAE (40 mM Tris-Acetat pH 8,0; 1 mM EDTA)) und 0,5 g/l Ethidiumbromid verwendet. Die Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer (10 mM EDTA; 30 % (v/v) Glycerin; 0,1 % Bromphenolblau) versetzt und mit 70 V in dem Gel aufgetrennt. Zur Größenbestimmung kam „Gene Ruler™ 1 kb DNA Ladder“ von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) zum Einsatz. Die Detektion erfolgte unter UV-Licht.

### **2.2.2.6 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

1 µg getrocknete Plasmid-DNA wurde von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) sequenziert. Die Auswertung erfolgte mit Programmen basierend auf dem BLAST-Algorithmus.

### **2.2.2.7 Herstellung der Expressionsvektoren für His<sub>6</sub>- und GST-fusioniertes PsojNip**

Die Klonierung erfolgte nach dem Gatewaysystem der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) mit den in Tabelle 2-2 aufgeführten Oligonukleotiden.

### **2.2.2.8 Ortsgerichtete Mutagenese**

Für die vorliegende Arbeit wurden gezielt Cysteine gegen Serin bzw. Valin ausgetauscht. Es wurde dafür das „QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene La Jolla USA) mit den in Tabelle 2-2 angegebenen Oligonukleotiden verwendet. Mittels Sequenzierung wurde die Mutagenese überprüft.

## **2.2.3 Proteinmethoden**

### **2.2.3.1 Expression von PsojNip und PaNie**

Für die Expression beider Proteine wurden mit den Plasmiden transformierte BL21-Zellen verwendet. Übernachtskulturen wurden 1:100 in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt und bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 5 h bei 37 °C wurden die Kulturen durch Zentrifugation (10 min, 5000 x g) geerntet und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Auch die *E. coli*-Stämme AD494, Origami und Origami(DE)pLys wurden wie beschrieben mit den in Tabelle 2-3 angegebenen Antibiotika angezogen.

### **2.2.3.2 Reinigung von inclusion bodies**

Das Protokoll zur Reinigung von *inclusion bodies* beinhaltet drei verschiedene Zellaufschluss- sowie zwei Waschschriffe, wodurch eine hohe Ausbeute und ein hoher Reinheitsgrad erreicht wurden.

Zellpellets aus je 300 ml Bakterienkultur wurden auf Eis in 13 ml Resuspensionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 25 % (w/v) Saccharose; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 % (w/v)

Natriumazid; 10 mM DTT) sorgfältig resuspendiert und mit Ultraschall (Level 50, 2 x 20 Puls) aufgeschlossen. Die Lösung wurde mit 5 mg Lysozym, 250 µg DNase I und 2 mM MgCl<sub>2</sub> versetzt und stark gemischt. Nach Zugabe von 12,5 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 % (w/v) Natriumdesoxycholat; 100 mM NaCl; 0,1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; 10 mM DTT) erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Dieser Schritt wurde mit 8 mM EDTA abgestoppt. Für den dritten Zellaufschluss wurden die Lösungen in flüssigem Stickstoff durchgefroren und im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Nach Zugabe von weiteren 8 mM MgCl<sub>2</sub> erfolgte nochmals eine Inkubation bei Raumtemperatur, bis die Viskosität deutlich verringert war (ca. 1 h). Die nachfolgenden Waschschriffe wurden bei 4°C durchgeführt. Die Lösungen wurden bei 11000 x g für 20 min bei 4 °C pelletiert und das Pellet einmal in Waschpuffer I (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 % (w/v) TritonX-100; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; 1 mM DTT) und einmal in Waschpuffer II (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,1 % (w/v) NaN<sub>3</sub>; 1 mM DTT) gewaschen.

### ***2.2.3.3 Solubilisierung der inclusion bodies***

Soweit nicht anders angegeben wurden pro 50-80 mg Einschlusskörper 5 ml Solubilisierungspuffer (20 mM Tris-HCl pH 8,0; 8 M Harnstoff; 50 mM DTT; 1 mM EDTA) zugegeben und bis zum Lösen des Pellets, meist über Nacht (ü.N.), bei Raumtemperatur stehen gelassen. Unlösliche Reste wurden bei 10000 x g, 30 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert

Um das DTT zu entfernen, die Cysteine des solubilierten Proteins aber im reduzierten Zustand zu halten, wurden die solubilierten Einschlusskörper gegen den Puffer 20 mM Tris-Acetat pH 4,0 mit 7 M Harnstoff im Verhältnis 1:1000 dialysiert. Die Konzentration wurde auf ungefähr 2 mg/ml mit diesem Puffer eingestellt.

### ***2.2.3.4 Rückfaltungsanalyse***

Für die Rückfaltungsanalyse wurden gereinigte Einschlusskörper (ca. 2 mg/ml) 1:50 unter Rühren langsam dem Puffer (Abb. 3-5) zugetropft. Dadurch ergab sich eine Restharnstoffkonzentration von 160 mM. Beinhalteten die Faltungslösungen Redoxsysteme, wurde weitestgehend unter Ausschluss von Sauerstoff, d.h. geschlossen und ohne weiteres Schütteln, über Nacht inkubiert. Die restlichen Lösungen wurden geschüttelt. Aggregationen

wurden entweder durch Messung bei 405 nm bestimmt oder visuell eingeschätzt. Die Aktivitätsbestimmung der Rückfaltung erfolgte durch Infiltration in Col-0-Blätter.

#### ***2.2.3.5 Rückfaltung der denaturierten Proteine und Aufbereitung der nativen Proteine***

Aus den durchgeführten Rückfaltungsanalysen ergab sich folgender Puffer als optimal für die Rückfaltung: 20 mM Tris-HCl pH 9,0; 10 mM GSH; 1 mM GSSG und 1 mM EDTA.

Der Rückfaltungspuffer wurde eine Minute intensiv mit Stickstoff begast und vor der Faltung gut gekühlt. Die Faltung wurde bei 4 °C durchgeführt.

Zur Rückfaltung wurden 2 ml des solubilisierten Proteins unter Rühren in 135 ml Faltungspuffer verdünnt. Die Proteinlösung wurde dazu langsam in den Puffer getropft. Im Anschluss an das Tropfen wurde die Lösung für weitere 10 Minuten gerührt und dann über Nacht stehen gelassen.

Vor den Experimenten wurden die Pufferkomponenten durch 24 h Dialyse gegen Wasser bei 4 °C entfernt. Um das Protein aufzukonzentrieren, bettete man die Dialyseschläuche in PEG 20000 ein, bis sich das Volumen bis zur gewünschten Menge verringert hat. Die auftretenden Makroaggregate wurden bei 11000 x g für 30 min bei 4 °C sedimentiert.

#### ***2.2.3.6 Extraktion von Proteinen aus Pflanzenmaterial***

Zellkultur- oder Blattmaterial wurde mit 30 µl Extraktionspuffer (25 mM Tris HCl pH 7,5; 75 mM NaCl; 15 mM EGTA; 15 mM Glycerophosphat; 15 mM 4-Nitrophenylphosphatbis[Tris]; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM NaF; 0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5 mM PMSF; 1110 µg/µl Leupeptin; 10 µg/µl Aprotinin; 0,001 % (v/v) Tween 20) versetzt. Mit einer Kugelmühle (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) wurden die Proben aufgeschlossen und die Zelltrümmer bei 23000 xg, 4 °C für 30 Minuten sedimentiert.

#### ***2.2.3.7 Bestimmung der Proteinkonzentration***

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford (1976) bestimmt. Für die Messung wurde ein Fertigreagenz von BioRad (München, Deutschland) nach Herstellerangaben verwendet. Die Eichgerade wurde mit Rinderserumalbumin erstellt.

### **2.2.3.8 Eindimensionale denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)**

Mit der eindimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. In der vorliegenden Arbeit wurde die PAGE nach Laemmli (Laemmli, 1970) angewendet. Die Gelzusammensetzung erfolgte nach Protokollen von Sambrook (Sambrook et al., 1989). Für die Trennung von PsojNip oder PaNie wurden 12 %-ige, ansonsten 10 %-ige Polyacrylamidgele verwendet.

Proteinextrakte wurden vor dem Auftragen in SDS-Probenpuffer (Endkonzentration: 50 mM TrisHCl pH 6,8; 1 % (v/v) Mercaptoethanol; 2 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 10 % (v/v) Glycerin) bei 95 °C ca. 5 Minuten denaturiert. Zur Größenbestimmung kam der „Precision Plus Protein Standard“ von Bio-Rad (München, Deutschland) zum Einsatz.

Die Trennung erfolgte in Minigelapparaturen von Hoefer Scientific Instruments bei einer Stromstärke von 100-140 V im SDS-Laufpuffer (25 mM Tris; 200 mM Glyzin; 0,1 % (v/v) SDS).

### **2.2.3.9 Färbung von Polyacrylamidgelen**

Die Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie erlaubt eine Mindestdetektion von etwa 200-400 ng Protein pro Bande. Für die Färbung wurden die Gele in der Coomassielösung (30 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,05 % (w/v) Coomassie R250) bis zu einer satten Färbung leicht geschüttelt und überschüssiger Farbstoff mit 10 %-iger (v/v) Essigsäure entfernt.

Zur sensitiveren Färbung wurden die Polyacrylamidgele nach einem Protokoll nach Blum (Blum et al., 1987) mit silbergefärbt. Dafür wurden die Proteine zunächst mindestens 2 h an der Gelmatrix mit 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure fixiert. Der Fixierer wurde durch zweimaliges Waschen mit 30 %-igem Ethanol und einmal mit Wasser für 20 min entfernt. Nach einer einminütigen Vorbehandlung mit 0,2 g/l Natriumthiosulfat wurden die Gele 20 min mit Silbernitrat (2 g/l Silbernitrat; 750 µl/l Formaldehyd) inkubiert. Überschüssiges Natriumthiosulfat wurde zuvor mit Wasser (3 mal 15 Sekunden) abgewaschen. Die Entwicklung der Färbung erfolgte nach drei kurzen Waschschritten (30 Sekunden) mit 30 g/l Natriumkarbonat, 500 µl/l Formaldehyd und 4 mg/l Natriumthiosulfat. Die Entwicklung dauerte bis zu 5 Minuten und wurde bei ausreichender Färbung 10 min mit 7 %-iger (v/v) Essigsäure gestoppt. Die Gele wurden mit Wasser gewaschen und anschließend in 25 % (v/v) Ethanol und 3 % (v/v) Glycerin konserviert.

### **2.2.3.10 Immunodetektion von Proteinen**

Im Anschluss an eine PAGE können Proteine zur Immunodetektion auf eine Nitrocellulosemembran (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) transferiert werden. Nitrocellulosemembranen sowie Whattman-Filterpapiere in Gelgröße wurden dafür mit Transferpuffer (192 mM Glyzin; 25 mM Tris; 20 % (v/v) Methanol; 0,1 % (w/v) SDS) getränkt. Der Transfer erfolgte in einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen, Deutschland) nach der Semi-Dry-Methode bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Gel für eine Stunde.

Anschließend wurde die Membran zur Kontrolle mit PonceauS (0,4 % (w/v) in 3 % (v/v) Trichloressigsäure) gefärbt.

Unspezifische Proteinbindestellen auf der Membran wurden mit 3 % (w/v) Trockenmilch (Bio-Rad, München, Deutschland) in TBST (10 mM TrisHCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween20) eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C abgesättigt.

In Abhängigkeit von den verwendeten primären Antikörpern wurden Konzentration und Waschschritte sowie Entwicklung variiert. So erfolgte die Inkubation mit dem anti-His<sub>6</sub>-Antikörper (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland; Verdünnung 1:3000 in Trockenmilch/TBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Vor der Inkubation mit dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus, HRP-gekoppelt (Verdünnung 1:10000) wurde dreimal 10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Detektion des sekundären Antikörpers erfolgte über eine Peroxidasereaktion mittels ECL von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Bei der Reaktion werden Photonen emittiert, mit denen Filme (CL-XPosure Film Pierce, IL, USA) belichtet wurden. Die Entwicklung erfolgte mit einem COMPACT 2 X-Ray Film Prozessor (Protec Medizintechnik, Oberstenfeld, Deutschland).

Für die Detektion phosphorylierter MAP-Kinasen wurde ein gegen das phosphorylierte „TEY“-Motiv der Kinasen gerichteter Antikörper (Kanninchen-Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204) Antikörper von Cell Signaling Technology, MA, USA) eingesetzt. Nach dem Blocken in 3 % Milch für 1 h bei Raumtemperatur wurde die Membran mit dem 1:1000 verdünnten primären Antikörper (in 0,1 % TBST mit 3 % Rinderserumalbumin) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Als zweiter Antikörper kam nach vorsichtigem Waschen (3x 5 min) mit 0,1 x TBST der Antikörper  $\alpha$ -Kanninchen-IgG; HRP-gekoppelt (Bio-Rad, München, Deutschland) (1 h bei Raumtemperatur) zum Einsatz. Zur Entwicklung wurde nach erneutem Waschen die Membran mit SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat der Firma

Pierce (Rockford, IL, USA) behandelt. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte wie oben beschrieben.

#### ***2.2.3.11 Proteolytischer Verdau der Proteine***

Für den Verdau der Proteine kamen Trypsin (Roche), ArgC (Sigma), LysC (Sigma), GluC (Axxora, Lörrach) und Protease Type XIV (Sigma) zum Einsatz. Es wurden jeweils 100 µg, bei Trypsin 10 µg Protein nach Herstellerangaben ü.N. verdaut.

### **2.2.4 Untersuchung der aktivierten Abwehrreaktionen**

#### ***2.2.4.1 Elizitierung von Pflanzen und Suspensionskulturen***

Ca. 6 Wochen alte *Arabidopsis* Genotypen (Tabelle 2-4) wurden mit je 2 µM flg22, PsojNip, PaNie und Wasser als Kontrolle infiltriert, indem mit einer 1 ml-Spritze ohne Kanüle die Flüssigkeit in die Unterseite des Blattes gedrückt wurde. Die Blätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mit einem Skalpell geerntet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für die Elizitierung von Zellkultur wurden 5 Tage alte Kulturen über einen Büchnertrichter abgesaugt, mit I-Medium (10 mM MES, 4 % MS, 3 % Saccharose) gewaschen, 1 g Zellen in 10 ml I-Medium resuspendiert und entsprechend der Versuche in Petrischalen aufgeteilt. Nach einer mindestens zweistündigen Ruhezeit im Dunkeln unter Schütteln wurden *Arabidopsis*-Zellkulturen mit je 2 µM flg22, PsojNip, PaNie und Wasser als Kontrolle induziert. Petersilie-Zellkulturen wurden statt mit flg22 mit 2 µM Pep13 elizitiert. Entweder wurden die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren oder für weitere Messungen verwendet.

#### ***2.2.4.2 Detektion des Zelltoodes***

Der bei Blättern mit bloßem Auge sichtbare Zelltod wurde zu den angegebenen Zeitpunkten fotografiert. Zur genaueren Analyse wurde die Trypanblaufärbung eingesetzt. Trypanblaufärbung ist ein Indikator für tote Zellen. 0,1 % Trypanblau, gelöst in Laktophenol (Laktat:Glycerin:Phenol:H<sub>2</sub>O =1:1:1:1), wurde 1:2 in Ethanol verdünnt. Mit dieser Färbelösung wurden zu analysierende Blätter ca. 2 min gekocht und anschließend in Chloralhydrat (500 mg/200 ml H<sub>2</sub>O) entfärbt. Die Dokumentation erfolgte fotografisch.

### **2.2.4.3 Bestimmung des Anstiegs der zytosolischen Kalziumkonzentration**

Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration wurde mittels pMAQ2-exprimierender *Arabidopsis*-Pflanzen bestimmt. Diese Pflanzen exprimieren Äquorin unter der Kontrolle eines 35S-Promoters (M.Knight, Durham University, UK). Gemessen wurde in 96-Lochplatten. Drei ca. 1 mm breite Blattstreifen wurden in ein Loch mit 100 µl 10 µM Coelenterazin (in H<sub>2</sub>O) (Stammlösung 5 mM in Methanol, Molecular Probes/Invitrogen, Karlsruhe) gegeben und mindestens 4 h, meist jedoch ü.N. rekonstituiert. Nach der Elizitierung wurde die Lumineszenz mit Luminoskan Ascent 2.1 Luminometer (Thermo Scientific, Waltham, USA) über die angegebene Zeit gemessen. Zur Bestimmung der Gesamtäquorinmenge wurde verbleibendes Äquorin mit dem gleichen Volumen 2 M CaCl<sub>2</sub> in 20 % EtOH entladen und die Lumineszenz detektiert.

### **2.2.4.4 Bestimmung des gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

Die Grundlage der für Zellkulturen angewendeten Methode ist eine ferricyanidkatalysierte Peroxidation von Luminol durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu einem Aminophthalimid, Wasser und Stickstoff (Warm et al., 1982). Die dabei auftretende Chemolumineszenz wurde mit einem Luminometer (Lumat LB 9501) der Firma Bertold (Bad Wildbad) detektiert. Die Messung erfolgte in 5-ml Polystyrolröhrchen (Sarstedt). Zu 750 µl Kaliumphosphat-Puffer (50 mM, pH 7,9) wurden 20 µl Zellkulturüberstand gegeben und über den Lumat automatisch 200 µl Luminol (0,3 mM in Kaliumphosphat-Puffer) und 100 µl Kaliumhexacyanoferrat-(III) (14 mM in Kaliumphosphat-Puffer) injiziert. Drei Sekunden nach der letzten Injektion wurde die Chemolumineszenz über 5 Sekunden in relativen Lichteinheiten (RLE) gemessen.

Da diese Methode starken Schwankungen unterliegt, wurde auf eine Berechnung der absoluten Konzentration von gebildetem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verzichtet. Stattdessen wurde die Differenz zum Zeitpunkt t=0 min bestimmt (x-fache Änderung).

Auch in Blättern konnte die Menge gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mittels Luminol bestimmt werden. Dazu wurden Blätter in ca. 1 mm breite Streifen geschnitten und über Nacht, mindestens aber 4 bis 6 h in Wasser flottiert. Gemessen wurde in 96-Lochplatten. Je 3 bis 4 Streifen pro Loch mit 100 µl Wasser wurden und kurz vor der Messung mit 100 µl Reaktionslösung (pro 2 ml Reaktionslösung je 1 µl einer 400 µM Luminol-Lösung (DMSO) und einer HRP-Lösung (2 µg/µl in MeOH) in Wasser) versetzt. Detektiert wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach Behandlung mit 2 µM Elizitor mittels Luminoskan Ascent 2.1 Luminometer. Diese Methode ist nicht quantitativ und lässt nur Aussagen über Tendenzen zu. Zudem ergaben sich im Laufe der Experimente Sensitivitätsprobleme bei dem Gerät, so dass nicht alle Genotypen mit allen Behandlungen gemessen werden konnten.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann des Weiteren durch DAB-Färbung detektiert werden. Dafür werden behandelte Blätter 24 h in DAB-Lösung (1 mg/ml DAB in H<sub>2</sub>O pH 2,8) inkubiert. Wasserstoffperoxid bildet dabei zusammen mit DAB ein braunes Präzipitat. Zur Entfernung des Chlorophylls wurden die Blätter ca. 2 min in 96 % Ethanol gekocht und überschüssiges DAB mit Chloralhydrat entfernt. Gelagert wurden die Blätter in 50 % Glycerin.

#### 2.2.4.5 Bestimmung der Salicylsäurekonzentration

Für die Bestimmung der Salicylsäure (SA)-Konzentration in der vorliegenden wurden aufgrund der Anzahl der Mutanten nur zwei unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen gemessen. Die biologischen Experimente setzten sich wiederum aus drei unabhängigen Behandlungen zusammen, um Faltungsschwankungen, verschieden starke Verletzungen sowie Einflüsse des circadianen Rhythmus auszugleichen. Damit die gesamte Beleuchtungsdauer für jede Pflanze nach der Infiltration gleich war, wurde nach 24 h geerntet.

50 mg lyophilisiertes Blattmaterial wurden in 1 ml 90 %-igem Methanol aufgenommen, im Ultraschallbad aufgeschlossen und bei 23000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0,5 ml 100 % Methanol aufgenommen, wiederum beschallt und zentrifugiert. Nach Zugabe von 20 µl 2 M NaOH zu den vereinten Überständen wurde die Lösung unter Vakuum vollständig getrocknet (SpeedVac System, Savant Instruments Inc., Holbrook NY). Die in 250 µl 5 % (w/v) Trichloressigsäure aufgenommenen Rückstände wurden zweimal mit Cyclohexan/Ethylacetat (1:1) ausgeschüttelt. Dadurch wird die freie Salicylsäure in die organische Phase extrahiert.

Die in der wässrigen TCA-Phase verbleibende glykosilierte Salicylsäure wurde nach Zugabe von 250 µl 8 M HCl durch Inkubation bei 80 °C für eine Stunde gespalten. Das Extrahieren der daraus freigesetzten unkonjugierten SA erfolgte wie oben beschrieben. Beide organischen Proben wurden 20 µl mobile Phase (40 % Methanol; 60 % Wasser pH 2,8 mit Essigsäure) versetzt und die Cyclohexan-Ethylacetat-Mischung durch Vakuum entfernt. Die verbleibenden 20 µl mobile Phase wurden in weiteren 200 µl aufgenommen und die Lösung mit einem Spritzenfilter (4 mm, Whatman International Ltd.

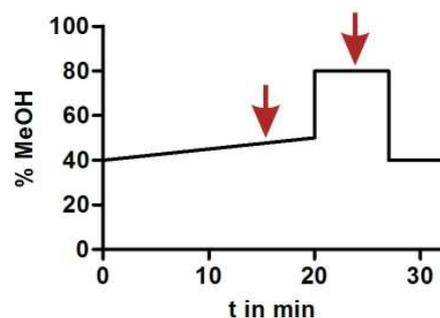


Abb. 2-1 Schematische Darstellung des Gradienten zur Bestimmung der SA- und Camalexinkonzentration

Die Pfeile kennzeichnen die Retentionszeit von SA (16') und Camalexin (24').

Maidstone, England) filtriert. Quantifiziert wurde die extrahierte Salicylsäure mittels *reversed-phase*-HPLC (RP-HPLC). Die Trennung erfolgte dafür über eine analytische C<sub>18</sub>-Säule (C<sub>18</sub>, 3 µm, 150 x 6 mm, Phenomenex, Ltd. Deutschland, Aschaffenburg). 20 µl Probe wurden injiziert und mit einem Laufmittelsystem aus Methanol (MeOH) und Wasser, pH 2,8 (Essigsäure) und folgendem Gradienten: linearer Gradient von 40 % MeOH zu 50 % MeOH in 20 min, 7 min 80 % MeOH, 5 min 40 % MeOH bei einer Flussrate von 0,7 ml/min aufgetrennt (Abb. 2-1). SA wurde mit dem Detektor JascoFP920 bei einer Emission von 410 nm nach einer Anregung mit 300 nm gemessen. Die Salicylsäure eluierte nach ca. 16 Minuten.

#### **2.2.4.6 Bestimmung der JA- und OPDA-Konzentration**

50 mg lyophilisierten Blattmaterials wurden mit je 100 ng D6JA- und D5OPDA-Standard versetzt, in ca. 10 ml resuspendiert, mit einem Ultraturax (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert und über mit Filterpapier bestückte Glaskartuschen (LiChrolut, Merck), filtriert. Die Reinigung des Filtrates erfolgt über Ionenaustauscher, wobei JA und OPDA an das DEAE-Sephadex binden. Dafür wurden Kartuschen mit 6 ml DEAE-Sephadex (50 % w/v in Methanol) gefüllt und mit 5 ml 100 % Methanol gewaschen. Der Durchfluss des Filtrats sowie die beiden Waschfraktionen (je 3 ml Methanol und 0,1 N Essigsäure in Methanol) wurden verworfen. Die Elution erfolgte mit je 3 ml 1 N Essigsäure (in Methanol) und 1,5 N Essigsäure (in Methanol). Das Eluat wurde bis zur Trockne eingengt, in 110 µl 50 % Methanol gelöst und Schwebteile abzentrifugiert. Die Proben wurden mittels HPLC gereinigt (Knauer, Berlin). Die Trennung erfolgte mittels RP-HPLC über eine C<sub>18</sub>-Säule (250x4 mm, Knauer). Die gesammelten Fraktionen von JA (t=12 min) und OPDA (t=20 min) wurden nach dem Einengen für GC-MS-Analysen derivatisiert. Dafür löste man die Proben in 200 µl Chloroform-, N-Ethyl-diisopropylamin-Gemisch (1:1) durch starkes Schütteln. Zu den 200 µl Lösung wurden 10 µl Pentafluorbenzylbromid als Derivatisierungsreagenz gegeben. Die Derivatisierung erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht oder für 1 h bei 60 °C. Anschließend wurden die Proben wiederum getrocknet und in 5 ml Hexan aufgenommen. Zur Entfernung überschüssigen Derivatisierungsreagenzs verwendete man Silizumoxid-Kartuschen (Merck). Die Proben wurden über die Kartuschen gegeben und der Durchlauf verworfen. Die Elution erfolgte mit 7 ml Hexan:Diethylether (2:1). Die getrockneten Proben löste man in 70 µl Acetonitril. Die quantitative Analyse wurde von Frau Ortel mittels GC-MS durchgeführt.

**2.2.4.7 Bestimmung des Camalexingehaltes in Arabidopsis-Pflanzen**

Camalexin wurde nach dem Salicylsäureprotokoll (2.2.4.5) extrahiert und konnte parallel zur SA gemessen werden. Die Retentionszeit für Camalexin beträgt 24 Minuten (Abb. 2-1).

**2.2.4.8 Bestimmung von Phytoalexinen im Medium von Petersiliezellkulturen**

Phytoalexine werden von Petersiliezellkulturen in das Medium sekretiert und können aufgrund ihrer Autofluoreszenz detektiert werden. Die Messung erfolgte in 96-Lochplatten mit Cytoflor II (Biosearch, Bedford, USA) bei einer Wellenlänge von 360 nm nach einer Anregung mit 440 nm.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Die Expression und Renaturierung von PsojNip

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der induzierten Abwehr in *Arabidopsis thaliana* durch die NLP-Mitglieder PsojNip und PaNie im Vergleich zu dem PAMP flg22. Dafür musste aktives PsojNip zur Verfügung stehen, womit sich Kapitel 3.1. beschäftigt. Die Optimierung der Expression und *in vitro*-Faltung wurde für PsojNip durchgeführt und die Bedingungen für PaNie übernommen.

In allen Abbildungen wird für PsojNip nur die Bezeichnung „Nip“ verwendet.

#### 3.1.1 Die Proteine PsojNip und PaNie im Vergleich

PaNie weist auf Aminosäureebene eine 56 %-ige Identität zu PsojNip auf und wurde bisher umfassend charakterisiert. Das Protein wird in *E. coli* als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) exprimiert und lässt sich durch Dialyse gegen Wasser rückfalten. Wie PsojNip besitzt es ein N-terminales Signalpeptid und die NPP1-Domäne (Kapitel 1.4) (Veit et al., 2001; Wörle, 2004).

Biophysikalisch weisen PsojNip und PaNie ähnliche Eigenschaften auf. So liegt der theoretische isoelektrische Punkt für PsojNip bei 5,92 und für PaNie bei 6,57 und beide Proteine ohne Signalpeptid gelten als hydrophil (PsojNip GRAVY: -0,293; PaNie GRAVY -0,454; Berechnung nach Kyte und Doolittle (Kyte et al., 1982)). Die prozentuale Aminosäurezusammensetzung weicht bei PsojNip und PaNie kaum voneinander ab. Auffällig ist allerdings die Anzahl der Cysteine. PaNie besitzt, wie viele Mitglieder der Typ I NLP-Gruppe, zwei Cysteine (Gijzen and Nurnberger, 2006), PsojNip dagegen drei (Qutob et al., 2002). Eine Ähnlichkeitsanalyse nach „ExPASy Clustal 2.0.8 multiple sequence alignment“ ist in Abb. 3-1 abgebildet (s. nächste Seite).



Abb. 3-1 Sequenzvergleich von PsojNip und PaNie mit „ExpASy Clustal 2.0.8 multiple sequence alignment“

Identische Aminosäuren sind rot und mit Sternchen markiert. Blau markierte Aminosäuren sind anhand der physikochemischen Eigenschaften als ähnlich eingestuft, wobei Dunkelblau (:) sehr ähnlich und Hellblau (.) schwach ähnliche Aminosäuren kennzeichnet. Die konservierte NPP1-Domäne ist rot umrandet. Mit dargestellt ist das Signalpeptid der Proteine, was jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht verwendet wurde. Das Ende des Signalpeptides ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Hervorgehoben wurden weiterhin die Cysteine (gelb unterlegt). <http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/clustalw2>

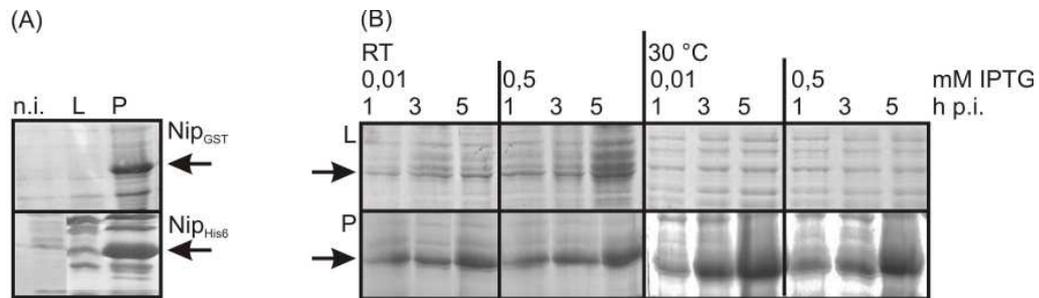
### 3.1.2 Studien zur löslichen Expression von PsojNip in *E. coli*

Zu Beginn der Arbeit wurden Expressionsanalysen sowohl mit GST-fusioniertem als auch His<sub>6</sub>-fusioniertem PsojNip durchgeführt. In der gesamten Arbeit wurde ausschließlich PsojNip ohne N-terminales Signalpeptid verwendet. GST hat mit ca. 25 kDa ungefähr die gleiche Größe wie PsojNip. Da aus diesem Grund eine Beeinflussung der Faltung von PsojNip durch GST zu vermuten war, wurden weiterführende Arbeiten mit His<sub>6</sub>-PsojNip (Konstrukt von Prof. Dr. M. Gijzen) durchgeführt. Diese Vermutung stützt sich auf Ergebnisse von Vorversuchen (Daten nicht gezeigt).

Bei einer Induktion mit 0,5 mM IPTG für 5 h und einer Temperatur von 37 °C führte sowohl die Expression von His<sub>6</sub>-fusioniertem PsojNip als auch GST-PsojNip in *E. coli* BL21 fast ausschließlich zur Bildung von *inclusion bodies*, einer Ablagerung fehlgefalteter und damit unlöslicher Proteine. Obwohl GST die lösliche Expression von Proteinen unterstützen kann (Ray, 1993), wirkte sich dies auf PsojNip nicht positiv aus (Abb. 3-2 A).

Die Aggregation synthetisierter Polypeptidketten wird durch hohe lokale Konzentrationen begünstigt (Sorensen, 2005). Somit könnte eine Reduktion der Expressionsrate durch Verringerung der Temperatur, IPTG-Konzentration oder Expressionszeit die Einschlusskörperbildung vermindern. Eine Erniedrigung der Temperatur auf 30 °C bzw. Raumtemperatur sowie der Einsatz geringerer IPTG-Konzentrationen oder eine verkürzte

Expressionsdauer verringerte lediglich die Gesamtmenge rekombinanten Proteins. Ein signifikanter Anstieg löslichen PsojNip konnte nicht beobachtet werden (Abb. 3-2 B). Bei 16 °C war nach 5 h kein exprimiertes Protein detektierbar (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 3-2 Die Expression von PsojNip unter verschiedenen Bedingungen**

Dargestellt sind mit Coomassie gefärbte SDS-PAGE-Gele. Die Pfeile kennzeichnen die zu PsojNip korrespondierende Porteinbande.

(A) Gegenüberstellung der löslichen (L) und unlöslichen (P) Proteinfraction von in *E. coli* exprimiertem GST-PsojNip und His<sub>6</sub>-PsojNip. Die Expression erfolgte bei 37 °C nach einer Induktion mit 1 mM IPTG für 5 h.

(B) Der Einfluss der Expressionstemperatur, -dauer sowie IPTG-Konzentration auf die *inclusion body*-Bildung von GST-PsojNip wurde mittels SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen wurden lösliche (L) und unlösliche Proteinfractionen nach Expression bei Raumtemperatur (RT) oder 30 °C und einer Induktion mit 0,01 bzw. 0,5 mM IPTG für 1,3 bzw. 5 h.

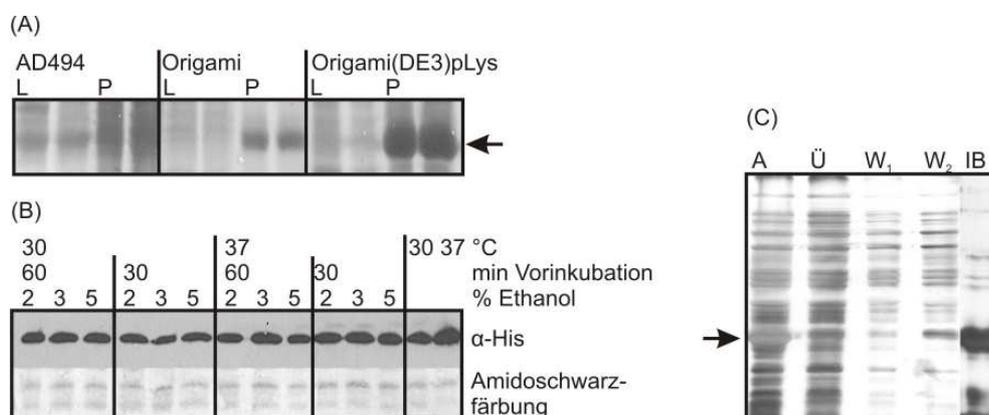
Für die native Struktur sowie Aktivität eines Proteins ist die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken notwendig. Diese Brücken werden durch Oxidation der SH-Gruppen von Cysteinen gebildet. Im Cytosol von *E. coli* sind allerdings durch das Thioredoxin- und Glutaredoxinsystem die Bedingungen stark reduzierend (Ziegler, 1977), weshalb eine Formation von Disulfidbrücken nur schwer möglich ist. Es gibt verschiedene *E. coli*-Stämme, die aufgrund von Mutationen in der Thioredoxinreduktase (TRXB) oder Glutathionreduktase (GOR) die Ausbildung von Cysteinbrücken unterstützen. In dieser Arbeit kamen die Stämme AD494, Origami(DE3) und Origami(DE3)pLys zum Einsatz. AD494 trägt eine Mutation im TRXB-Gen (Derman et al., 1993), wodurch die reduzierende Eigenschaft der Thioredoxinreduktase unterbunden und eine Bildung von Cysteinbrücken ermöglicht wird. In Origami-Zellen liegen sowohl das TRXB- als auch das GOR-Gen mutiert vor. Dies vergrößert noch mal deutlich die Fähigkeit zur Schwefelbrückenbildung (Prinz et al., 1997). Die Expression von His<sub>6</sub>-PsojNip in diesen Stämmen erhöhte allerdings den Anteil löslichen Proteins nicht wesentlich (Abb. 3-3 A).

Eine wichtige Rolle während der Proteinfaltung *in vivo* kommt den *chaperonen* zu. Sie verhindern beispielsweise durch Bindung an hydrophobe Seitenketten die Aggregation neusynthetisierter Polypeptidketten (Hartl et al., 2002). Bei Stress wie Hitze, Ethanol oder

Osmolyten schützen sie Proteine vor Aggregation. Die Aktivierung von *chaperonen* durch hohe Temperatur oder Ethanol kann demnach die Bildung von *inclusion bodies* reduzieren (Neidhardt, 1987; Steczko et al., 1991).

Es wurde versucht, die Löslichkeit von His<sub>6</sub>-PsojNip durch ethanolinduzierte *chaperone* zu erhöhen. Dazu wurden verschiedene Ethanolkonzentrationen, unterschiedliche Präinkubationszeiten nach Ethanolzugabe sowie verschiedene Expressionstemperaturen getestet. In Abbildung Abb. 3-3 B ist ein Immunoblot von den löslichen Fraktionen der verschiedenen Expressionen dargestellt. Sowohl in ethanolgestressten als auch ungestressten Zellen war PsojNip in der löslichen Fraktion detektierbar. Aber eine Steigerung des löslichen Proteinanteils durch Ethanolinduktion war nicht nachzuweisen. Die Menge löslichen Proteins im Vergleich zu aggregiertem Protein blieb minimal.

Zusammenfassend muss gesagt werden, dass trotz umfangreicher Tests verschiedener Bedingungen eine ausreichende lösliche Expression von PsojNip in *E. coli* nicht erreicht werden konnte. Für weitere Untersuchungen wurden His<sub>6</sub>-PsojNip-Einschlusskörper, wie im Kapitel 2.2.3.2 beschrieben, gereinigt (Abb. 3-3 C) und *in vitro* gefaltet. Um maximale Mengen von *inclusion bodies* für Rückfaltungsanalysen bereitzustellen, wurde His<sub>6</sub>-fusioniertes PsojNip nach Induktion mit 1 mM IPTG bei 37 °C für 5 h exprimiert. Auch für PaNip wurden diese Expressionsbedingungen verwendet



**Abb. 3-3 Versuche zur löslichen Expression von PsojNip und *inclusion body*-Reinigung**

Die dargestellten Pfeile kennzeichnen die zu His<sub>6</sub>-PsojNip korrespondierende Proteinbande.

(A) Dargestellt sind die löslichen (L) und unlöslichen (P) His<sub>6</sub>-PsojNip-Fraktionen exprimiert bei 37 °C nach einer Induktion mit 0,5 mM IPTG in den faltungsassistierenden Stämmen AD494, Origami und Origami(DE3)pLys. Analysiert wurde mittels SDS-PAGE. Die Detektion erfolgte mit Coomassie.

(B) Der Effekt der Ethanolzugabe auf die Bildung löslichen His<sub>6</sub>-PsojNip wurde mittels Immunoblot (α-His) analysiert. Als Ladungskontrolle wurde die Membran mit Amidoschwarz angefärbt. Weiterhin ist die lösliche Fraktion der His<sub>6</sub>-PsojNip-Expression ohne Zugabe von Ethanol bei 30 °C bzw. 37 °C dargestellt.

(C) Zur Überprüfung der inclusion body-Reinigung von His<sub>6</sub>-PsojNip wurden 2 µg über SDS-PAGE aufgetrennt und mit Silber gefärbt (A= Aufschluss der *E. coli*-Zellen, Ü= Überstand, W<sub>1</sub>, W<sub>2</sub>=Waschfraktionen, IB= gereinigte *inclusion bodies*).

Die Reinheit der präparierten *inclusion bodies* wurde regelmäßig per SDS-Gelelektrophorese überprüft. Sowohl PsojNip als auch PaNie liegen mit einer Reinheit von 80-90 % vor (Abb. 3-3 C). Dass PsojNip und PaNie die Hauptbestandteile der Präparation darstellen, konnte mittels LC/MS/MS-Messungen bestätigt werden. Peptide von *E. coli* wurden nicht identifiziert (durchgeführt von Dr. J. Neumerkel, Daten nicht gezeigt).

Versuche, das Protein im nativen oder denaturierten Zustand über NiNTA, Ionenaustauscher, Gelfiltration oder *reversed phase*-HPLC weiter aufzureinigen, waren nicht erfolgreich. Entweder eluierte PsojNip nicht vom Säulenmaterial oder der Reinigungseffekt war vernachlässigbar.

### 3.1.3 Analyse zur Rückfaltung von PsojNip

#### 3.1.3.1 Theorie der *in vitro*-Faltung

Die *in vitro*-Faltung beruht auf Entfernung des Denaturierungsmittels durch Dialyse oder Verdünnen. Verringert sich die Konzentration des Denaturierungsmittels, kommt es zu einer Konkurrenz zwischen Aggregation der Polypeptidketten und nativer Struktur (Goldberg et al., 1991; Kiefhaber et al., 1991). Das Auftreten von Aggregaten wird zum einen durch hydrophobe Wechselwirkung der entfalteten Polypeptidketten zum anderen durch Interaktion halbstrukturierter Intermediate bedingt (Abb. 3-4 A) (Rudolph et al., 1996). Die Faltungsbedingungen müssen daher für jedes Protein so optimiert werden, dass die native Struktur begünstigt wird. Neben Temperatur und Proteinkonzentration haben der pH-Wert und Additive (Faltungshelfer) Einfluss auf die korrekte Renaturierung. In Tabelle 3-1 sind einige Additive zusammengefasst.

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der gebräuchlichsten Additive

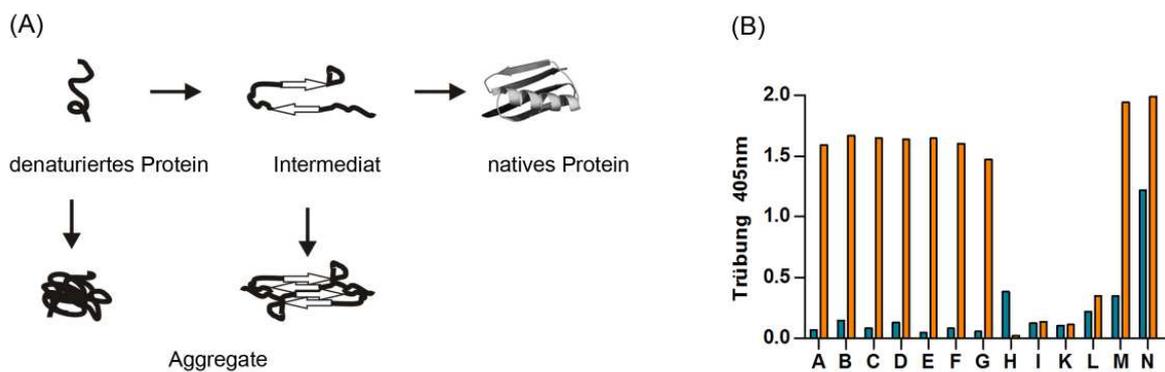
Klasse	Substanz	Prinzip	Referenz
Unterstützer der Oxidation durch Luftsauerstoff	CuSO <sub>4</sub>	Katalyse der Oxidation von Cysteinyresten	(Ahmed et al., 1975)
Redoxsystem/ Reduktionsmittel	GSH/GSSG DTT	Bereitstellung des optimalen Redoxpotentials ( <i>Redoxshuffling</i> -System) Schwächung fehlgefalteter Disulfidbrücken	(Ahmed et al., 1975)
Aggregationsinhibitor	Arginin Harnstoff Gdm-Cl	Verringerung der Protein-Protein-Assoziationsrate (GAP-Effekt) Destabilisierung von Aggregaten Verringerung unpolarer Wechselwirkungen Destabilisierung von Aggregaten Verringerung unpolarer Wechselwirkungen Destabilisierung von Aggregaten	(Baynes et al., 2005) (Reddy et al., 2005) (Jaenicke et al., 1997) (Jaenicke and Seckler, 1997)

Klasse	Substanz	Prinzip	Referenz
<b>Chemische <i>chaperone</i></b>	Brij58	Nachahmung des <i>chaperone</i> -Effektes durch Bindung an hydrophobe Bereiche	(Krause et al., 2002)
	PEG1500	Bindung an Intermediate Verhinderung von Aggregation	(Cleland et al., 1992)
	Glycerol	Abschirmung unpolarer Seitenketten oder des Rückgrates vor Wasser Destabilisierung des ungefalteten Zustandes	(Gekko et al., 1981) (Bolen et al., 2001)
	Saccharose	Erhöhung der Faltungskonstante Abschirmung unpolarer Seitenketten oder des Rückgrates vor Wasser Destabilisierung des ungefalteten Zustandes Erhöhung der Faltungskonstante	(Ou et al., 2002)
<b>Proteinstabilisatoren</b>	MgCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub>	Stabilisierung von Intermediaten, Stabilisierung von Proteinen durch direkte Bindung	(Pradeep et al., 2002) (Chen et al., 1997)
	KCl	Stabilisierung von Intermediaten, Stabilisierung von Proteinen durch direkte Bindung	(Pradeep and Udgaonkar, 2002)
	Tween20		
	TritonX100		

### 3.1.3.2 *Der Einfluss des Denaturierungsmittels auf die in vitro-Faltung von PsojNip*

Die Solubilisierung der gereinigten Einschlusskörper erfolgt über hohe Konzentrationen eines Denaturierungsmittels, meist Harnstoff oder Guanidiniumchlorid (Gdm-Cl). Ob das verwendete Denaturierungsmittel Einfluss auf die Faltbarkeit des Materials hat, wurde zu Beginn der Faltungsanalyse untersucht. Dafür wurden gereinigte Einschlusskörper in harnstoffhaltigem (20 mM Tris HCl pH 8,0; 50 mM DTT; 1 mM EDTA; 8 M Harnstoff) (Protokoll nach Nünberger, persönliche Kommunikation) oder Gdm-Cl-haltigem Puffer (50 mM Tris HCl pH 8,0; 4 mM DTT; 6 M Gdm-Cl) (Protokoll nach Gijzen, persönliche Kommunikation) solubilisiert. Durch visuelle Abschätzung kann gesagt werden, dass die Solubilisierung von PsojNip-*inclusion bodies* in 8 M Harnstoff oder 6 M Gdm-Cl gleich effizient ablief. Ausgehend von der Renaturierung von PaNip durch Dialyse gegen Wasser wurde für diese Untersuchung PsojNip tropfenweise in Wasser oder Wasser mit Additiven bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml verdünnt. Eingesetzte Additive waren: 10 % (v/v) Glycerin; 10 µM bzw. 80 µM CuSO<sub>4</sub>; 0,04 % (v/v) Triton X100; 0,01 % (w/v) PEG1500; 10 % (v/v) DMSO; 0,4 M Arginin; 0,002 % (w/v) Brij58; 0,3 M Saccharose. Die Präzipitation wurde über Trübungsmessungen bei 405 nm bestimmt. Im Gegensatz zu harnstoffsolubilisierten Einschlusskörpern neigte PsojNip, solubilisiert in 6 M Gdm-Cl, zu starker Präzipitation. Nur

der Zusatz von 0,4 M Arginin, 0,02 % (w/v) Brij58 oder 0,3 M Saccharose verhinderte die Aggregation. Da aber Saccharose und Arginin osmotisch wirksam sind und deshalb für Experimente in Pflanzen nicht eingesetzt werden können, mussten sie durch Dialyse entfernt werden. Die Proteine blieben dabei nicht in Lösung und die Proteinkonzentration der in Lösung gebliebenen Proteine war minimal. Lediglich bei einer Renaturierung in Brij58-haltigem Wasser präzipitierten Gdm-Cl-solubilierte Proteine auch nach Entfernen des Additivs nicht. Präzipitatbildung beim Entfernen von Arginin wurde auch bei harnstoffsolubilierten Einschlusskörpern beobachtet (Abb. 3-4 B). Um grundlegende Probleme bei der Rückfaltung in wässrigen Lösungen durch Präzipitatbildung zu umgehen, wurden die gereinigten Einschlusskörper für nachfolgende Experimente in 8 M Harnstoff solubiliert.



**Abb. 3-4 Präzipitatbildung bei der *in vitro*-Faltung**

(A) Schema der *in vitro*-Faltung. Bei der Rückfaltung denaturierter Proteine konkurrieren Aggregation und korrekte Faltung miteinander.

(B) Dargestellt ist die Präzipitatbildung (gemessen bei 405 nm) von PsojNip bei der Rückfaltung von harnstoffgelösten (blau) und Gdm-Cl-gelösten (orange) Einschlusskörpern in Wasser mit verschiedenen Faltungshelfern. A=H<sub>2</sub>O, B=H<sub>2</sub>O + 10 % (v/v) Glycerin, C=H<sub>2</sub>O+ 10 µM CuSO<sub>4</sub>, D= H<sub>2</sub>O+ 80 µM CuSO<sub>4</sub>, E= H<sub>2</sub>O + 0,04 % (v/v) TritonX100, F=H<sub>2</sub>O + 0,01 % (w/v) PEG, G=H<sub>2</sub>O + 10 % (v/v) DMSO, H= H<sub>2</sub>O + 0,4 M Arg, I= H<sub>2</sub>O + 0,002 % (w/v) Brij58, K= H<sub>2</sub>O + 0,3 M Saccharose. Die Puffer L, M, N entsprechen I, K, H, allerdings wurden die Additive durch Dialyse gegen Wasser über Nacht entfernt.

### **3.1.3.3 Bestimmung der optimalen Faltungsbedingungen**

Die für die Rückfaltungsanalyse verwendeten Basislösungen unterteilten sich in Wasser, 20 mM Tris pH 8,0 und 20 mM Tris pH 9,0. Diesen Basislösungen wurden verschiedene Additive zugesetzt, was in Abb. 3-5 zusammengefasst ist. Zur Überprüfung der Rückfaltungseffizienz wurden die Lösungen in *Arabidopsis*-Blätter infiltriert und die Nekrosebildung nach 24 h visuell ausgewertet. Als Kontrolle wurden die Faltungslösungen ohne Protein verwendet. Lösten diese Kontrollen Zelltod aus, wurden die Lösungen in weitere Untersuchungen nicht mit einbezogen. Die Nekrosebildung von positiven Rückfaltungen ist ebenfalls in Abb. 3-5 gezeigt. Mit elf der getesteten Lösungen ließ sich PsojNip aktiv falten. Vier dieser Lösungen basierten auf Wasser, drei auf 20 mM Tris pH 8,0 und vier auf 20 mM Tris pH 9,0. Das Redoxsystem GSH/GSSG zeigte in allen Lösungen einen positiven Effekt auf die Faltung. DTT unterstützte die Faltung in Wasser und 20 mM Tris pH 9,0. Aus der Gruppe der Proteinstabilisatoren erwies sich nur Tween20 in 20 mM Tris pH 9,0 als effektiv. Der chemische Chaperon PEG1500 wirkte sich in Wasser und 20 mM Tris pH 8,0 in Kombination mit Tween20 oder DTT unterstützend auf die *in vitro*-Faltung aus.

Nr.	Renaturierungslösung	Protein-konzentration $\mu\text{M}$	Trübung	Nekrose-bildung	Hintergrund-aktivität
	Additive	Konzentration			
	<b>Basis:</b>	<b>H<sub>2</sub>O</b>			
1	-		9,0	-	-
2	MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	1,5	-	-
3	Cu <sup>2+</sup>	0,1 $\mu\text{M}$	13,5	-	+
4	Cu <sup>2+</sup>	1,0 $\mu\text{M}$	11,6	-	-
5	Tween20	0,5 mM	3,9	-	-
6	PEG1500	0,03 % (w/v)	1,0	-	+
7	Glycerin	20 % (v/v)	0,9	-	+
8	Glycerin Saccharose	20 % (v/v) 1,0 % (w/v)	1,7	-	+
9	PEG DTT	0,03 % (w/v) 1,0 mM	1,7	-	+
10	PEG Tween	0,03 % (w/v) 0,5 mM	2,8	-	+
11	Tween DTT	0,5 mM 1,0 mM	3,3	-	-
12	DTT	1,0 mM	1,1	-	+
13	DTT EDTA	1,0 mM 1,0 mM	0,1	+	-
14	DTT KCl	1,0 mM 1,0 mM	1,9	-	-
15	GSH GSSG	10,0 mM 1,0 mM	1,7	-	-
16	GSH GSSG	5,0 mM 1,0 mM	2,0	-	+
17	GSH GSSG	1,0 mM 1,0 mM	1,9	-	-
18	GSH GSSG EDTA	5,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	3,0	-	-
19	GSH GSSG EDTA	1,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	2,4	-	+
	<b>Basis:</b>	<b>20 mM Tris pH 8,0</b>			
20	-		2,7	-	(+)
21	CaCl <sub>2</sub>	2,0 mM	0,1	-	-
22	MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	0,1	-	-
23	KCl DTT	1,0 mM 1,0 mM	2,6	-	(+)
24	Tween20	0,5 mM	2,9	-	(+)
25	PEG1500	0,03 % (w/v)	2,4	-	(+)
26	Glycerin Saccharose	20 % (v/v) 1,0 % (w/v)	1,4	-	+
27	PEG DTT	0,03 % (w/v) 1,0 mM	2,0	-	-
28	PEG Tween	0,03 % (w/v) 0,5 mM	2,9	-	+
29	Tween DTT	0,5 mM 1,0 mM	3,4 1,9	-	-
30	DTT	1,0 mM		-	(+)
31	DTT EDTA	1,0 mM 1,0 mM	2,4	-	(+)
32	GSH GSSG	10,0 mM 1,0 mM	0,0	+	-
33	GSH GSSG	5,0 mM 1,0 mM	1,0	-	(+)
34	GSH GSSG	1,0 mM 1,0 mM	2,4	-	+
35	GSH GSSG EDTA	5,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	4,1	+	+
36	GSH GSSG EDTA	1,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	2,2	-	-

Nr. 9
Nr. 10
Nr. 12
Nr. 16

-



+



Nip





















Nr.	Renaturierungslösung	Protein-konzentration $\mu\text{M}$	Trübung	Nekrose-bildung	Hintergrund-aktivität
	Additive	Konzentration			
	<b>Basis:</b>	<b>20 mM Tris pH 9,0</b>			
37	-		2,8	-	-
38	CaCl <sub>2</sub>	2,0 mM	0,1	-	-
39	MgCl <sub>2</sub>	2,0 mM	0,1	-	-
40	KCl DTT	1,0 mM 1,0 mM	2,2	-	-
41	Tween20	0,5 mM	2,8	-	+
42	PEG1500	0,03 % (w/v)	2,4	-	-
43	Glycerin Saccharose	20 % (v/v) 1,0 % (w/v)	2,4	-	+
44	PEG Tween	0,03 % (w/v) 0,5 mM	3,0	-	-
45	PEG DTT	0,03 % (w/v) 1,0 mM	2,7	-	-
46	Tween DTT	0,5 mM 1,0 mM	2,5	-	-
47	DTT	1,0 mM	2,9	-	-
48	DTT EDTA	1,0 mM 1,0 mM	2,6	-	+
49	GSH GSSG	10,0 mM 1,0 mM	1,5	-	+
50	GSH GSSG	5,0 mM 1,0 mM	1,3	-	(+)
51	GSH GSSG	1,0 mM 1,0 mM	2,0	-	-
52	GSH GSSG EDTA	5,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	1,4	+	+
53	GSH GSSG EDTA	10,0 mM 1,0 mM 1,0 mM	2,0	-	+

Nr. 41

Nr. 48

Nr. 49

Nr. 52

**Abb. 3-5 Zusammenfassung der getesteten Renaturierungslösungen und Darstellung der positiven Rückfaltungsergebnisse**

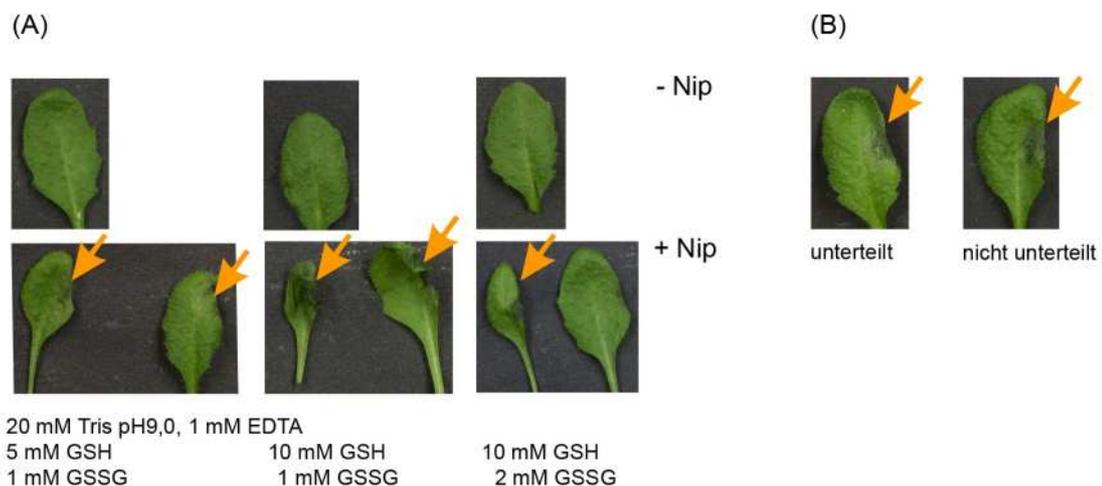
In der Übersicht sind die Pufferzusammensetzungen sowie die Ergebnisse der Faltung dargestellt. - bedeutet keine Trübung/Nekrosebildung, (+) schwache Trübung/Nekrosebildung, + starke Trübung/Nekrosebildung. Lösungen mit positiven Renaturierungseigenschaften sind orange markiert. Die nebenstehenden Fotos zeigen die Nekrosebildung mit aktiv gefaltetem PsojNip (+ Nip) sowie Kontrollinfiltration mit Puffer ohne Protein (-). Die verwendeten Proteinkonzentrationen entsprechen den in der Übersicht unter „Proteinkonzentration  $\mu\text{M}$ “ aufgeführten Werten. Die Ergebnisse wurden 24 h nach Infiltration dokumentiert.

Vergleicht man die Stärke der Nekrosebildung und die zur Infiltration verwendeten Proteinkonzentrationen der verschiedenen Puffersysteme, wird deutlich, dass basische Tris-Puffer mit GSH/GSSG als Redoxsystem das stärkste Faltungspotential zeigten. Es wurden damit die stärksten Nekrosen bei gleichzeitig geringer Proteinkonzentration erzielt (Abb. 3-5). Nach weiteren Untersuchungen ergab sich der Puffer 20 mM Tris pH 9,0; 10 mM GSH; 1 mM GSSG; 1 mM EDTA als optimal für eine effiziente Zelltodinduktion. Zur Entfernung gelösten Sauerstoffs wurde der Puffer 1 min mit Stickstoff begast (Abb. 3-6 A).

Da hohe lokale Proteinkonzentrationen Aggregationen begünstigen und damit die Faltungseffizienz verringern, wurde der Effekt auf die Rückfaltung von PsojNip untersucht. Dafür wurde zum einen das Protein in einem Schritt (Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zum anderen in zwei Portionen (je 2 x 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) langsam zur Faltungslösung getropft. Ein

Unterschied zwischen Protein, das in zwei Schritten renaturiert wurde und Protein, das nicht unterteilt wurde, war nicht zu beobachten (Abb. 3-6 B). Bei Proteinkonzentrationen deutlich über 100 µg/ml Protein traten teilweise jedoch starke Präzipitate und somit verringerte nekrosebildende Aktivität auf (Daten nicht gezeigt), wodurch eine negative Beeinflussung der Faltungseffizienz durch höhere Konzentrationen nicht auszuschließen ist. Deshalb wurde generell mit niedrigen Proteinkonzentrationen (max. 50 µg/ml) gearbeitet und das Protein langsam verdünnt (1 Tropfen/10 sek).

Für die durchzuführenden Experimente *in planta* wurden die Pufferkomponenten durch Dialyse gegen Wasser (1:1000) über Nacht entfernt. Die Aufkonzentrierung des Proteins erfolgte in dem zuvor verwendeten Dialyseschlauch mittels PEG20000. Ein Nebeneffekt bei der Nekrosebildung aufgrund PEG-Kontamination konnte ausgeschlossen werden.



**Abb. 3-6 Optimierung der Rückfaltungsbedingungen**

(A) PsojNip wurde in 20 mM Tris pH 9,0, mit 1 mM EDTA und verschiedenen GSH-, GSSG-Konzentrationen rückgefaltet. Die Faltungslösungen wurden zuvor 1 min mit N<sub>2</sub> begast. 1,5 µM renaturiertes Protein wurde infiltriert und nach 24 h das Ergebnis dokumentiert. Als Kontrolle wurden die Lösungen ohne Protein verwendet.

(B) Um den Einfluss einer höheren lokalen Proteinkonzentration während des Rückfaltens auf die Aktivität zu untersuchen, wurde die zu faltende Proteinmenge (100 µg/ml Endkonzentration) unterteilt. Der zweite Puls wurde erst 4 h nach dem ersten eingetrofft. Als Kontrolle wurde die Proteinmenge auf einmal eingetrofft. 2,4 µM beider Proteinfaltungen wurden infiltriert und das Resultat 24 h nach Behandlung fotografiert.

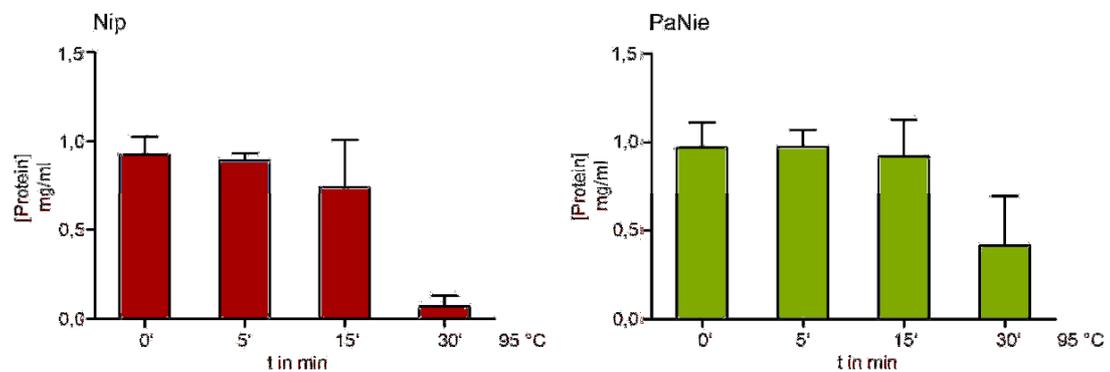
Um PsojNip und PaNie unter vergleichbaren Bedingungen zu präparieren, wurden die für PsojNip bestimmten Rückfaltungsbedingungen für PaNie übernommen. Die Rückfaltung von PaNie durch Verdünnen in GSH-haltigem Tris-Puffer führte zu ähnlich aktivem PaNie wie durch die in der Literatur beschriebene Dialyse gegen Wasser (Veit et al., 2001). Es wurde beobachtet, dass PsojNip bei der Entfernung von GSH wesentlich stärker zu Aggregationen neigte als PaNie.

### 3.1.4 Die Stabilität von PsojNip und PaNie

PsojNip und PaNie sind zwar homologe Proteine, weisen aber schon beim Faltungsverhalten starke Unterschiede auf. Im folgenden Kapitel wurde die Stabilität beider Proteine verglichen.

#### 3.1.4.1 Die Hitzestabilität der Proteine

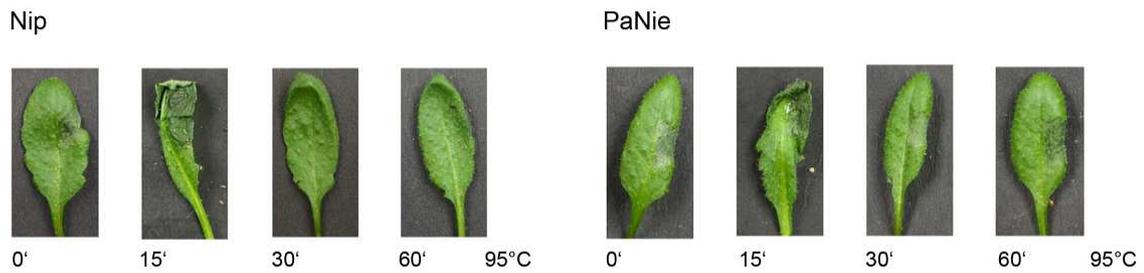
Die erste Charakterisierung umfasste die Hitzebeständigkeit. Dazu wurde zunächst die Proteinkonzentration des löslichen Überstandes nach 95 °C-Behandlung überprüft. Es wurde deutlich, dass sowohl PsojNip als auch PaNie relativ hitzestabil sind. Erst nach 30 min Hitzebehandlung war die Konzentration löslichen Proteins deutlich reduziert. PaNie scheint allerdings etwas beständiger als PsojNip zu sein (Abb. 3-7).



**Abb. 3-7 Die Proteinkonzentration in Abhängigkeit von der Hitzebehandlung**

Mittels PEG aufkonzentriertes Protein wurde einer Hitzebehandlung unterzogen, die Aggregate 15 min bei 15.000 xg sedimentiert und die verbleibende Proteinkonzentration im Überstand mittels Bradford-Analyse bestimmt.

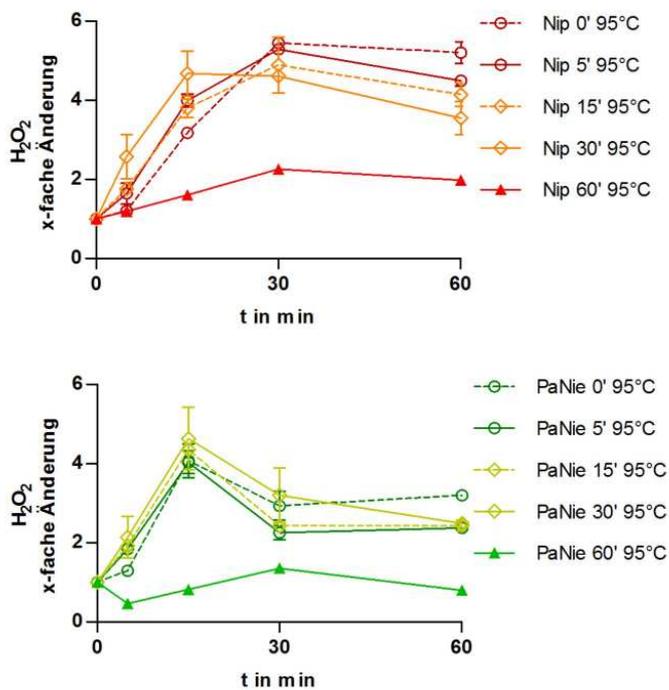
Dies konnte auch in Infiltrationsexperimenten bestätigt werden. Die 15 min hitzebehandelten Proteine waren noch in der Lage, starke Nekrosen auszurufen. PsojNip verlor diese Aktivität nach 30 min Hitzebehandlung. PaNie dagegen zeigte selbst nach einer einstündigen Inkubation bei 95°C noch restliche Zelltodaktivität (Abb. 3-8).



**Abb. 3-8 Die nekrosebildende Aktivität in Abhängigkeit von der Hitzeinwirkung**

Die Nekrosebildung nach Hitzebehandlung von PsojNip und PaNie wurde durch Infiltration in Arabidopsis-Blätter untersucht. 2  $\mu$ M Protein wurden erhitzt, ausgefallene Proteine resuspendiert und die Suspension in Blätter infiltriert. Die Blätter wurden 24 h nach Infiltration fotografiert. Der abgebildete 15 min-Wert ist einem andern, unabhängig durchgeführten Experiment mit gleicher Tendenz entnommen. Deshalb weicht die Zelltodstärke von den anderen Zeitpunkten ab.

In Abb. 3-9 ist der durch PsojNip und PaNie ausgelöste *oxidative burst* in Abhängigkeit von der Hitzeinwirkung dargestellt. Bei beiden Proteinen war eine 60-minütige Hitzebehandlung notwendig, um die Fähigkeit zur Auslösung eines *oxidative burst* zu vermindern.

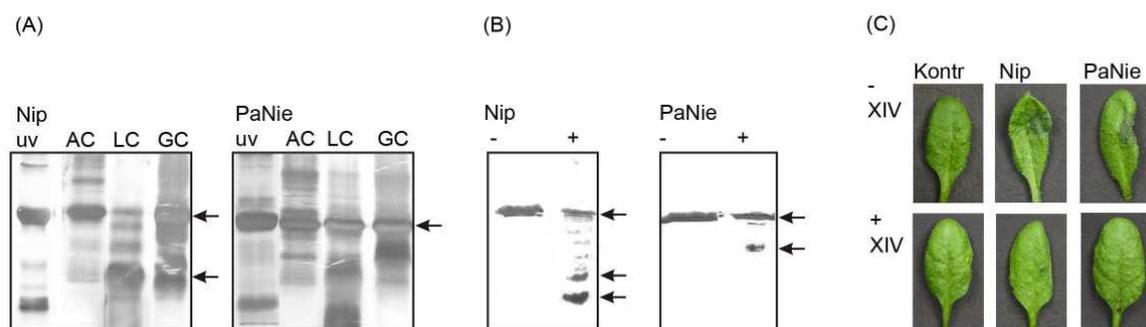


**Abb. 3-9 Die extrazelluläre  $H_2O_2$ -Konzentration in Abhängigkeit von der Hitzeinwirkung**

Für die Bestimmung der  $H_2O_2$ -Bildung wurden Arabidopsis-Zellkulturen mit thermisch behandeltem PsojNip und PaNie elizitiert. Dafür wurden mit PEG aufkonzentrierte Proteine gekocht, ausgefallene Proteine resuspendiert und die Zellkultur mit einer Endkonzentration von je 2  $\mu$ M Protein elizitiert. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten. Eine dritte Messung zeigte die gleiche Tendenz, jedoch bei einer generell sehr niedrigen Zellkulturresponsivität. Sie wurde deswegen nicht in die Berechnung mit einbezogen.

### 3.1.4.2 Die Proteasestabilität der Proteine

Zur Bestätigung, dass die beobachtete Aktivität tatsächlich von Proteinen stammt, wurden PsojNip und PaNie-Präparationen mit Proteasen behandelt. Bei der Proteolyse von PsojNip und PaNie mit ArgC, LysC, GluC (Abb. 3-10 A) sowie Trypsin (Abb. 3-10 B) zeigte sich eine relativ hohe Proteasestabilität. PsojNip konnte durch ArgC nicht und durch GluC nur teilweise gespalten werden. LysC und Trypsin zeigten die höchste Effizienz in der Spaltung, allerdings war auch in diesen Reaktionen noch vollständiges PsojNip vorhanden (Abb. 3-10 A und B). Es ist also nicht verwunderlich, dass mit Trypsin verdautes PsojNip noch Nekrosen induzierte (Daten nicht gezeigt). PaNie ließ sich trotz gleicher Bedingungen schlechter als PsojNip spalten. Wie in Abb. 3-10 A und B zu sehen ist, war nach einer proteolytischen Spaltung mit ArgC, LysC, GluC oder Trypsin noch ein hoher Anteil von intaktem PaNie detektierbar. Erst durch den Einsatz eines Proteasegemisches von Sigma (Protease Type XIV) konnten beide Proteine vollständig degradiert werden. Eine Detektion der entstandenen Fragmente mit Silberfärbung war aufgrund der geringen Fragmentgröße der verbleibenden Peptide nicht mehr möglich. Eine Infiltration von vollständig verdaulichem PsojNip oder PaNie in Blattgewebe induzierte keine Nekrosebildung (Abb. 3-10 C).



**Abb. 3-10 Die proteolytische Spaltung von PsojNip und PaNie**

Die Pfeile kennzeichnen unverdautes Protein sowie die nach proteolytischer Spaltung verbleibenden Hauptfragmente.

A) 100 µg Protein wurden mit 2 µg ArgC (AC), LysC (LC) oder GluC (GC) über Nacht verdaut. 2 µg gespaltenen und ungespaltenen Proteins wurden mittels SDS-PAGE analysiert und mit Silberfärbung detektiert. Als Kontrolle wurde unverdautes (uv) Protein aufgetragen.

(B) 10 µg Protein wurden mit Trypsin nach Herstellerangaben über Nacht verdaut und das Resultat mit SDS-PAGE analysiert (1 µg Protein aufgetragen). Detektiert wurde mit einer Silberfärbung.

(C) Die nekrosebildende Aktivität von PsojNip und PaNie ist nach Proteolyse mit „Protease Type XIV“ fast vollständig unterbunden. Je 2 µM Protein wurden verdaut und nach Abstoppen der Reaktion in Arabidopsis-Blätter infiltriert (+ XIV). Als Positivkontrolle diente nicht gespaltenes Protein (- XIV). „Kontr.“ bezeichnet die Reaktion der Blätter auf das Proteasegemisch. Das Ergebnis wurde 24 h nach Infiltration dokumentiert.

### 3.1.5 Der Einfluss der Cysteine auf die *in vitro*-Faltung und die Aktivität von PsojNip

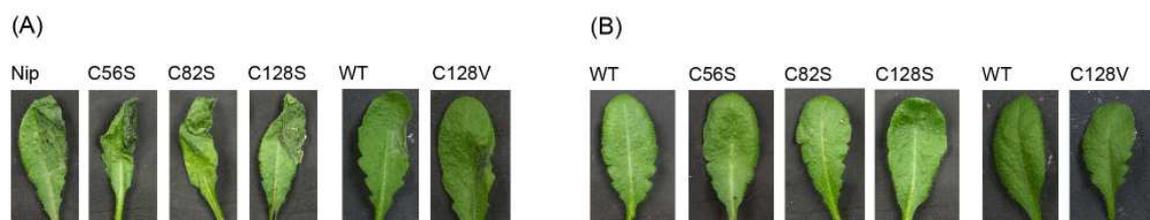
Ein wesentlicher Unterschied zwischen PsojNip und PaNie ist die Anzahl der Cysteine. Während PaNie zwei Cysteine besitzt (Gijzen and Nurnberger, 2006), enthält PsojNip drei (Qutob et al., 2002). Für NPP1 ist eine hohe Relevanz der Cysteine für die nekrosebildende Aktivität bekannt (Romanski, 2001). So stellten sich folgende Fragen:

- I) Sind die Cysteine notwendig für die Aktivität von PsojNip?
- II) Bedingt die ungerade Anzahl der Cysteine die schlechte Faltbarkeit von PsojNip in Wasser?

Zur Klärung der Fragestellungen wurden die Cysteine über ortsgerichtete Mutagenese durch Serin ersetzt (C56S, C82S, C128S). Das dritte, nicht konservierte Cystein, an dessen Stellen sich bei PaNie ein Valin befindetet, wurde zusätzlich gegen Valin ausgetauscht (C128V). Für die Überprüfung des Einflusses der Cysteine auf die Aktivität wurden die PsojNip-Derivate durch Verdünnen im optimalen Faltungspuffer renaturiert.

Wie in Abb. 3-11 A zu sehen ist, wiesen alle PsojNip-Varianten nach Renaturierung deutlichen Zelltod auf. Somit scheinen die Cysteine keinen Einfluss auf die Aktivität zu haben.

Sollte das dritte Cystein die Ursache für die schlechte Faltbarkeit von PsojNip in Wasser sein, müsste PsojNip mit den Aminosäureaustauschen durch Dialyse gegen Wasser renaturiert werden können. In Abb. 3-11 B ist die Aktivität von PsojNip und den Derivaten nach Dialyse gegen Wasser dargestellt. Keines der Proteine war in der Lage, Zelltod zu induzieren. Offenbar bedingt die ungerade Anzahl der Cysteine nicht die schlechtere Faltbarkeit von PsojNip durch Dialyse gegen Wasser verantwortlich ist.



**Abb. 3-11 Der Einfluss der Cysteine auf die Faltbarkeit und die Aktivität von PsojNip**

Es wurde die Abhängigkeit der *in vitro*-Faltung von PsojNip von der Cysteinanzahl sowie der Einfluss der Cysteine auf die Aktivität getestet.

(A) PsojNip und die Derivate wurden durch Verdünnen in GSH-haltigem Faltungspuffer renaturiert. Die Aktivität wurde über Nekrosebildung 24 h nach Infiltration von je 2 $\mu$ M Protein bestimmt.

(B) PsojNip und die Derivate wurden durch Dialyse gegen Wasser renaturiert. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte über Nekrosebildung 24 h nach Infiltration von je 2  $\mu$ M Protein.

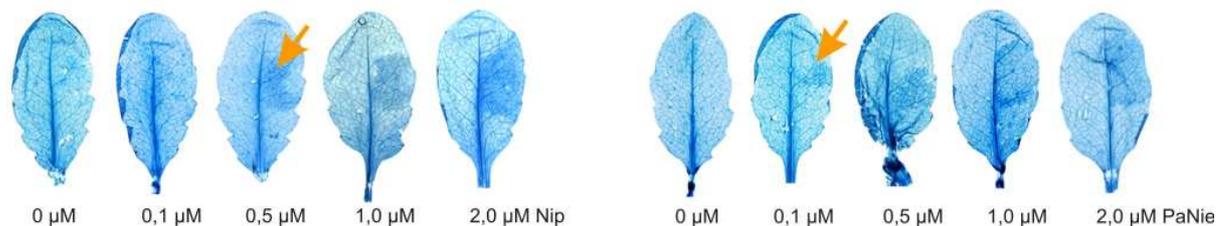
### 3.2 Die Reaktionen von *Arabidopsis thaliana* auf Elizitierung mit PsojNip und PaNie im Vergleich zu flg22

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Charakterisierung der durch PsojNip und PaNie induzierten Abwehrreaktionen dargelegt. Des Weiteren sollte in dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, inwieweit sich die induzierten Abwehrmechanismen nach Elizitierung mit PsojNip und PaNie von denen des klassischen PAMP flg22 unterscheiden. Für die Untersuchungen wurden je 2  $\mu\text{M}$  flg22, PsojNip oder PaNie eingesetzt.

#### 3.2.1 Der durch PsojNip und PaNie ausgelöste Zelltod

Im Gegensatz zu flg22 ist für die NLP-Familie Zelltod ein Hauptcharakteristikum (Qutob et al., 2006). Im Folgenden wurde dieser induzierte Zelltod näher charakterisiert.

Zur Analyse der Konzentrationsabhängigkeit des Zelltodes wurden Blätter mit verschiedenen Proteinkonzentrationen infiltriert und nach 2 h mit Trypanblau gefärbt (Abb. 3-12). 0,1  $\mu\text{M}$  PaNie und 0,5  $\mu\text{M}$  PsojNip waren für eine Zelltodinduktion ausreichend. Das entspricht einer Proteinkonzentration von ca. 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für PaNie bzw. 13  $\mu\text{g}/\text{ml}$  für PsojNip. Höhere Proteinkonzentrationen riefen stärkeren Zelltod hervor. Um eventuelle Schwankungen bei der *in vitro*-Faltung auszugleichen, wurde bei den nachfolgenden Experimenten mit deutlichem Überschuss, d.h. mit 2  $\mu\text{M}$  (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) Protein, gearbeitet.

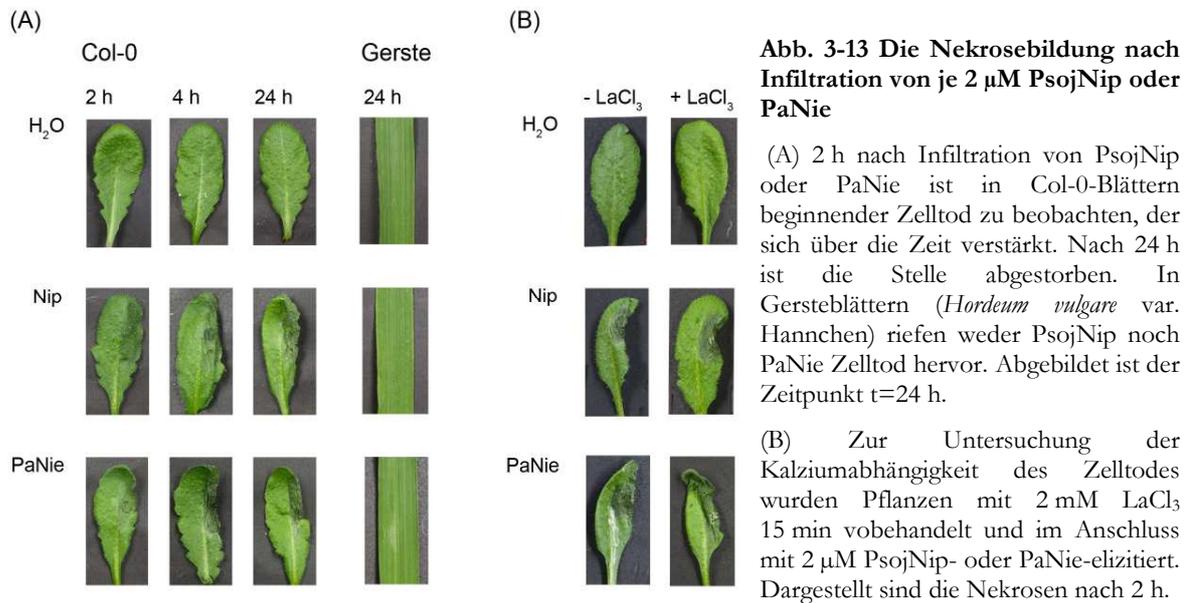


**Abb. 3-12 Die konzentrationsabhängige Zelltodausprägung durch PsojNip- oder PaNie**

Col-0-Pflanzen wurden mit den angegebenen PsojNip- oder PaNie-Konzentrationen infiltriert. Zu sehen ist der Zelltod 2 h nach Infiltration, angefärbt mit Trypanblau.

Eine Infiltration von Col-0 mit 2  $\mu\text{M}$  PsojNip oder PaNie führte nach spätestens 2 h zu einem Kollabieren der infiltrierten Zellen und nach ungefähr 4 h zu deutlichem Zelltod. Nach 24 h war die Stelle eingetrocknet. Ein Chlorophyllabbau wurde dabei nicht beobachtet (Abb. 3-13 A) Dieser Zeitverlauf diente als Aktivitätskontrolle der *in vitro*-gefalteten Proteine für alle nachfolgenden Experimente. Proteinpräparationen, die nach 2 h keinen beginnenden Zelltod induzierten, wurden verworfen. Die Zelltodaktivität von PsojNip wurde jedoch nicht in Gerste (*Hordeum vulgare* var. Hannchen) beobachtet. Die Verfärbung des Gerstenblattes nach

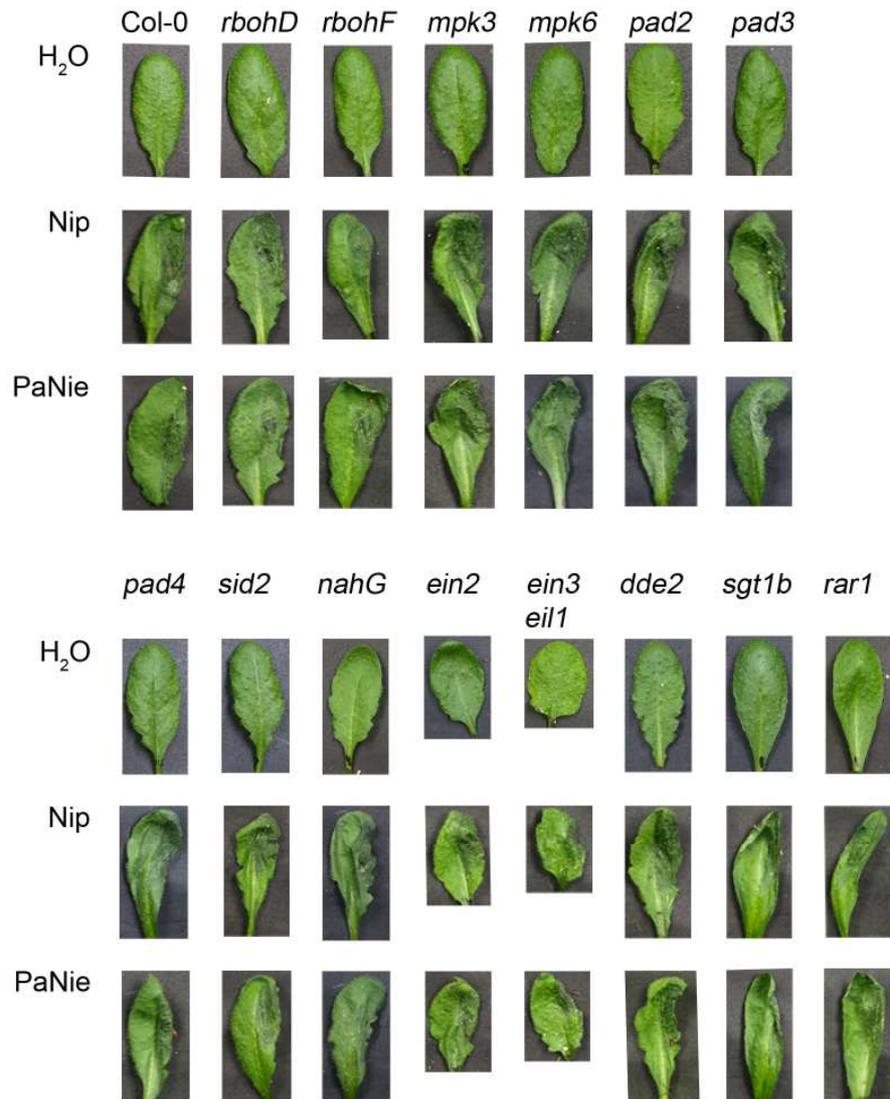
PaNie-Infiltration ist auf Verwundung zurückzuführen (Abb. 3-13 A). Auch für andere NLP-Mitglieder wie NPP1 und PaNie ist eine Zelltodaktivität ausschließlich in Dikotyledonen beschrieben (Veit et al., 2001; Fellbrich et al., 2002).



Programmierter Zelltod ist von aktivem Metabolismus der Pflanzenzelle, u.a. von reaktiven Sauerstoffspezies, Salicylsäure sowie Kalzium abhängig (Levine et al., 1994; Levine et al., 1996). Im Folgenden wurde der Einfluss verschiedener pflanzlicher Reaktionen auf den durch PsojNip und PaNie induzierten Zelltod analysiert.

Als erstes kam dafür der Kalziumkanalblocker LaCl<sub>3</sub> zum Einsatz. Die Vorbehandlung der Blätter mit 2 mM LaCl<sub>3</sub> konnte die Ausprägung von Läsionen durch PsojNip oder PaNie nicht inhibieren (Abb. 3-13 B). Auch höhere Konzentrationen (5 mM, 10 mM) reduzierten den Zelltod nicht. Allerdings riefen Kontrollbehandlungen mit 5 mM oder 10 mM LaCl<sub>3</sub> ohne Protein leichten Zelltod hervor (Daten nicht gezeigt).

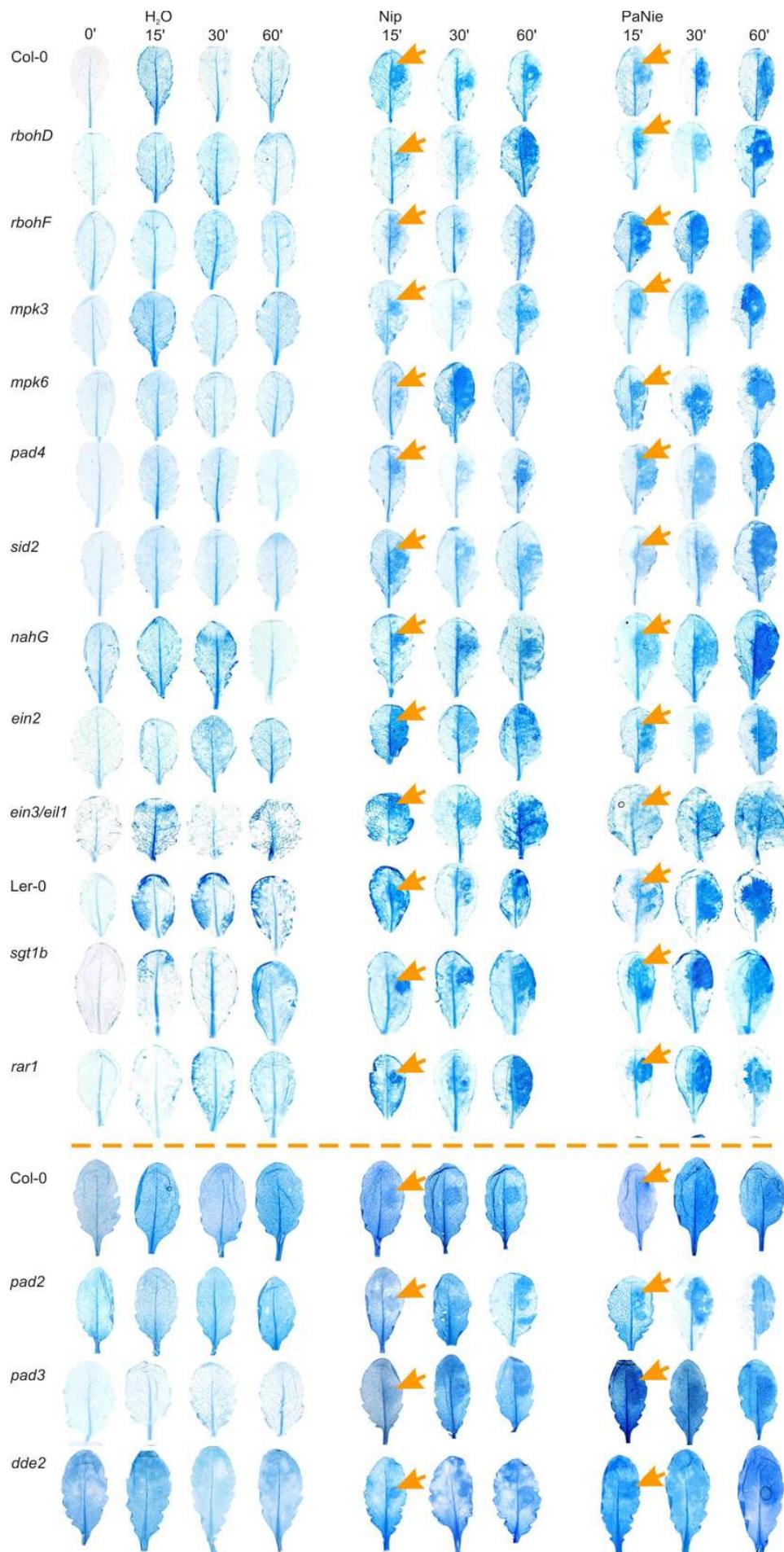
Für die vorliegende Arbeit standen Mutanten verschiedener Signalwege zur Verfügung. Eine Behandlung der Genotypen mit PsojNip oder PaNie führte in jeder Mutante zur Ausprägung von Zelltod (Abb. 3-14). Ein Unterschied zum Wildtyp Col-0 war dabei nicht zu beobachten.



**Abb. 3-14 Die Zelltodinduktion in den verschiedenen Genotypen 4 h nach PsojNip- oder PaNie-Behandlung**

Die Genotypen wurden mit 2  $\mu$ M PsojNip oder PaNie eliziert und nach 4 h fotografiert. Kontrollen durch Wasserinfiltration verursachten keinen Zelltod.

Zur genaueren Untersuchung des Zelltodes wurden frühe Zeitpunkte mit Trypanblau gefärbt. Generell muss angemerkt werden, dass sowohl bei der Reaktion einzelner Blätter auf PsojNip und PaNie als auch bei der Färbung Schwankungen auftraten. Die Interpretation der Färbung lässt demzufolge lediglich eine Ja-Nein-Antwort, aber keine Quantifizierung zu. Es konnte jedoch in allen Genotypen sowohl nach PsojNip- als auch PaNie-Behandlung eine Zelltodfärbung ab 15 min beobachtet werden (Abb. 3-15).



**Abb. 3-15 Zeitverlauf des Zelltodes ausgelöst durch PsojNip und PaNie in verschiedenen Genotypen (s. vorherige Seite)**

Die Blätter wurden mit Wasser, 2  $\mu\text{M}$  PsojNip oder PaNie infiltriert, zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit Trypanblau gefärbt. Die Bezeichnung 0' kennzeichnet eine unbehandelte Kontrolle. Es wurde immer ein Teil der rechten Blattseite behandelt. Mit einem gelben Strich abgetrennt sind die Mutanten *pad2*, *pad3* und *dde2* sowie der korrespondierende Wildtyp. Sie wurden unabhängig von den anderen Genotypen analysiert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der Zelltod eine sehr schnelle Antwort ist, der durch die getesteten Signalwege nicht reguliert wird. Die Genotypen *pad2*, *pad3* und *dde2* wurden unabhängig von den andern Mutanten analysiert und sind deswegen gesondert dargestellt. Man sieht hier sowohl beim Wildtyp als auch bei den Mutanten eine schwächere Trypanblau-Färbung, was vermutlich auf eine geringere Aktivität der Proteine zurückzuführen ist. Bei *pad2* und *pad3* war das Ergebnis nicht eindeutig, da ein anderes Experiment eine Verzögerung des Zelltodes in den beiden Mutanten zeigte.

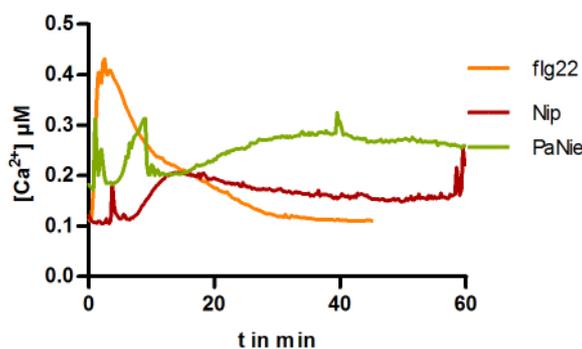
### 3.2.2 Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration

Kalzium spielt als *second messenger* eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Pathogenen. Es ist notwendig für die Induktion verschiedener Signalwege sowie die Ausprägung einer HR (Kurosaki, 1987; Lebrun-Garcia et al., 1998; Grant et al., 2000).

Die Messung von cytosolischem Kalzium nach Elizitierung mit PsojNip, PaNie und flg22 wurde mit äquorinexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen durchgeführt. Für flg22 konnte durch Ranf et al. eine Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration nachgewiesen werden (Ranf et al., 2008). Auch NPP1 induzierte einen Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in Petersiliezellkulturen (Fellbrich et al., 2002).

Wie Abb. 3-16 zeigt, erfolgte durch flg22 ein schneller und verhältnismäßig steiler Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration. Nach ungefähr 3 min war die maximale Zunahme um ca. 0,3  $\mu\text{M}$  zu detektieren, die Ausgangskonzentration war nach ca. 30 min wieder erreicht.

Die Kalziumsignatur nach PsojNip- oder PaNie-Elizitierung wich davon stark ab. Der



**Abb. 3-16 Der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration**

Die Konzentration des zytosolischen Kalziums wurde mit Blattstreifen pMAQ2-exprimierender *Arabidopsis*-Pflanzen bestimmt. Elizitiert wurde mit 1  $\mu\text{M}$  PsojNip, PaNie und flg22. Das Ergebnis ist repräsentativ für zwei unabhängige Messungen.

Kalziumspiegel erhöhte sich langsam, erreichte den Maximalwert nach ca. 17 min (PsojNip) bzw. 22 min (PaNie) und blieb dann auf konstant hohem Niveau. Auch nach 60 min war die Kalziumkonzentration nicht wesentlich abgesunken. Die Kalziumkonzentration steigerte sich sowohl nach PsojNip- als auch PaNie-Behandlung um ca. 0,1  $\mu\text{M}$ .

### 3.2.3 Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) als eine zeitige Antwort auf Pathogenbefall wurde 1983 von Doke beschrieben (Doke, 1983). Auch flg22 und NPP1 lösen in *A. thaliana* oder Petersilie einen *oxidative burst* aus (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez et al., 1999; Fellbrich et al., 2002).

Zunächst wurde die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Akkumulation im Medium von *A. thaliana*-Suspensionskultur nach Elizitierung mit flg22, PsojNip und PaNie bestimmt. Wie in der Literatur beschrieben, unterliegen luminolbasierte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messungen in Zellkulturmedien starken Schwankungen (Meyer et al., 2001). Dies wurde auch bei den hier durchgeführten Messungen beobachtet, weshalb keine absoluten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, sondern „x-fache Änderung“ angegeben wird. Die Konzentrationen gebildeten  $\text{H}_2\text{O}_2$  entsprachen aber ungefähr den gängigen Literaturangaben. Wie in Abb. 3-17 A zu sehen ist, lösten sowohl flg22, PsojNip als auch PaNie einen signifikanten Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration aus. Ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden NLPs und flg22 war nicht zu beobachten. Schon nach 5 min erhöhte sich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel und erreichte bei ca. 15 min sein Maximum. Die maximale Änderung betrug für PsojNip und PaNie ca. 3,5. Durch flg22 wurde eine ca. 3-fache Zunahme der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration erreicht. In einem Blattstreifen-Experiment wurde der Effekt von Inhibitoren auf den durch PsojNip hervorgerufenen *oxidative burst* bestimmt. Durch Zugabe des NADPH-Oxidase Inhibitors DPI ließ sich die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion partiell hemmen, was auf eine anteilige Bildung der ROS über NADPH-Oxidasen hinweist. Eine Blockierung des Kalziumeinstroms durch  $\text{LaCl}_3$  reduzierte den Anstieg des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Levels drastisch (Abb. 3-17 B).

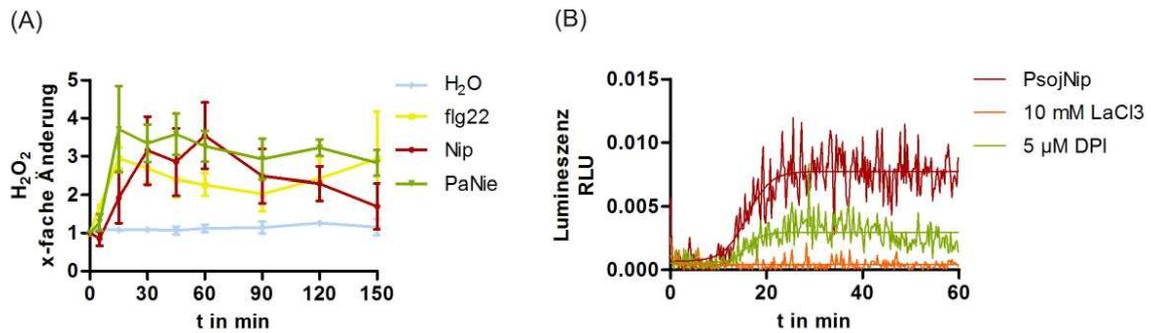


Abb. 3-17 Die Induktion des *oxidative burst*

(A) Es wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Bildung in Arabidopsis-Zellkultur nach Elizitierung mit je 2 μM flg22, PsojNip und PaNie untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit je zwei technischen Replikaten.

(B) Mit einem luminolbasierten Blattstreifenexperiment wurde die Inhibierung des oxidative burst mit 5 μM DPI und 10 mM LaCl<sub>3</sub> nach Elizitierung mit 2 μM PsojNip bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten.

Ist die ROS-Produktion in Mutanten der Abwehrsignale beeinflusst? Zur Beantwortung dieser Frage wurde die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung nach flg22- und PsojNip-Behandlung in allen Mutanten mit einem luminolbasierten Blattstreifenassay gemessen. Aufgrund technischer Probleme mit dem Gerät konnten Messungen für PaNie nicht durchgeführt werden. Auch bei Messungen mit *dde2*, *ein2* und *ein3eil1* sowie Ler-0 traten technische Probleme auf, die im Laufe dieser Arbeit nicht behoben werden konnten. Anzumerken ist weiterhin, dass die verwendete Methode nicht quantitativ ist. Für einen besseren Vergleich zum Wildtyp wurde in jedem Einzeldiagramm Col-0 mit abgebildet.

Der Kurvenverlauf der in Col-0 gemessenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach flg22-Elizitierung unterschied sich wesentlich von dem nach PsojNip-Behandlung. So induzierte flg22 einen schnellen Anstieg (ca. 5 min) mit einem Maximum nach ca. 10 min. Nach ca. 40 min war die Lumineszenz wieder beim Ausgangswert. Der Anstieg nach PsojNip-Behandlung erfolgte wesentlich langsamer, die Kurve ging in ein lang anhaltendes Plateau über und sank nur langsam ab. Der erreichte Maximalwert lag deutlich unter dem von flg22 (Abb. 3-18).

Eine sehr stark reduzierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung sowohl nach flg22- als auch PsojNip-Behandlung wurde in den *rbob*-Mutanten sowie *pad2* detektiert, wobei lediglich in *rbobD* die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung vollständig blockiert war. In den MAP-Kinase-Mutanten *mpk3* und *mpk6* sowie den Genotypen *pad4*, *sid2* und *nabG* wurde eine verminderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration gemessen. Allerdings war dies nicht so deutlich wie in *rbobD*, *rbobF* und *pad2*. In der Camalexinbiosynthesemutante *pad3* wurden nach PsojNip-Elizitierung deutlich höhere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen als in Col-0 bestimmt. Dieser Effekt wurde mit flg22 nicht beobachtet (Abb. 3-18).

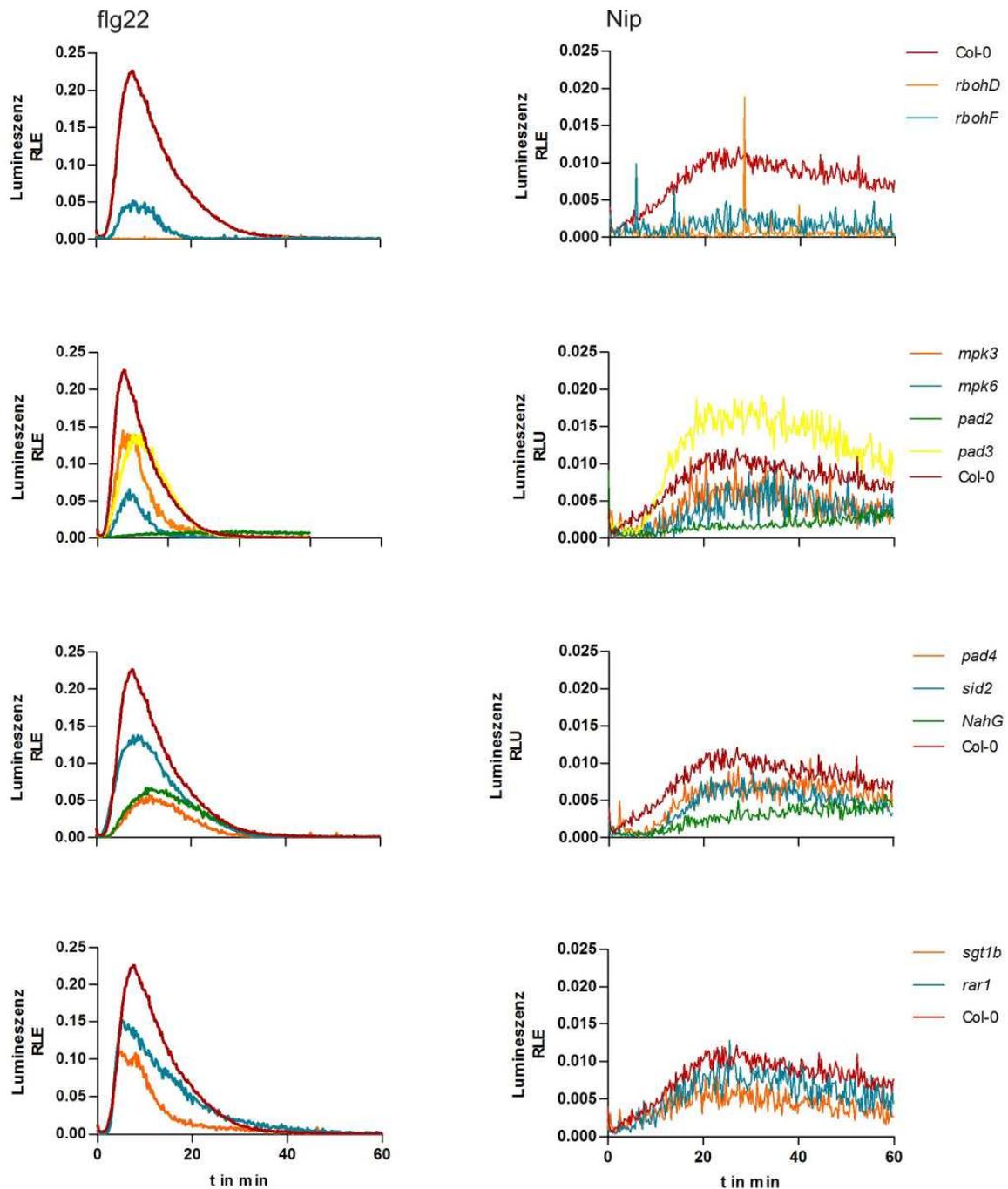


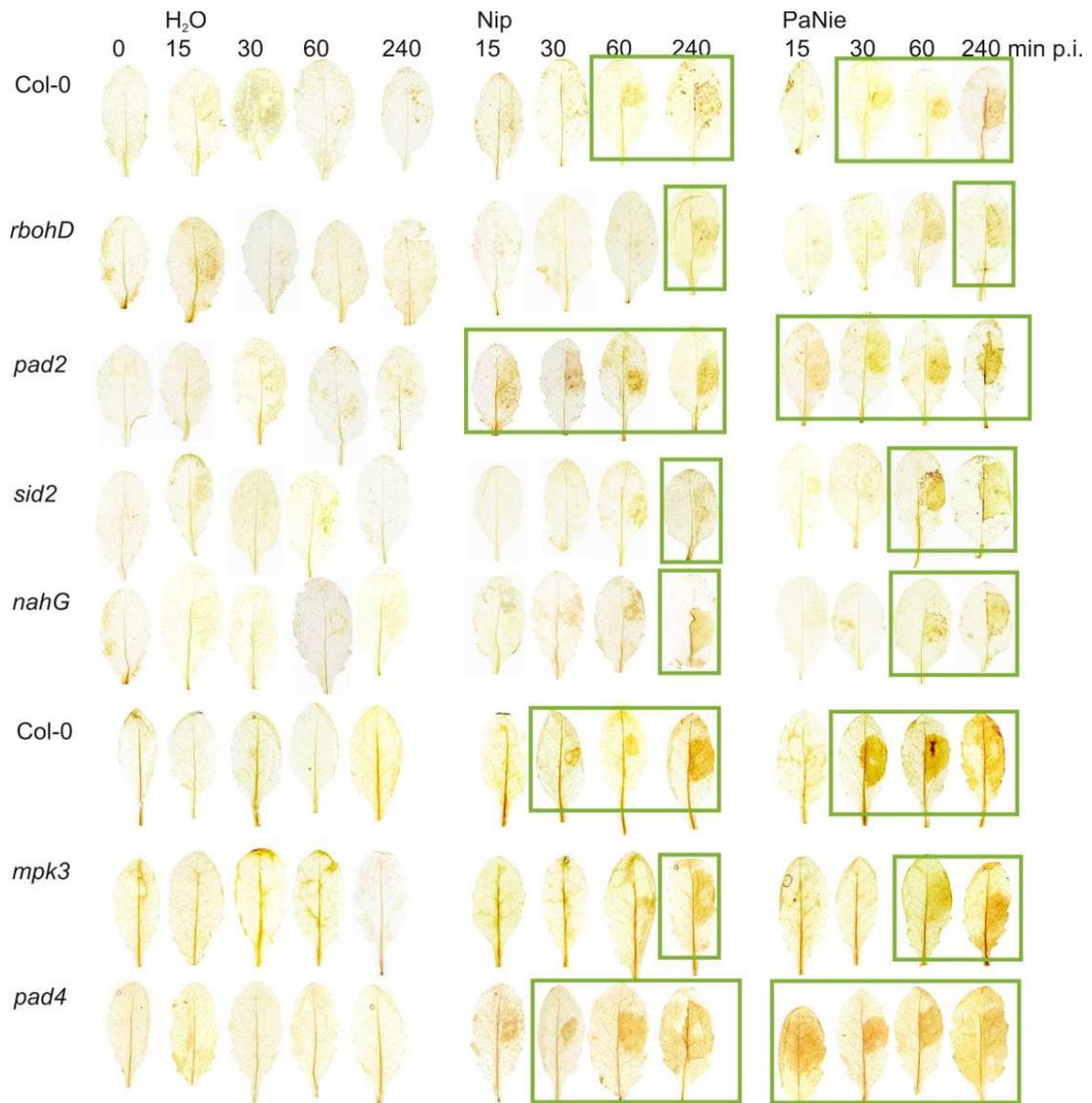
Abb. 3-18 Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion der verschiedenen Genotypen nach Elizitierung mit flg22 und PsojNip

Die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bildung wurde mit einem luminolbasierten Blattstreifenassay nach Elizitierung mit je 2 µM flg22 oder PsojNip gemessen. Die gezeigten Daten sind das Mittel von drei unabhängigen Messungen.

Zur Überprüfung der im Blattassay detektierten Reduktionen der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration einzelner Mutanten wurden DAB-Färbungen durchgeführt. Dafür wurden die Pflanzen mit 2 µM flg22, PsojNip und PaNie elizitiert. Bei einer Infiltration von 2 µM flg22 waren die

DAB-Färbungen sehr schwach, weshalb keine weitere Aussage über die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion nach *flg22* getroffen werden konnten. Diese Daten sind nicht dargestellt.

Wie schon beim Zelltod ruft PaNie eine stärkere Respons als PsojNip hervor. Die grundsätzlichen Aussagen sind jedoch gleich. Man kann demnach davon ausgehen, dass die Ergebnisse der luminolbasierten Blattstreifenmessung von PsojNip auf PaNie übertragbar sind. Mit dieser Methode konnte die Reduktion der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration für *rbobD*, *sid2* *nabG* und *mpk3* bestätigt werden, jedoch nicht für *pad2* und *pad4* (Abb. 3-19).



**Abb. 3-19** DAB-Färbungen ausgewählter Genotypen nach Elizitierung mit je 2  $\mu$ M PsojNip und PaNie

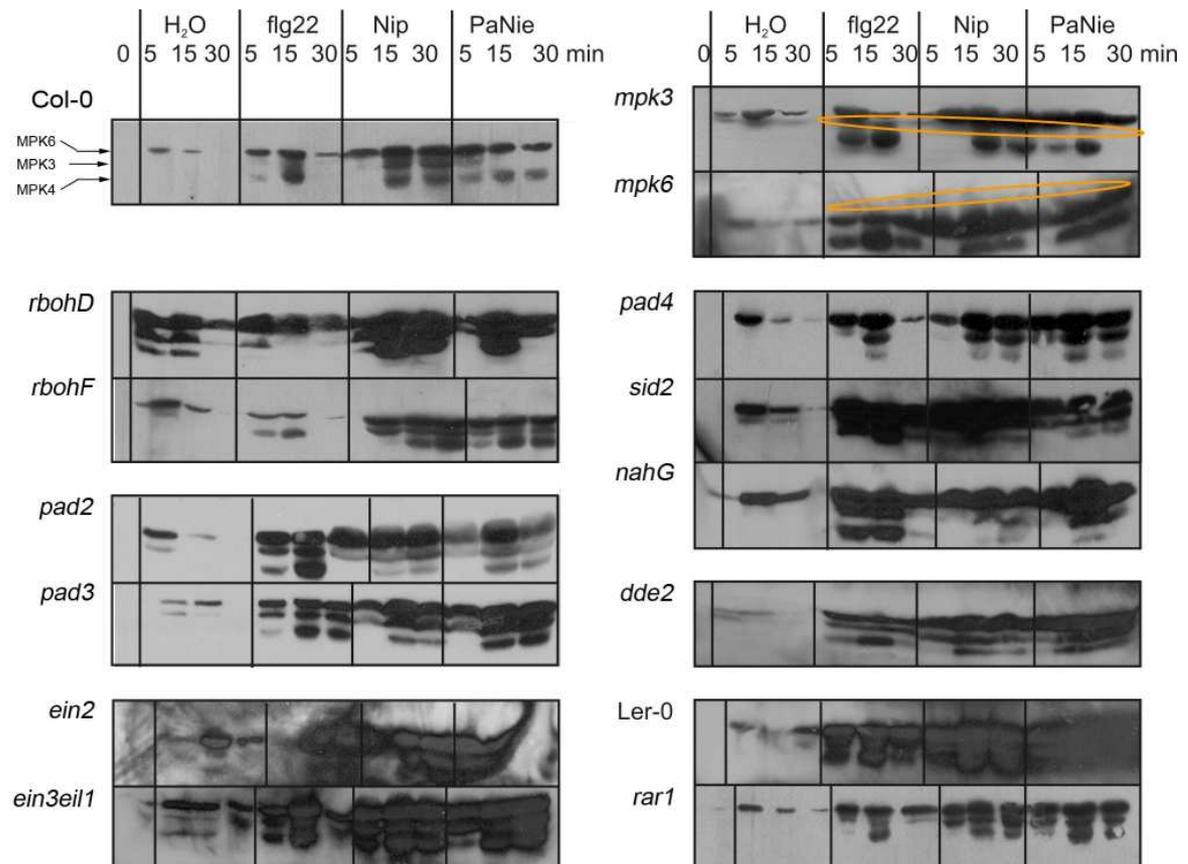
Dargestellt ist die DAB-Färbung ausgewählter Genotypen zur Bestätigung der luminolbasierten Messergebnisse. Der erste Zeitpunkt, bei dem eine deutliche Färbung zu sehen war, ist grün markiert. *mpk3* und *pad4* sind gesondert gefärbt worden und mit dem korrespondierenden Wildtyp dargestellt.

### 3.2.4 Die Aktivierung von MAP-Kinasen

Änderungen in posttranslationalen Modifikationen von Proteinen, vor allem der Phosphorylierungsmuster, ermöglichen eine zügige Anpassung an veränderte Umweltbedingungen. Flg22 aktiviert in Col-0 die MAPK MPK3, MPK6 und MPK4 (Nühse et al., 2000; Asai et al., 2002; Droillard et al., 2004; Teige et al., 2004), die auch nach Elizitierung mit NPP1 phosphoryliert werden (Qutob et al., 2006).

Zur Untersuchung der MAP-Kinase-Aktivität in den verschiedenen Genotypen wurden Immunoblots mit einem gegen das phosphorylierte TEY-Motiv gerichteten Antikörper ( $\alpha$ -TEY) durchgeführt. Die Pflanzen wurden zuvor mit 2  $\mu$ M flg22, PsojNip oder PaNie behandelt. Die Signalintensitäten nach flg22-Behandlung waren teilweise schwach, was auf die geringe Konzentration von 2  $\mu$ M zurückgeführt werden könnte. Aufgrund der Anzahl der zu analysierenden Genotypen war es nicht möglich, alle Immunoblots zeitgleich durchzuführen. Eine Quantifizierung ist deshalb nicht möglich.

Die Elizitierung von *Arabidopsis*-Pflanzen Col-0 mit PsojNip und PaNie führte zu einem ähnlichen Bandenmuster wie nach flg22-Behandlung, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die aktivierten MAPK MPK3, MPK6 und MPK4 sind (Abb. 3-20). Die Verwundung durch die Infiltration rief ebenfalls eine leichte Aktivierung der MAP-Kinasen hervor, jedoch wesentlich schwächer als durch Behandlung mit Elizitoren. Durch Verwendung von *mpk3*- und *mpk6*-Mutanten und das damit verbundene Fehlen des korrespondierenden Signals wurden MPK3 und MPK6 als aktivierte MAP-Kinasen bestätigt (Abb. 3-20, orange Markierung). Der zeitliche Verlauf der Aktivierung nach Elizitierung mit PsojNip und PaNie war dem nach flg22-Behandlung ähnlich. So waren bei 5 min erste Signale zu detektieren, das Maximum folgte nach 15 min und nach 30 min nahm die Intensität langsam ab. Das Aktivierungsmuster sowie der grundsätzliche zeitliche Verlauf waren in allen untersuchten Genotypen zu beobachten. Deutliche Unterschiede waren nicht erkennbar. Eventuell war in PsojNip- und PaNie-elizitierten Pflanzen die Aktivierung von MPK6 und MPK4 in *nabG*-Pflanzen vermindert (Abb. 3-20). Zur Ladungskontrolle wurden die Membranen mit Amidoblack gefärbt. Da keine Unregelmäßigkeiten auftraten, wurden die Färbungen nicht mit abgebildet.



**Abb. 3-20 Die Aktivierung von MAP-Kinasen nach Elizitierung der Genotypen mit 2  $\mu$ M flg22, PsojNip oder PaNie**

Die angegebenen Genotypen wurden mit den Elizitoren behandelt und nach 0, 5, 15 und 30 min geerntet. Als Kontrollen dienten mit Wasser infiltrierte Blätter. 30  $\mu$ g Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Aktivierung der MAP-Kinasen mit  $\alpha$ -TEY-Antikörper detektiert. Die Abbildung ist repräsentativ für insgesamt zwei unabhängig durchgeführte Experimente. Orange markiert sind die fehlenden Signale in mpk3 und mpk6-Pflanzen

### 3.2.5 Die Induktion der Salicylsäureakkumulation

Das Phytohormon Salicylsäure (SA) ist für die Abwehr von biotrophen Pathogenen sowie die SAR-Ausbildung essentiell und wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst (Gaffney et al., 1993; Delaney et al., 1994; Ryals et al., 1996; Zhou et al., 1998; Ferrari et al., 2003). Eine wichtige Rolle spielt sie für die hypersensitive Respons (Delaney et al., 1994; Mur et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde der Gehalt freier und konjugierter Salicylsäure (SAG) in den Wildtypen sowie den einzelnen Genotypen 24 h nach Wasser-, flg22-, Nip und PaNie-Behandlung (je 2  $\mu$ M) mittels RP-HPLC bestimmt. Zusätzlich wurde eine unbehandelte Kontrolle mitgeführt.

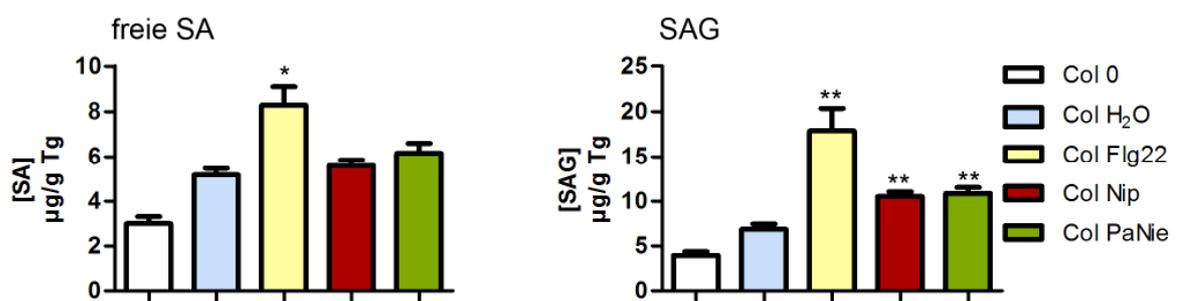
Aufgrund der Anzahl der Mutanten konnten für die SA-Bestimmung nur zwei unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen gemessen werden. Die

biologischen Experimente setzten sich dabei aus drei voneinander unabhängigen Behandlungen zusammen, um Faltungsschwankungen, verschieden starke Verletzungen sowie Einflüsse des circadianen Rhythmus auszugleichen. Es ist bekannt, dass Beleuchtung und circadianer Rhythmus einen starken Einfluss auf pflanzliche Stoffwechselwege haben. Um eine gleiche Gesamtbelichtungsdauer nach Infiltration für jeden Genotypen zu gewährleisten, wurde der genannte Zeitraum von 24 h gewählt. Vorversuche zeigten nach 4 bzw. 8 Stunden keine SA-Akkumulation (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 3-21 sind die Ergebnisse für den Wildtyp Columbia dargestellt. Die bloße Infiltration von Wasser rief aufgrund der Verwundung einen signifikanten Anstieg freier und gebundener SA hervor ( $p=0,0013$ ; nicht im Diagramm angegeben). Aus diesem Grund wurden die weiteren Auswertungen auf die Änderung bezüglich Wasserbehandlung vorgenommen.

Im Großen und Ganzen kann bei der Betrachtung der Salicylsäure nur von Tendenzen gesprochen werden. Die Antwort auf flg22 fiel etwas stärker aus als die auf PsojNip oder PaNie. So induzierte flg22 einen ca. 1,5-fachen Anstieg freier SA und einen ca. 2,5-fachen Anstieg an SAG. Es ist zu anzunehmen, dass höhere Konzentrationen von flg22 den Effekt auf die SA- Akkumulation deutlich verstärken würden.

Eine Elizitierung mit PsojNip oder PaNie führte nur zu einem schwachen Anstieg freier Salicylsäure. Die konjugierte Salicylsäure stieg durch PsojNip und PaNie um ca. das 1,5-fache. Diese Werte sind zwar signifikant (PsojNip  $p=0,0076$ ; PaNie  $p=0,0069$ ), aber nicht als wesentlich einzustufen.



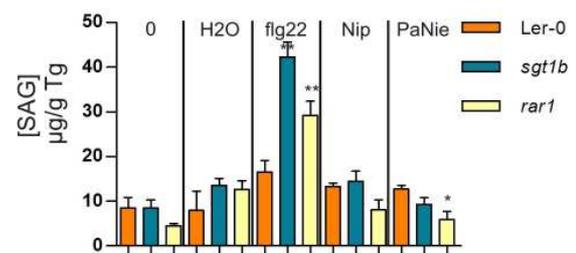
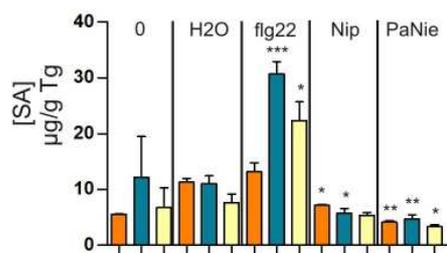
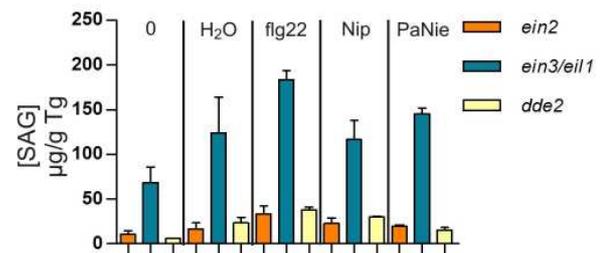
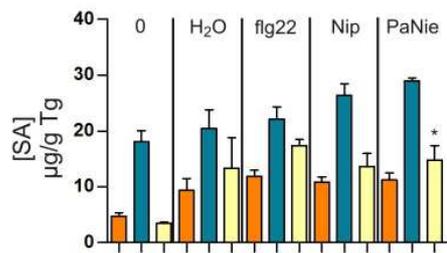
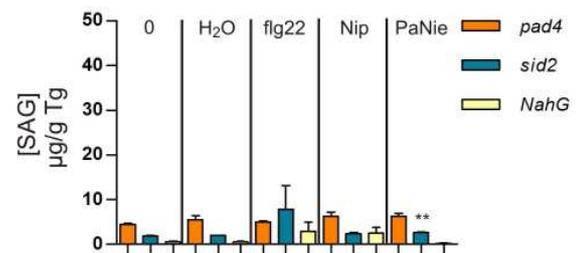
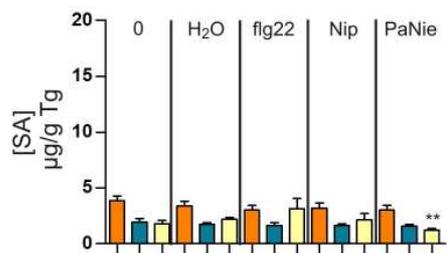
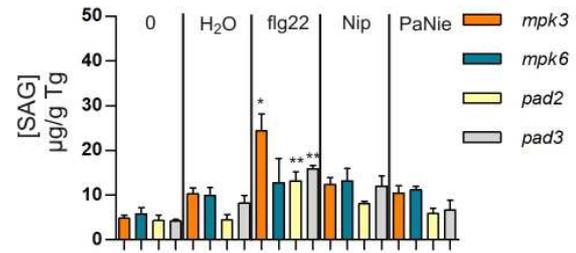
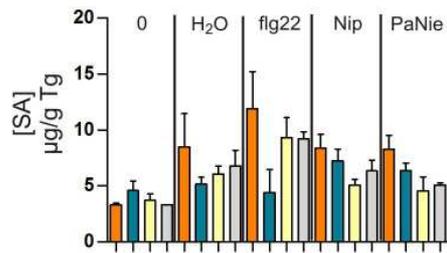
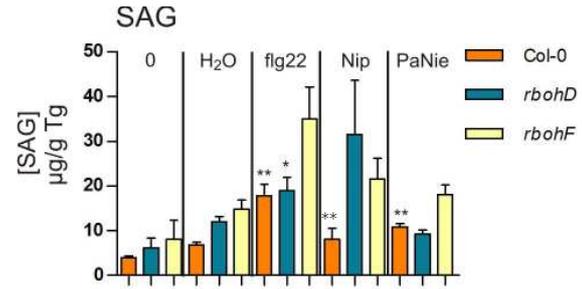
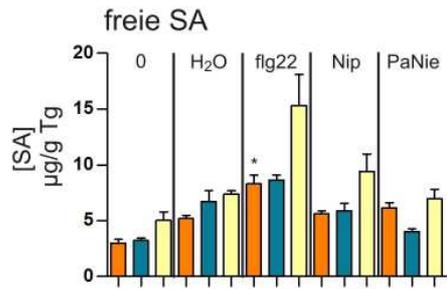
**Abb. 3-21 Die Konzentration freier und konjugierter SA in Col-0 24 h nach Infiltration von Wasser, 2 µM flg22, PsojNip oder PaNie**

Bestimmt wurden die Konzentrationen mittels RP-HPLC. Col 0 bezeichnet die Werte vollständig unbehandelter Pflanzen. Für die Signifikanzanalyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Die statistischen Analysen bezogen sich jeweils auf die Änderungen im Vergleich zur Wasserbehandlung. \*  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ .

Wie in Abb. 3-22 dargestellt wurde auch in anderen Genotypen des Col-0-Hintergrundes durch flg22-Behandlung nur schwach und durch PsojNip- und PaNie-Elizitierung fast kein SA oder SAG akkumuliert, wobei grundsätzlich die SAG-Konzentrationen stärker anstiegen als

die SA-Konzentrationen. Signifikanzanalysen zu den auftretenden Schwankungen zwischen einzelnen Genotypen und dem Wildtyp Col-0 ergaben keine signifikanten Unterschiede.

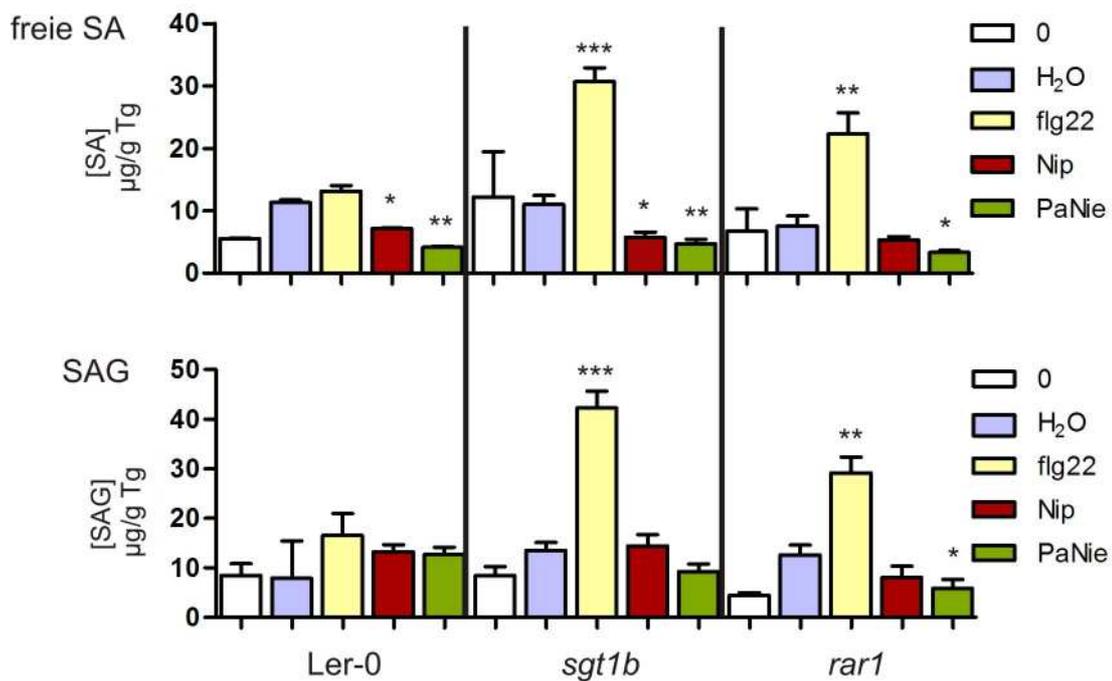
Nur in den Genotypen *sid2* und *nabG* waren schon die SA- und SAG-Konzentrationen ohne Behandlung stark verringert und erhöhten sich auch durch Elizitierung oder Verwundung nicht. Auch in der Mutante *pad4* fiel die Induktion signifikant schwächer als beim Wildtyp aus. Hervorzuheben sind die hohen Konzentrationen von SA und SAG in der *ein3eil1*-Mutante. Schon im nichtelizitierten Zustand waren die vorhandenen SA und SAG-Mengen weit über den Wildtypwerten. Durch Elizitierung stieg allerdings die Konzentration von SA und SAG nicht wesentlich. Die Mutante *ein2* dagegen verhält sich ähnlich dem Wildtyp.



**Abb. 3-22 Die Konzentrationen freier und konjugierter SA in den verschiedenen Genotypen 24 h nach Behandlung mit Wasser, 2  $\mu$ M flg22, PsojNip und PaNie (vorherige Seite).**

Mittels RP-HPLC wurden die Gehalte in getrocknetem Pflanzenmaterial bestimmt. „0“ kennzeichnet die unbehandelte Kontrolle. Die Signifikanzanalyse wurde mit dem ungepaarten t-Test in Bezug auf die Wasserbehandlung durchgeführt. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Interessant ist das Verhalten der im Ler-0-Hintergrund befindlichen Mutanten der R-Gen-vermittelten Resistenz *sgt1b* und *rar1*. Im korrespondierenden Wildtyp Ler-0 verdoppelte sich nach flg22-Behandlung der Gehalt konjugierter Salicylsäure. Die Konzentration der freien Salicylsäure stieg nur unwesentlich an. Damit verhielt sich der Ökotyp Ler-0 weitgehend wie Col-0. Dagegen akkumulierten die Mutanten *sgt1b* und *rar1* nach flg22-Elizitierung die ca. 3-fache Menge sowohl freier als auch konjugierter Salicylsäure im Vergleich zu Ler-0 (Abb. 3-23). Im Fall der Mutante *sgt1b* ist der Unterschied zu Ler-0 mit  $p=0,0003$  (freie SA) und  $p=0,0083$  (SAG) signifikant (Abb. 3-23). Die SA- und SAG-Gehalte nach PsojNip- und PaNie-Behandlung führten aber in diesen Genotypen nicht zu einem Anstieg freier oder konjugierter SA (Abb. 3-23).



**Abb. 3-23 Die Konzentrationen von freier und konjugierter Salicylsäure in Ler-0, *sgt1b* und *rar1* 24 h nach Elizitierung mit 2  $\mu$ M flg22, PsojNip und PaNie**

Bestimmt wurden die Konzentrationen mittels RP-HPLC. „0“ steht für die unbehandelte Kontrolle. Für die Signifikanzanalyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Die statistischen Analysen bezogen sich jeweils auf die Änderungen im Vergleich zur Wasserbehandlung. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$ .

### 3.2.6 Die Induktion der Jasmonatakkumulation

Als weiteres wurden die Konzentrationen von Jasmonsäure und dem Vorläufer OPDA 24 h nach Infiltration mit Wasser, flg22, PsojNip oder PaNie bestimmt. Wie bei der Salicylsäurebestimmung wurden zwei unabhängige biologische Replikate mit je zwei technischen Wiederholungen gemessen, wobei sich das Material der biologischen Replikate aus drei unabhängigen Behandlungen zusammensetzte. Eine Kontrolle mit unbehandeltem Pflanzenmaterial wurde mitbestimmt.

Wie in Abb. 3-24 zu sehen ist, waren in Col-0 erhöhte JA- und OPDA-Gehalte aufgrund der Verwundung nach 24 h nicht mehr nachweisbar. Auch nach Elizitierung mit flg22 wurden keine erhöhten JA- und OPDA-Konzentrationen gemessen. Die Konzentrationen von JA- bzw. OPDA blieben auf Grundniveau.

Nur nach PsojNip- oder PaNie-Behandlung stiegen die Konzentration von JA und OPDA um das ca. 40-fache an, wobei der OPDA-Gehalt ca. 10-mal höher war, als der JA-Spiegel.

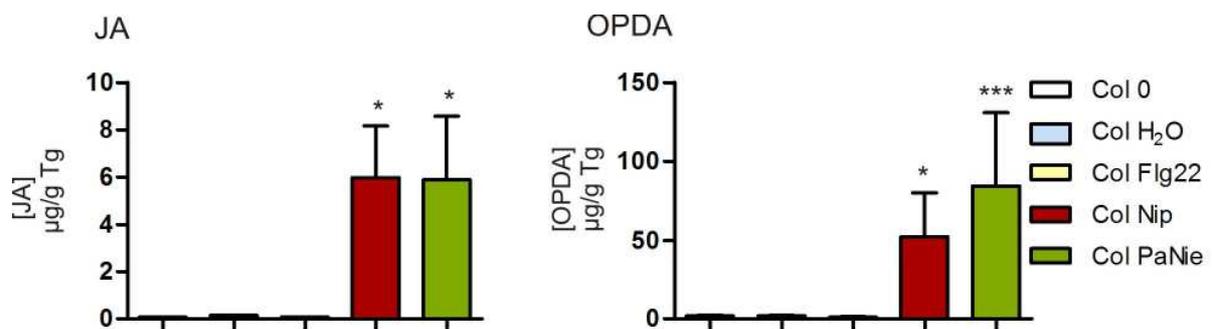
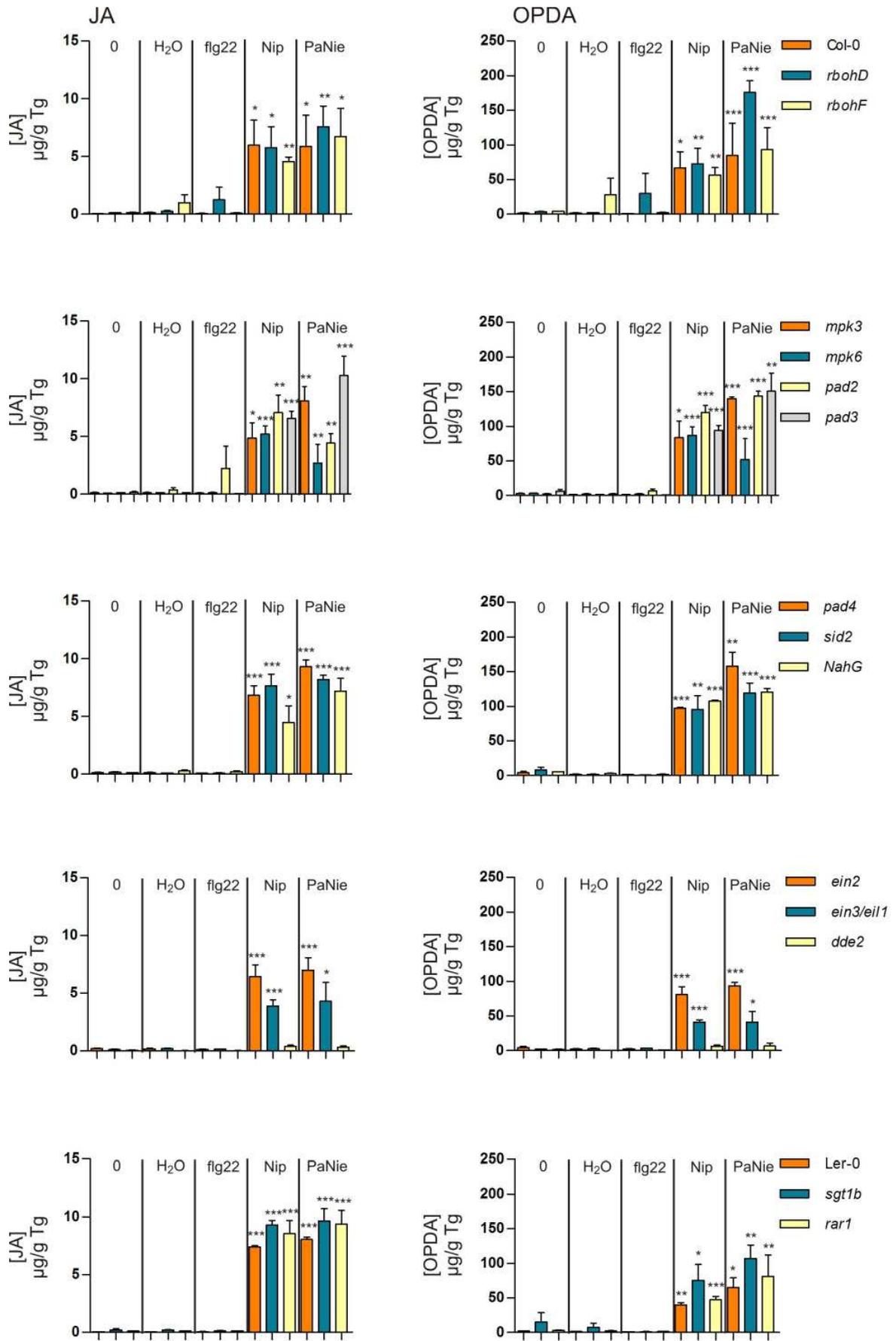


Abb. 3-24 Die Konzentrationen von JA und OPDA in Wildtyppflanzen 24 h nach Infiltration von Wasser, 2 µM flg22, PsojNip oder PaNie

Bestimmt wurden die Konzentrationen mittels GC-MS. „0“ steht für die unbehandelte Kontrolle. Für die Signifikanzanalyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Die statistischen Analysen bezogen sich jeweils auf die Änderungen im Vergleich zur Wasserbehandlung. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,005$ .

Alle untersuchten Genotypen sowie der Ökotyp Ler-0 akkumulierten ähnliche Mengen JA und OPDA wie Col-0. Die Unterschiede zwischen Mutanten und Wildtyp sowie die Varianzen zwischen PsojNip- und PaNie-infiltriertem Pflanzenmaterial waren nicht signifikant. Nur in der JA-Biosynthesemutante *dde2* war wie erwartet kaum JA oder OPDA zu detektieren (Abb. 3-25). Die in *rbobF* detektierte starke Erhöhung des OPDA-Levels nach H<sub>2</sub>O-Behandlung ist auf einen stark erhöhten Wert aus vier Messungen zurückzuführen und nicht signifikant. Allerdings ist dadurch auch die Induktion der JA- und OPDA-Akkumulation nach Elizitierung nicht signifikant. Dieser Fall muss durch weitere Replikate verifiziert werden.



**Abb. 3-25 Die Konzentrationen von JA und OPDA in den verschiedenen Genotypen 24 h nach Behandlung mit Wasser, 2  $\mu$ M flg22, PsojNip und PaNie (vorherige Seite).**

Mittels GC-MS wurden die Gehalte in getrocknetem Pflanzenmaterial bestimmt. „0“ kennzeichnet die unbehandelte Kontrolle. Für die Signifikanzanalyse wurde der ungepaarte t-Test verwendet. Die statistischen Analysen bezogen sich jeweils auf die Änderungen im Vergleich zur Wasserbehandlung. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p > 0,005$ .

### **3.2.7 Die Induktion der Phytoalexinakkumulation in *Arabidopsis thaliana* und Petersilie**

Auf den Angriff von Pathogenen reagieren Pflanzen mit der Bildung niedermolekularer antimikrobieller Substanzen, den Phytoalexinen. Auch die Mitglieder der NLP-Familie sind in der Lage, die Phytoalexinbiosynthese zu induzieren (Veit et al., 2001; Qutob et al., 2006).

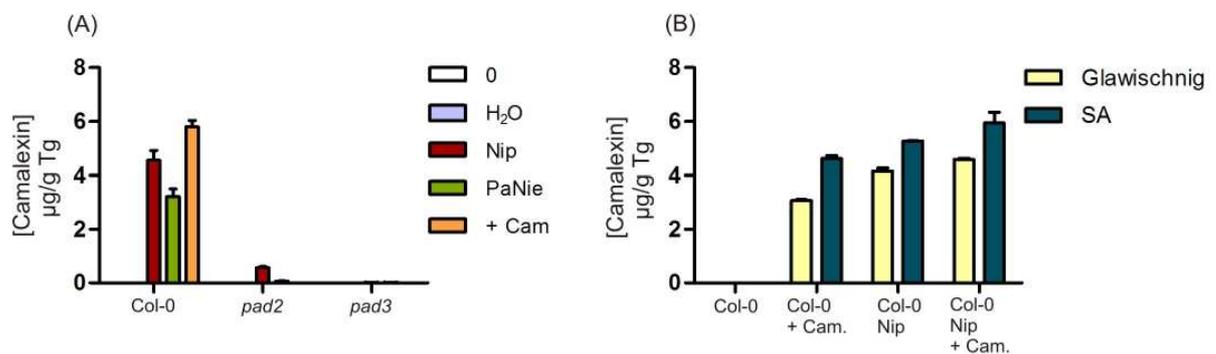
In dieser Arbeit wurde die Konzentration des Phytoalexins Camalexin in *A. thaliana*-Wildtyp- und Mutantpflanzen sowie Furanocoumarin im Überstand von Petersiliesuspensionskulturen nach 24 h bestimmt. *Arabidopsis* wurde dafür mit je 2  $\mu$ M PsojNip, PaNie oder flg22 behandelt. Bei der Elizitierung von Petersiliezellkulturen kam statt flg22 Pep13 zum Einsatz. Zur Kontrolle wurde unbehandeltes sowie mit Wasser behandeltes Material verwendet.

#### **3.2.7.1 Die Optimierung der Camalexinbestimmung**

Der Bestimmung des Camalexingehaltes in *Arabidopsis* ging eine Optimierung der Methode voraus. Ausgangspunkt war das Extraktionsprotokoll von Glawischnig et al., wonach Camalexin mit einem Methanolaufschluss (50 % Methanol, 60 °C) extrahiert und mittels RP-HPLC analysiert wird (Glawischnig et al., 2004). Die Auftrennung erfolgt dabei mit einem linearen Anstieg der Methanolkonzentration von 30 % bis 100 % und die Substanz wird bei 318 nm detektiert. Dieses Protokoll führte in der vorliegenden Arbeit nicht zu einer effizienten Trennung des Camalexins von anderen Substanzen. Ziel war es deshalb, eine optimale Separation von Camalexin zu erreichen. Dabei stellte sich heraus, dass bei der Analyse von Salicylsäure eine Substanz detektiert wird, die mit dem Camalexinstandard korrespondiert. Die Retentionszeit des Signals war 24 min, was einer Methanolkonzentration von 80 % entspricht (Kapitel 2.2.4.5). Eigentlich dient in dem Protokoll zur Salicylsäurebestimmung der Schritt mit 80 % Methanol dem Waschen der Säule. Über die Verwendung der camalexindefizienten Mutanten *pad2* und *pad3* konnte nachgewiesen, dass das detektierte Signal spezifisch Camalexin darstellt (Abb. 3-26 A). Dies wurde zudem mittels LC-MS bestätigt (durchgeführt von Dr. C. Böttcher, Daten nicht gezeigt). Wurde zu Extrakten

PsojNip-behandelter Pflanzen zusätzlich Camalexin als Standard zugegeben, trat kein weiteres Signal auf, sondern es verstärkte sich das vorhandene (Abb. 3-26 A, B). Verglichen zur Camalexin-Extraktion nach Glawischnig ist das Protokoll der SA-Extraktion kompliziert. Es wurde deshalb überprüft, inwieweit sich Camalexin ohne Verluste nach dem SA-Protokoll extrahieren lässt.

Wie in Abb. 3-26 B zu sehen ist, erreichte man mit der SA-Methode leicht höhere Camalexin-Ausbeuten als mit dem Protokoll nach Glawischnig, was die Grundaussage aber nicht veränderte. Die SA-Extraktion unterteilt sich in die Extraktion von freier und glykosylierter SA. Camalexin wurde ausschließlich bei Messungen der freien SA detektiert.



**Abb. 3-26 Optimierung der Camalexinbestimmung**

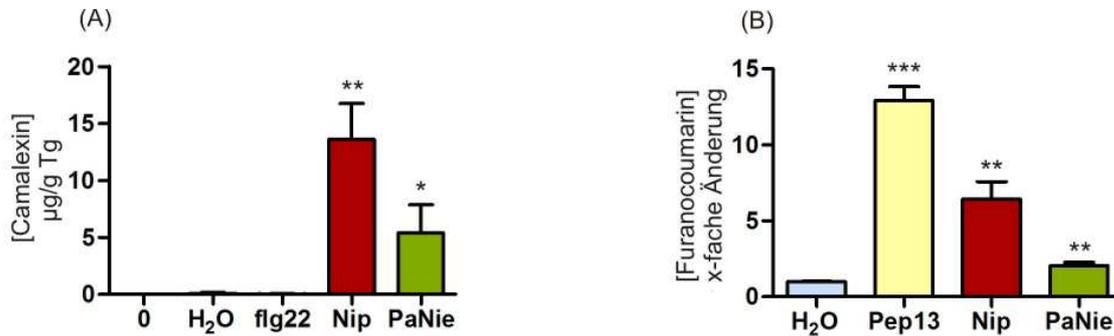
(A) Wildtyp und die Mutanten *pad2* und *pad3* wurden mit 2  $\mu$ M PsojNip und PaNie infiltriert und nach 24 h geerntet. „+ Cam“ kennzeichnet eine Probe von PsojNip-behandelten Pflanzen, die mit 5 ng/ml Camalexin versetzt wurden.

(B) Zum Effizienzvergleich der Extraktionsmethode nach Glawischnig und der SA-Extraktionsmethode wurden folgende Proben nach den Protokollen aufgeschlossen: Col-0 = Wildtyp unbehandelt; Col-0 + Cam. = Wildtyp, dem vor der Extraktion Camalexin zugesetzt wurde; Col-0 Nip = mit 2  $\mu$ M PsojNip behandelter Wildtyp; Col-0 Nip + Cam. = dieselbe Probe mit 5 ng/ml Camalexin.

### 3.2.7.2 Die Camalexinkonzentrationen in *A. thaliana*-Pflanzen und Furanocoumarinkonzentrationen in Petersiliezellkulturen

In *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen Col-0 wurde die Camalexinakkumulation deutlich durch Elizitierung mit PsojNip und PaNie induziert, wobei der Effekt durch PsojNip stärker war als durch PaNie. Diese Differenz ist allerdings nicht signifikant. Die Behandlung mit flg22 sowie eventuelle Verwundungen durch Wasser führten zu keinen erhöhten Camalexingehalten (Abb. 3-27 A). Petersiliezellen reagierten auf Pep13 sowie PsojNip und PaNie mit einer starken Akkumulation von Phytoalexinen. Allerdings war die Furanocoumarin-Konzentration nach PsojNip und PaNie-Elizitierung signifikant niedriger ( $p=0,0471$ ) als die durch Pep13 induzierte. Wie bei *A. thaliana* fiel die Induktion in Petersiliezellkulturen durch PaNie

schwächer aus als durch PsojNip. Dieser Unterschied ist mit  $p=0,0157$  als signifikant zu werten (Abb. 3-27 B).



**Abb. 3-27 Die Phytoalexinkonzentration in *A. thaliana*-Pflanzen und Petersiliezellkulturen 24 h nach Elizitierung mit PsojNip, PaNie und flg22 oder Pep13**

(A) Gemessen wurde die Konzentration gebildeten Camalexins in *A. thaliana* 24 h nach Elizitierung mit je 2  $\mu\text{M}$  flg22, PsojNip und PaNie. Als Kontrollen wurden unbehandelte und mit Wasser behandelte Pflanzen verwendet.

(B) Im Medium von Petersiliezellkulturen wurde die Konzentration der sekretierten Furanocoumarine 24 h nach Elizitierung mit 2  $\mu\text{M}$  PsojNip, PaNie und Pep13 bestimmt.

Fast alle analysierten *Arabidopsis*-Genotypen akkumulierten ähnliche Camalexinmengen wie der Wildtyp Col-0. Auch hier war die Induktion von Camalexin durch PaNie schwächer als durch PsojNip. Die beobachteten Varianzen zwischen Wildtyp und Mutanten, z.B. bei *rar1*, sind nicht signifikant (Abb. 3-28).

In *nabG*-Pflanzen sowie der Camalexinbiosynthesemutante *pad3* konnten nach Behandlung mit PsojNip und PaNie keine erhöhten Camalexinkonzentrationen gemessen werden. Auch in *pad4* und *pad2* ist die Konzentration verglichen zum Wildtyp deutlich reduziert. Diese Verminderung sind aber nur für PsojNip signifikant (*pad3*  $p=0,0093$ ; *pad4*  $p=0,0203$ ; *nabG*  $p=0,0078$ , *pad2*  $p=0,0042$ ) nicht jedoch für PaNie (*pad3*  $p=0,05$ ; *pad4*  $p=0,255$ ; *nabG*  $p=0,108$ ), was auf die an sich geringe Akkumulation von Camalexin durch PaNie-Behandlung zurückgeführt werden kann. Die beobachtete 4-fach höhere Camalexinkonzentration in *pad2* nach PaNie-Infiltration im Vergleich zur PsojNip-Behandlung ist nicht signifikant ( $p=0,12$ ). Ähnlich wie bei den Salicylsäuremessungen wies die *ein3eil1*-Mutante sehr hohe Camalexingrundlevel auf. Nach Elizitierung wurden Werte ähnlich Col-0 erreicht (Abb. 3-28).

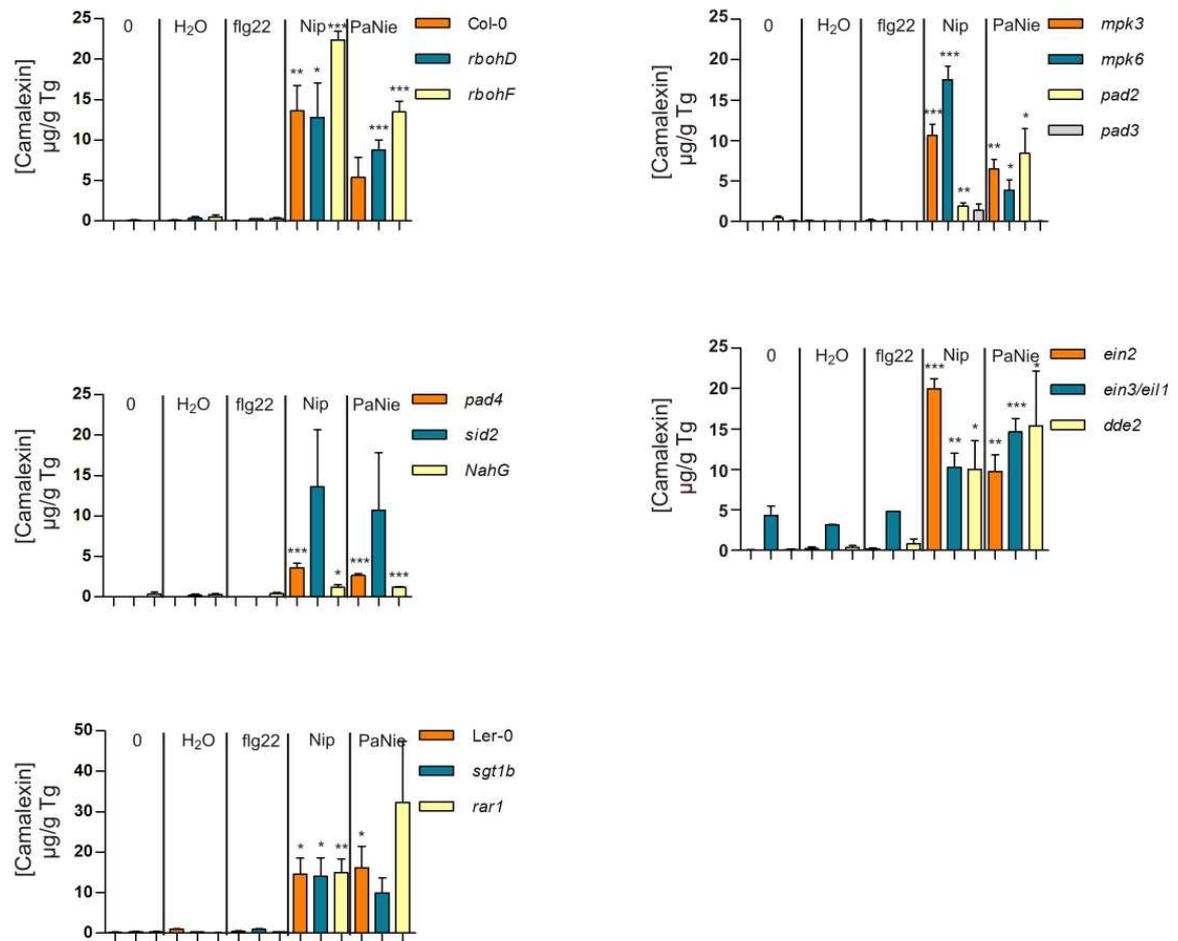


Abb. 3-28 Die Camalexinkonzentration in den verschiedenen Genotypen

Dargestellt ist die Camalexinkonzentration in den angegebenen Genotypen nach Elizitierung mit 2 µM PsojNip oder PaNie. Die statistische Auswertung wurde mit einem ungepaarten t-Test in Bezug auf die Wasserbehandlung vorgenommen. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,005.

## 4 Diskussion

Pflanzen sind permanent dem Angriff verschiedener Pathogene ausgesetzt, wobei sie gegen die Mehrheit der Krankheitserreger resistent sind. Sowohl für die Resistenz- als auch für die Krankheitsausprägung sind mikrobielle Strukturen notwendig. Während durch PAMPs die Abwehrmaschinerie der Pflanze aktiviert wird, zerstören Toxine die Zellen und ermöglichen so nekrotrophen Pathogenen das Wachstum.

In dieser Arbeit wurden die Abwehrantworten von *Arabidopsis thaliana* auf die Proteine PsojNip und PaNie aus der NLP-Familie sowie auf den gut charakterisierten PAMP flg22 untersucht.

### 4.1 Die Expression, *in vitro*-Faltung und Stabilität von PsojNip

#### 4.1.1 Eine lösliche Expression von PsojNip in *E. coli* ist nicht möglich

Die Aktivität von Proteinen hängt sowohl *in vivo* als auch *in vitro* maßgeblich von einer korrekten Faltung ab. Grundsätzlich erfolgt dabei die Ausprägung der Sekundärstruktur sehr schnell (Udgaonkar et al., 1988, , 1990), die Bildung der Tertiärstruktur, z.B. durch korrekte Disulfidverbrückung, dagegen langsam (Creighton, 1978).

Zur Herstellung großer Mengen Proteins ist die heterologe Expression von Proteinen in Bakterien wie *E. coli* eine weit verbreitete Methode. Die exprimierten Proteine können dabei bis zu 25% der Gesamtproteinmenge ausmachen. Doch in den meisten Fällen resultiert diese Produktion in der Bildung von *inclusion bodies* (Marston, 1986), wobei eine Korrelation zwischen Primärstruktur und Aggregationstendenz bisher nicht nachgewiesen wurde. Vielmehr kann die Bildung von *inclusion bodies* auf zwei Gründe reduziert werden. Die Proteinfaltung *in vivo* wird durch *chaperone* kontrolliert, was eine Aggregatbildung weitestgehend verhindert (Buchner, 1996). Bei der starken Expression heterologer Proteine liegen aber unter Umständen die benötigten *chaperone* nicht in ausreichender Menge vor. Weiterhin erfolgt in der reduzierenden Umgebung des bakteriellen Cytosols die oxidative Ausbildung von Schwefelbrücken nur sehr langsam. Auch PsojNip und PaNie werden überwiegend als *inclusion bodies* exprimiert (vorliegende Arbeit, (Qutob et al., 2006)).

Es kann verallgemeinert werden, dass die *inclusion body*-Bildung durch das Verhältnis von Proteinsynthese, Faltung und Aggregation beeinflusst wird (Kiefhaber et al., 1991). Somit kann die Reduktion der Expressionsrate zu einer geringeren intrazellulären Konzentration ungefalteter Polypeptidketten und somit zu verminderter Aggregationstendenz führen.

Im Fall von PsojNip verursachte eine Verringerung der Expression zwar eine Reduktion der Proteinausbeute, erhöhte aber nicht den Anteil löslichen PsojNip (Abb. 3-2).

*Chaperone* verhindern nicht nur die Aggregation während der Proteinfaltung *in vivo*, sie können auch bereits aggregierte Proteine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* reaktivieren (Wiech et al., 1992; Hartl and Hayer-Hartl, 2002). Durch Stresse wie Hitze, Osmolyte oder Ethanol können *chaperone* aktiviert werden (Arsene et al., 2000; Guisbert et al., 2004). So simuliert die Zugabe von Ethanol zum Anzuchtmedium von *E. coli* einen Hitzeschock und induziert u.a. den *chaperone*-Komplex aus DnaJ, DnaK und GrpE (Kwak et al., 2000). Generell ist die Interaktion zwischen *chaperone* und Protein sehr spezifisch (Blum et al., 1992; Lee et al., 1992; Schumann et al., 2004). Dass in der vorliegenden Arbeit eine Ethanolzugabe nicht die lösliche Expression von PsojNip verbesserte, kann darin begründet liegen, dass die induzierten *chaperone* nicht mit PsojNip interagieren. Möglicherweise lagen die *chaperone* auch nicht in ausreichender Konzentration vor oder hydrophobe Bereiche von PsojNip waren nicht für die *chaperone* zugänglich.

Auf Grund der reduzierenden Bedingungen im Cytosol von *E. coli* ist die korrekte Ausbildung von Disulfidbrücken heterologer Proteine problematisch. Da PsojNip drei Cysteine besitzt (Qutob et al., 2002), könnte dies ein limitierender Faktor bei der Faltung sein. Doch auch durch die Verwendung faltungsassistierender *E. coli*-Stämme (AD494, Origami und Origami(DE3)pLys) konnte die Aggregation von PsojNip nicht verhindert werden. Vielleicht hätte eine zusätzliche Reduktion der Induktionsbedingungen einen positiven Effekt gehabt, was aber im Rahmen der Arbeit nicht getestet wurde (Abb. 3-3). Somit ist zu vermuten, dass die Cysteine nur einen marginalen Einfluss auf die lösliche Expression haben.

Als weitere wichtige Gründe für Aggregate sind die Zusammenlagerung hydrophober Bereiche (Thomas et al., 1996) sowie die *cis-trans*-Isomerisierung von Prolinen zu nennen. Da die *cis-trans*-Isomerisierung, katalysiert durch die Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase, (Fischer et al., 1984) nur sehr langsam abläuft (Brandts et al., 1975), kann dies ein limitierender Schritt sein. PsojNip besitzt 13 Proline, was ungefähr 8 % der Aminosäuren entspricht. Auch PaNie, was ebenfalls als *inclusion bodies* abgelagert wird, weist einen Prolinanteil von ca. 7 % (15 Proline) auf. In einer Untersuchung von Schein et al. konnte bei der heterologen Expression verschiedener Proteine in *E. coli* die Anzahl der Proline mit der Löslichkeit korreliert werden. Alle Proteine mit einem Prolinanteil von 5 % oder mehr wurden als *inclusion bodies* exprimiert (Schein, 1989). So wäre auch bei PsojNip und PaNie neben möglichen hydrophoben Interaktionen eine Behinderung der Faltung durch den hohen Prolinanteil denkbar.

#### 4.1.2 Analysen zur *in vitro*-Faltung von PsojNip

Da eine lösliche Expression von PsojNip in *E. coli* nicht möglich war, wurde PsojNip aus *inclusion bodies* renaturiert. Im ungefalteten Zustand interagieren die Proteine hauptsächlich mit dem Lösungsmittel. Diese Interaktionen werden bei einer Faltung sukzessive durch intra- und intermolekulare, hydrophobe oder elektrostatische Wechselwirkungen ersetzt, wobei die treibende Kraft die Erreichung des energetisch günstigsten Zustandes ist. Dabei existiert eine ständige Konkurrenz von korrektem Faltungsweg und irreversibler Aggregation, so dass Faltungsbedingungen für jedes Protein einzeln bestimmt werden müssen (Rudolph and Lilie, 1996).

In der vorliegenden Arbeit umfasste die Optimierung der Faltungsbedingungen

- I) die Wahl des geeigneten Solubilisierungsmittels
- II) die Suche nach der optimalen Zusammensetzung der Renaturierungslösung.

##### 4.1.2.1 Die Wahl des geeigneten Solubilisierungsmittels

Für die Solubilisierung von Einschlusskörpern werden denaturierende Chemikalien und Reduktionsmittel eingesetzt. Meist kommen dafür die chaotrope Harnstoff und Guanidiniumchlorid (Gdm-Cl) zum Einsatz. Gdm-Cl ist zusätzlich ein monovalentes Salz, weshalb es bei der Verwendung hoher Gdm-Cl-Konzentrationen zu einer Erhöhung der Ionenstärke kommt. Somit beruht die Denaturierung neben der Störung hydrophober Wechselwirkungen auch auf elektrostatischen Wechselwirkungen.

In Gdm-Cl solubilisiertes PsojNip präzipitierte bei Verdünnen in Wasser mit und ohne Additiven in allen Lösungen (Abb. 3-4). Nur durch den Zusatz des nichtionischen Detergenz Brij58 wurde Aggregation verhindert. Brij58 bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins und unterdrückt so Interaktionen (Krause et al., 2002). PsojNip, das in Harnstoff gelöst wurde, neigte dagegen kaum zur Präzipitatbildung, weshalb die präparierten *inclusion bodies* grundsätzlich mit 8 M Harnstoff solubilisiert wurden. Bei dem durchgeführten Experiment ergab sich durch das Verdünnen eine Gdm-Cl-Restkonzentration von ca. 100 mM. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass PsojNip, rückgefaltet in Wasser, zeitweise nekrosebildende Aktivität aufweisen konnte, aber salzsensitiv war. So präzipitierte das Protein ab ca. 100 mM NaCl (Daten nicht gezeigt). Somit kann die Aggregation des Gdm-Cl-solubilisierten Proteins auf Salzeffekte, speziell auf das Auflösen stabilisierender Salzbrücken, zurückgeführt werden.

#### 4.1.2.2 Die Rückfaltungsanalyse

Im Rahmen der Rückfaltungsanalyse von PsojNip wurden 53 verschiedene Lösungen getestet und die Effizienz anhand der Nekrosebildung untersucht. Eine direkte Korrelation zwischen Proteinaktivität und Aggregation wurde dabei nicht beobachtet (Abb. 3-5). Generell wirkten sich intermediatstabilisierende Chemikalien wie PEG1500 und Tween20, das Reduktionsmittel DTT und das Redoxsystem GSH/GSSG positiv auf die *in vitro* Faltung aus. Eine Faltung von PsojNip in reinem Wasser, vergleichbar zu PaNie, war nur zeitweise zu beobachten. Im Rahmen der Arbeit konnte nicht geklärt werden, welche Faktoren eine zuverlässige Renaturierung in Wasser ermöglichen. In Wasser wird die Disulfidverbrückung lediglich durch den gelösten Luftsauerstoff initiiert. Grundsätzlich ist die Rückfaltung durch Luftoxidation auch bei Proteinen mit mehreren Disulfidbrücken möglich. Menzella et al. beschrieben beispielsweise die oxidative Rückfaltung von Chymosin, was drei Schwefelbrücken enthält (Menzella et al., 2002).

Bei Proteinen mit mehr als zwei Cysteinen existieren neben der korrekten Disulfidbrücke alternative Verbindungen, die die Aktivität des Proteins, wie am Beispiel des *insulin-like growth factor I* (IGF-I) beobachtet, verhindern können (Miller et al., 1993). Somit bedarf es der Möglichkeit, falsch gefaltete Brücken zu korrigieren. In Wasser hat Sauerstoff ein Redoxpotential von +0,82 V. Somit ist Sauerstoff ein sehr schwaches Reduktionsmittel und nicht in der Lage, falsch ausgebildete Schwefelbrücken wieder zu lösen. Bei PsojNip sind auf Grund der Cysteinanzahl neben der zu erwartenden Disulfidbrücke C56-C82 auch Bindungen zwischen C56-C128 und C82-C128 möglich. Dies erklärt den positiven Effekt von DTT auf die Renaturierung von PsojNip in Wasser. DTT bewirkt dabei eine Reduktion der Schwefelbrückenbildung, wodurch falsche Disulfidbindungen leichter korrigiert werden können (Saxena et al., 1970). Die oxidativen Vorgänge in Wasser können durch zweiwertige Metallionen wie Kupfer katalysiert werden (Ahmed et al., 1975). Da dadurch nur die Reaktionsgeschwindigkeiten seitens der Oxidation, nicht aber die Reduktion beeinflusst wird, hatte dies für PsojNip keinen positiven Einfluss.

Die besten Ergebnisse wurden bei der Verwendung eines basischen Tris-Puffers mit dem Redoxsystem GSH/GSSG erzielt. Durch das negative Redoxpotential dieser Lösung (-0,1 V) ist eine Korrektur falscher Disulfidbrücken möglich. Somit kann geschlussfolgert werden, dass sich bei der Rückfaltung von PsojNip ein Disulfidbrückenmuster ausbildet, wofür die Unterstützung eines Redoxshufflingsystems notwendig ist. Ob diese Brücke wie bei PaNie zwischen C56 und C82 besteht, kann nicht beantwortet werden. Es stellte sich somit die Frage, ob die ungerade Cysteinanzahl von PsojNip die Faltung in Wasser behindert. Dies

wurde durch den Austausch der Cysteine gegen Serin sowie dem an Position 128 in PaNip vorkommenden Valin untersucht. Die Entfernung eines Cysteins führte nicht zur Verbesserung der Faltbarkeit durch Luftoxidation. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Cysteine zwar einen limitierenden Faktor in der Faltung darstellen, aber nicht die ungerade Cysteinanzahl der Grund ist. Auch NPP1, das lediglich zwei Cysteine besitzt, lässt sich nicht durch Dialyse gegen Wasser renaturieren (Dr. F. Brunner, persönliche Kommunikation). Als weitere Erklärung ist eine Behinderung der Rückfaltung durch hydrophobe Wechselwirkungen naheliegend. Darauf deutet auch die Beobachtung, dass Brij58 die Aggregation von in Gdm-Cl gelöstem PsojNip in Wasser verhindert.

#### 4.1.3 Die Funktion der Cysteine für die Aktivität von PsojNip

Entgegen den Beobachtungen von Anett Romanski zu NPP1 (Romanski, 2001) hat bei PsojNip ein Austausch sowohl des nichtkonservierten Cysteins als auch der Cysteine C56 und C82 keinen Verlust der zelltodinduzierenden Aktivität zur Folge (Abb. 3-11). Dies ist insofern überraschend, als dass offenbar eine Ausprägung der Disulfidbrücke bei der Rückfaltung eine wichtige Rolle spielt.

Die Funktionen von Cysteinen in einem Protein sind mannigfaltig. Grundsätzlich stabilisieren sie in Form von Disulfiden die Tertiärstruktur und gewährleisten somit die Aktivität (Klink et al., 2000; Wedemeyer et al., 2000). Freie Cysteine sind meist in hydrophobe Bereiche eingeschlossen und können über Bindung von Metallionen zusätzlich die Struktur eines Proteins stabilisieren (Giles et al., 2003). Allerdings zeigten Arbeiten anhand einer 1,2- $\alpha$ -Mannosidase aus *Saccharomyces cerevisiae*, dass nicht alle Disulfidbrücken für die Aktivität notwendig sein müssen, sondern ausschließlich für die Stabilisierung der Konformation benötigt werden (Lipari et al., 1996). Weiter konnte bei der 1,2- $\alpha$ -Mannosidase aus *Aspergillus saitoi* nachgewiesen werden, dass die nach Substitution von Cysteinen verbleibende Aktivität des Proteins vom van-der-Waals-Radius des Substituenten abhängt (Tatara et al., 2005). Bei einem Austausch von Cysteinen gegen Aminosäuren mit gleichem van-der-Waals-Volumen blieb die korrekte Konformation und somit die volle Aktivität erhalten. Wurden Cysteine jedoch gegen Isoleucin, Tyrosin oder Phenylalanin ersetzt, kam es zu einer Fehlfaltung einhergehend mit der Inaktivierung des Proteins. (Tatara et al., 2005).

Im Fall von PsojNip wurden die Cysteine gegen Serin ausgetauscht, das nichtkonservierte Cystein (C128) zusätzlich gegen Valin. Da alle PsojNip-Derivate volle Zelltodaktivität aufwiesen, scheint die Tertiärstruktur grundsätzlich intakt zu sein. Dies wurde jedoch durch

biophysikalische Analysen nicht weiter untersucht. Diese Cysteine wurden außerdem in der vorliegenden Arbeit nicht durch Aminosäuren mit größerem van-der-Waals-Volumen ersetzt. Weiterhin wurde nicht analysiert, ob und wenn ja welche Disulfidbrücke tatsächlich ausgebildet wird. Zur Klärung dieser Frage wären Austausch von zwei Cysteinen notwendig gewesen. Eine Quantifizierung der Sulfide und freien Cysteine mit 2-Nitro-5-thiosulfobenzoat (NTB) (Thannhauser et al., 1984) bzw. 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoat) (DTNB) (Jocelyn, 1987) könnte sich zur weiteren Charakterisierung anschließen. Weiterhin kann über eine Carboxymethylierung mit radioaktivem Iodacetat und anschließender Proteolyse die Position des freien Cysteins bestimmt werden. Es ist prinzipiell davon auszugehen, dass eine Schwefelbrücke in PsojNip ausgeprägt wird. Dafür spricht zum einen die Notwendigkeit eines Redoxsystems bei der Rückfaltung, zum anderen sind Disulfidbrücken in sekretierten Proteinen charakteristisch (Hogg, 2003). Da jedoch kein Verlust der Zellaktivität durch Entfernung von Cysteinen beobachtet werden konnte, übernimmt die Disulfidbrücke vermutlich ausschließlich eine stabilisierende Funktion.

#### 4.1.4 Die Stabilität von PsojNip und dem homologen Protein PaNie

Untersucht wurden die Hitze- und Proteasestabilität beider Proteine. In Tabelle 4-1 sind die Ergebnisse des Kapitels 3.1.4.1. zusammengefasst

**Tabelle 4-1 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Untersuchungen der Hitze- und Proteasestabilität von PsojNip und PaNie**

		PsojNip	PaNie
		Reduktion nach	Reduktion nach
<b>Hitzebehandlung</b>	Proteinkonzentration	30 min 95 °C	30 min 95 °C
	Zelltod	30 min 95 °C	> 60 min 95 °C
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Akkumulation	60 min 95 °C	60 min 95 °C
<b>Proteasebehandlung</b>	Vollängenprotein	Protease Type XVI	Protease Type XVI
	Zelltod	Protease Type XVI	Protease Type XVI

Sowohl PsojNip als auch PaNie erwiesen sich in der vorliegenden Arbeit als relativ hitzestabil und schwer proteolytisch zu spalten. Diese Stabilität kann auf Schwefelbrücken zurückgeführt werden. So ist bekannt, dass ein Verlust von Disulfidbrücken die Stabilität von Proteinen herabsetzen kann (McRee et al., 1990; Fremaux et al., 2002; Tatara et al., 2005). Weiterhin sind sie für die Stabilität von Proteinen thermophiler Mikroorganismen notwendig (Sandgren et al.,

2003; Sakaguchi et al., 2008). Inwieweit die Substitution der Cysteine in PsojNip zu einer verminderten Temperatur- oder Proteaseresistenz führt, wurde in dieser Arbeit nicht getestet. Eine vergleichbare Thermostabilität ist von NEP1 aus *Fusarium oxysporum* publiziert. Dabei wurde die Nekrose- und Ethylenbildung in Blättern von *Erythroxylum coca* untersucht (Bailey, 1995). NPP1 ist dagegen temperatursensitiv (Fellbrich, 2001). Es muss allerdings angemerkt werden, dass die Untersuchung von Fellbrich anhand der Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten durchgeführt wurde und nicht anhand der Zelltodaktivität in *Arabidopsis*-Pflanzen.

PsojNip scheint verglichen zu PaNie etwas instabiler zu sein. Inwieweit die Rückfaltung von PaNie effizienter verläuft als von PsojNip, wurde nicht untersucht. Da PsojNip bei der Aufkonzentrierung stärker präzipitierte als PaNie, wäre dies durchaus zu vermuten. Zur genaueren Analyse müssten CD- oder Fluoreszenzspektren bestimmt sowie Stabilitätsübergänge gemessen werden (Royer, 1995; Greenfield, 2006). Im Fokus dieser Arbeit stand jedoch die Gewinnung von aktivem PsojNip und nicht die detaillierte biophysikalische Charakterisierung des Proteins. Aus diesem Grund wurden derartige Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht angefertigt.

Weiterhin war auffällig, dass erst nach 60 min Hitzebehandlung von PsojNip die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion reduziert war, der Zelltod jedoch schon nach 30 min Kochen nicht mehr detektiert werden konnte. Es wäre somit denkbar, dass die Zelltodinduktion und die Aktivierung von Abwehrmechanismen unabhängig voneinander ablaufen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass für das Auslösen der Abwehrmechanismen nicht die vollständige Struktur erhalten sein muss.

## **4.2 Die durch PsojNip und PaNie aktivierten Abwehrreaktionen im Vergleich zur Elizitierung mit dem PAMP flg22**

### **4.2.1 Die aktivierten Abwehrmechanismen**

Die pflanzliche Immunität wird nach der Erkennung von Pathogenen durch die Aktivierung verschiedener Signalwege gewährleistet. Dieses Netzwerk von Abwehrmechanismen läuft in verschiedenen Pflanzen ähnlich ab (Hammond-Kosack et al., 2003). Zudem wird durch verschiedene Elizitoren ein ähnliches Muster von Abwehrmechanismen induziert (Kunze et al., 2004; Denoux et al., 2008; Livaja et al., 2008). Dass auch durch NLPs Abwehrmechanismen ausgelöst werden, wurde in mehreren Publikationen demonstriert (Fellbrich, 2001; Romanski, 2001; Fellbrich et al., 2002; Qutob et al., 2006) und ist in Kapitel

1.4 zusammengefasst. In welcher Abhängigkeit und zeitlichen Reihenfolge die Antworten auf Elizitierung mit PsojNip und PaNie dabei ablaufen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Vergleichend wurden die Mechanismen der flg22-Abwehr analysiert. Dabei konnten jedoch nicht alle Signalwege einbezogen werden. So wurde beispielsweise nicht auf die Funktion von Stickstoffmonoxyd (NO) eingegangen. NO übernimmt in Pflanzenzellen mannigfaltige Aufgaben, so auch in der Pathogenabwehr (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1999). Aber die Informationen über die NO-Bildung in Pflanzen sind vage. So konnte bisher keine NO-Synthase identifiziert werden (Zemojtel et al., 2006). Die verfügbare Mutante *noa1* weist zwar reduzierte NO-Gehalte auf, die Funktion des Proteins ist bisher aber noch nicht bekannt (Zhao et al., 2007).

Die direkte Analyse der Pflanzenhormone beschränkte sich auf JA und SA. Für die NLPs PaNie, NPP1 und Nep1 sowie den PAMP flg22 ist zwar eine erhöhte Akkumulation von Ethylen nach Elizitierung bekannt (Bailey, 1995; Felix et al., 1999; Veit et al., 2001; Fellbrich et al., 2002), aber für PsojNip wurden noch keine Messungen der Ethylengehalte durchgeführt. Es wird jedoch weithin angenommen, dass PsojNip wie alle Vertreter der NLP-Familie eine Erhöhung der Ethylenkonzentration hervorruft. Die Rolle von Ethylen in der Antwort auf PsojNip, PaNie und flg22 wurde in dieser Arbeit indirekt über die Verwendung von Mutanten des Ethylenweges (*ein2*, *ein3eil1*) analysiert.

In den nachfolgenden Kapiteln ist das Zusammenspiel verschiedener Abwehrreaktionen dargestellt. Auf deren Einfluss auf die Ausprägung des Zelltodes nach PsojNip- oder PaNie-Behandlung wird gesondert in Kapitel 4.2.1.4 eingegangen. Auch die Rolle von RAR1 und SGT1B und den damit verbundenen R-Genen wird im einzelnen in Kapitel 4.2.1.3 diskutiert.

#### ***4.2.1.1 Das Zusammenspiel der frühen Signaltransduktionswege in der Antwort auf Elizitierung mit PsojNip, PaNie und flg22***

Dass Signaltransduktionswege wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ströme, ROS und Aktivierung von MAP-Kinasen eine wesentliche Rolle in der Antwort auf biologischen Stress einnehmen, ist verschiedentlich beschrieben worden.

Auch durch flg22 sowie die NLPs PaNie und PsojNip werden diese Wege innerhalb kürzester Zeit aktiviert (s. Abb. 3-16, Abb. 3-17, Abb. 3-20), was zusammenfassend in Abb. 4-1 dargestellt ist. Der dabei ausgelöste *oxidative burst* ist auf die Aktivität von NADPH-Oxidasen zurückzuführen, was mittels DPI sowie den Mutanten *rbobD* und *rbobF* gezeigt werden konnte. In der zeitlichen Abfolge ist der *oxidative burst* dem Anstieg des cytosolischen Kalziumspiegels nachzuordnen, da eine Inhibierung des Kalziumstromes durch den

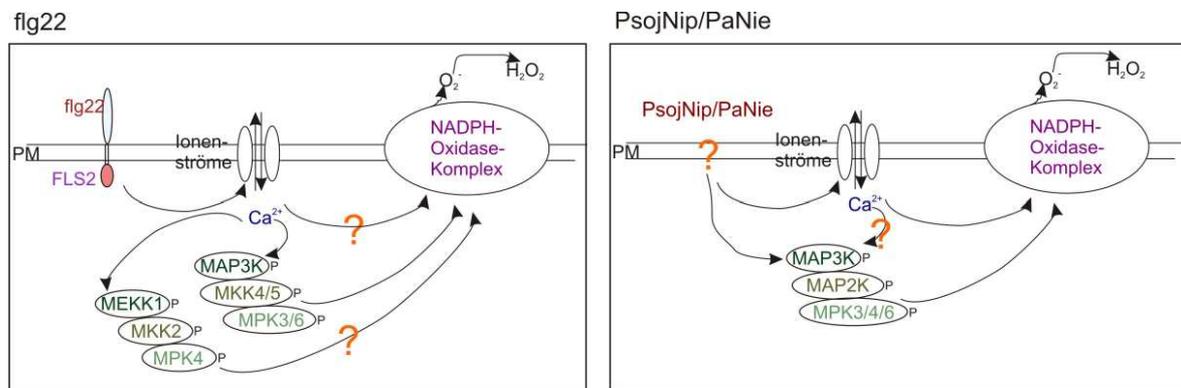
Kalziumkanalinibitor  $\text{LaCl}_3$  die Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  nahezu vollständig unterbindet. Dies ist kongruent zu Beobachtungen von Jabs et al., 1997 und Fellbrich, 2001. Auch in den Mutanten *sid2* und *nabG* sind die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen reduziert, worauf im Kapitel 4.2.1.2 näher eingegangen wird.

Durch PsojNip und PaNie werden die gleichen MAP-Kinasen, nämlich MPK3, MPK4 und MPK6, aktiviert wie durch flg22. Dies konnte zum einen anhand des Bandenmusters der  $\alpha$ -TEY-Immunoblots als auch durch die Verwendung von *mpk3*- und *mpk6*-Pflanzen bestätigt werden. Diese zeitigen MAPK-Phosphorylierungen laufen unabhängig von Signalen wie dem *oxidative burst*, Salicylsäure, Jasmonsäure, Ethylen, Camalexin sowie RAR1 und SGT1B ab. Für späte Zeitpunkte ist eine Aktivierung von z.B. MPK3 durch SA oder MeJA bekannt (Schenk et al., 2000; Tanaka et al., 2006). Dies müsste für die in der Arbeit verwendeten Elizitoren in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Offensichtlich ist jedoch der stimulierende Einfluss der MAP-Kinaseaktivität auf den *oxidative burst*. Bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Messungen in *mpk3* und *mpk6* war die extrazelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration gegenüber Col-0 stark reduziert. Diese sind auch in der Literatur beschrieben. Werden beispielsweise die MAPKK *AtMEK4*, *AtMEK5* oder *NtMEK2* überexprimiert, erfolgt eine Induktion der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bildung (Ren et al., 2002). Im Umkehrschluss führt eine Unterbindung der Kinaseaktivität durch Inhibitoren oder Mutationen zu einem verminderten elizitorinduzierten *oxidative burst* (Sasabe et al., 2000; Asai et al., 2008).

Obwohl geschlussfolgert werden kann, dass die NLPs PsojNip und PaNie analog zu flg22 Kalziumströme und eine starke Bildung von ROS induzieren, zeigen sich deutlich Unterschiede in der Responsivität von *Arabidopsis*-Pflanzen auf die verschiedenen Elizitoren. Während durch flg22 sowohl bei Messungen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration als auch bei Messungen der Kalziumkonzentration mit Blattstreifen *peak*-ähnliche Kurvenverläufe detektiert wurden, stiegen die Konzentrationen nach PsojNip- und PaNie-Behandlung langsamer an und verblieben auf einem Plateau. Dies kann auf den Unterschied gesamtes Protein *vs.* Peptidelizitor zurückgeführt werden und wurde auch von Blume et al., 2000 und Kunze et al., 2004 beobachtet. Elizitierungen von Petersiliezellen mit Pep13 führten da zu einem steilen Anstieg der Kalziumkonzentration, während GP42 und Harpin einen flachen und plateauartigen Anstieg hervorriefen (Blume et al., 2000). Der *oxidative burst* nach Elizitierung mit EF-Tu verlief auch wesentlich flacher als der nach elf18-Behandlung (Kunze et al., 2004). Grundsätzlich sind diese Beobachtungen nicht verwunderlich, da der Peptidelizitor das pure und hochaktive Minimalmotiv eines Elizitors darstellt, wohingegen bei Vollängenproteinen

das Motiv sterisch behindert sein kann oder zusätzliche Wechselwirkungen mit der Pflanzenzelle auftreten können.

Zusammenfassend ergeben sich für die frühen Signalwege unter Einbeziehung der Literatur folgende Modelle (Felix et al., 1999; Gomez-Gomez and Boller, 2000; Nühse et al., 2000; Qutob et al., 2006; Ranf et al., 2008) (Abb. 4-1):



**Abb. 4-1** Das Zusammenspiel der frühen Signalwege nach Elizitierung mit flg22 oder PsojNip und PaNie

Durch Elizitierung mit flg22, PsojNip und PaNie wird eine schnelle Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration, ein *oxidative burst* und eine MAP-Kinaseaktivierung hervorgerufen. Im Fall von flg22 ist eine Abhängigkeit des *oxidative burst* von  $\text{Ca}^{2+}$  nicht veröffentlicht. Auch der Einfluss von der MPK4-Aktivität ist nicht evaluiert. PM=Plasmamembran

#### 4.2.1.2 NLPs und flg22 induzieren unterschiedlich die Akkumulation von Phytohormonen und Phytoalexinen

Angriffe von Pathogenen induzieren die Akkumulation von Phytohormonen und Phytoalexinen und gewährleisten somit eine effektive Abwehr sowie die Unterscheidung zwischen biotrophen und nekrotrophen Pathogenen.

Aus Veröffentlichungen ist bekannt, dass sowohl flg22 als auch NLP-Mitglieder einen Anstieg der Ethylengehalte bewirken (Bailey, 1995; Fellbrich et al., 2002; Liu and Zhang, 2004; Wörle, 2004; Qutob et al., 2006). Messungen der Ethylenkonzentrationen wurden in der vorliegenden Arbeit zwar nicht durchgeführt, doch anhand der verwendeten Mutanten *ein2* und *ein3eil1* kann für alle drei Elizitoren geschlussfolgert werden, dass Ethylen keinen Einfluss auf zeitige Signale wie *oxidative burst* oder MAP-Kinaseaktivierung hat. Demnach wirkt es unabhängig oder unterhalb dieser Komponenten. Für flg22 kann bestätigend die Arbeit von Liu et al. herangezogen werden, nach der die Ethylenbildung von MPK6 abhängig ist, also nach der MAP-Kinaseaktivierung stattfindet (Liu and Zhang, 2004).

Sowohl M. Wörle als auch Qutob et al. beobachteten nach Elizitierung von *Arabidopsis*-Zellkulturen mit PaNie oder NPP1 eine starke Erhöhung der SA-Konzentration sowie der Transkriptlevel von *PAL1* und *ICS1* (Wörle, 2004; Qutob et al., 2006). Auch ist eine Aktivierung des SA-responsiven *PR1*-Gens durch NPP1 beschrieben worden (Fellbrich et al., 2002). Diese Ergebnisse weisen auf eine Induktion der SA-Biosynthese als Antwort auf NLP-Elizitierung hin. Im Kontrast dazu stehen die Beobachtungen von Bae et al., laut denen nach Elizitierung mit Nep1 (*Fusarium oxysporum*) nur eine schwache Transkriptakkumulation von SA-abhängigen Genen beobachtet wurde (Bae et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde in Blättern von PsojNip- oder PaNie-behandelten Wildtyppflanzen oder anderen Genotypen nach 24 h nur ein schwacher Anstieg der SA-Konzentration gemessen (Abb. 3-22). Diese Anstiege waren teilweise statistisch signifikant, erreichten jedoch nie die zweifache SA-Menge verglichen zum Basislevel. Reagieren Pflanzen auf Pathogenbefall jedoch mit SA-Akkumulation, steigen die Konzentrationen wesentlich stärker an (Heck et al., 2003; Wörle, 2004). Aus diesem Grund wird in dieser Arbeit die schwache Zunahme nicht als Induktion gewertet.

Die Analysen von Qutob et al. und Wörle wurden nach 1 h und 4 h bzw. nach 9 h durchgeführt (Wörle, 2004; Bae et al., 2006; Qutob et al., 2006). Doch in dieser Arbeit konnte in Col-0 auch nach 4 h oder 8 h kein Anstieg der SA-Konzentration gemessen werden.

Somit stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit Bae et al. aber nicht mit Qutob et al. oder M. Wörle überein.

Die Diskrepanz der hier vorgestellten Ergebnisse zu denen von M. Wörle ist erstaunlich, da in beiden Arbeiten mit PaNie gearbeitet wurde. Allerdings verwendete M. Wörle *Arabidopsis*-Zellkulturen. Obwohl Zellkulturen aus Pflanzen etabliert werden, gibt es in der Responsivität starke Unterschiede zu Pflanzen (Monache et al., 1995; Zulak et al., 2009). Dies kann sowohl auf die nichtdifferenzierten Zellen als auch auf fehlende Pflanzenorgane zurückgeführt werden (Samanani et al., 2006). Da in der vorliegenden Arbeit der Blick auf die Bestimmung der SA-Gehalte der verschiedenen Genotypen gerichtet war, wurde die SA-Konzentration in Blättern, nicht aber in Zellkulturen bestimmt.

In Abb. 3-22 wird deutlich, dass schon die SA-Basislevel in *sid2* und *nabG* im Vergleich zu Col-0 vermindert war. Dies könnte den geringen *oxidative burst* zu frühen Zeitpunkten in diesen Genotypen erklären und stimmt mit dem in der Literatur beschriebenen stimulierenden Effekt der SA auf die ROS-Produktion überein (Chen et al., 1993; Rao et al., 1997).

Ein auffälliges Verhalten zeigte die Mutante *ein3eil1*, die im nichtelizitierten Zustand signifikant erhöhte SA- und SAG-Gehalte aufwies. Allerdings erhöhten sich die SA-Konzentrationen

nach Elizitierung mit PsojNip und PaNie nicht wesentlich. Übereinstimmend mit Heck et al. wies die Mutante *ein2* keine erhöhten SA-Level auf (Heck et al., 2003).

Wird durch den Verlust der ethylenregulierten Transkriptionsfaktoren *ein3* und *eil1* der Grundgehalt an SA erhöht, deutet dies auf eine Reprimierung der SA-Akkumulation durch EIN3- und EIL1-abhängige Gene hin. Eins dieser Gene ist *ERF1*, was wiederum einen Transkriptionsfaktor für ethylenregulierte Gene darstellt (Roman et al., 1995; Chao et al., 1997; Solano et al., 1998). Dieses Ergebnis stimmt mit den veröffentlichten Beobachtungen überein, dass SA und Ethylen bei der Antwort auf Pathogene vielfach antagonistisch wirken. Auch JA und SA sind meist Antagonisten. Da jedoch in der JA-Biosynthesemutante *dde2* keine verstärkte SA-Akkumulation beobachtet wurde, kann ein direkter inhibitorischer Effekt von JA ausgeschlossen werden.

Die Elizitierung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit flg22 rief einen leichten Anstieg der SA-Konzentration hervor, wobei allerdings der Anstieg freier SA geringer ausfiel als der Anstieg glykosylierter SA (Abb. 3-22). Dieser Effekt ist aus Veröffentlichungen bekannt (Nawrath and Metraux, 1999). Auch Arbeiten von Tsuda et al. zeigen eine Akkumulation freier SA nach flg22-Behandlung. In der Publikation wurden allerdings 10 µM flg22 eingesetzt, weshalb die Induktion stärker war als in der vorliegenden Arbeit (Tsuda et al., 2008). Weiterhin zeigten Gomez-Gomez et al. die Aktivierung des SA-abhängigen *PR1*-Gens durch flg22 (Gomez-Gomez et al., 1999). Sowohl in der vorliegenden Arbeit als auch bei Tsuda et al. ist diese SA-Akkumulation abhängig von SID2. In dieser Arbeit wurde auch eine Abhängigkeit der Akkumulation von PAD4 nachgewiesen. Das lipaseähnliche Protein PAD4 fungiert unterhalb der SA-Biosynthese unter anderem bei der Ausprägung eines *amplification loop* (Jirage et al., 1999). Untersuchungen von Zhou et al. ergaben eine hohe Relevanz von PAD4 für die Abwehr von Psm ES4326, nicht aber für die R-Gen-vermittelte Resistenz von Psm ES4326 *avrRpt2* (Zhou et al., 1998). Da flg22 keine R-Gen-vermittelte Resistenz induziert, könnte eine Notwendigkeit von PAD4 wahrscheinlich sein.

Wie schon bei der Salicylsäure existieren konträre Daten über die Akkumulation von Jasmonaten nach NLP-Behandlung. Qutob et al. konnten keine transkriptionelle Aktivierung von JA-Biosynthese- oder JA-responsiven Genen nachweisen. Im Gegensatz dazu beobachteten Bae et al. wiederum eine starke Akkumulation von Transkripten dieser Gene (Bae et al., 2006; Qutob et al., 2006). Auch in diesem Fall stimmen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit Bae et al. überein.

Es konnte gezeigt werden, dass PsojNip und PaNie einen massiven Anstieg der JA und OPDA-Gehalte induzieren, wobei OPDA stärker akkumulierte als JA (Abb. 3-25). Auch in Messungen von Mur et al. liegen die OPDA-Gehalte wesentlich über den JA-Gehalten (Mur et al., 2006). Erhöhte JA- und OPDA-Gehalte durch Verwundung bei der Infiltration wurden nach 24 h nicht mehr detektiert. Da JA und SA oft antagonistisch und Ethylen und JA synergistisch agieren (Penninckx et al., 1998), war eine Erhöhung der JA-Konzentration nach PsojNip- und PaNie-Elizitierung nicht überraschend.

Abgesehen von der JA-Biosynthesemutante *dde2* (Park et al., 2002) erfolgte die Induktion der JA- und OPDA-Akkumulation durch PsojNip oder PaNie in allen Genotypen in ähnlichem Maße. Somit kann geschlossen werden, dass die Akkumulation von Jasmonaten unabhängig von den Signaltransduktionswegen wie ROS, MAP-Kinase-Aktivierung und intrazellulärer Anstieg der  $Ca^{2+}$ -Konzentration aber auch von Ethylen und Calmodulin verläuft. Da keine Doppelmутanten verwendet wurden, kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass aufgrund von funktionellen Redundanzen, beispielsweise von MPK3 und MPK6 oder RBOHD und RBOHF, der Effekt der Mutation überlagert wird.

Die Mutante *ein3eil1* verhielt sich bezüglich der JA- und OPDA-Gehalte nicht auffällig.

In der Literatur gibt es nur wenige Hinweise auf eine Beeinflussung der JA-Akkumulation durch frühe Stresssignale. In Tomate führt ein Verlust von SIPK, dem Orthologen von *AtMPK6*, zur Reduktion der systeminvermittelten JA-Akkumulation (Liu and Zhang, 2004; Kandath et al., 2007), was für eine effektive Antwort auf Verwundung notwendig ist (Wasternack et al., 2006). Konträr dazu beobachteten Menke et al. keine Reduktion der JA- und ethylenabhängigen ISR-Ausprägung in *mpk6*-Mutanten (Pieterse et al., 1998; Menke et al., 2004). Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann geschlossen werden, dass MPK6 zwar durch PsojNip- oder PaNie-Elizitierung aktiviert wird, aber die JA-Akkumulation nicht beeinflusst, was mit den Beobachtungen von Menke et al. übereinstimmt.

Heck et al. beobachteten in verschiedenen *Arabidopsis*-Genotypen eine unspezifische und starke JA-Akkumulation 48 h nach *Pst*-Infektion. Es wurde vermutet, dass diese Zunahme des JA-Gehaltes nicht auf Abwehr, sondern auf die durch *Pst* hervorgerufene Zellzerstörung zurückzuführen ist. (Heck et al., 2003). Möglicherweise lässt sich auch im Fall von PsojNip und PaNie die JA-Akkumulation auf Zellzerstörung zurückführen.

Auch bezüglich der JA-Konzentrationen reagieren *Arabidopsis*-Pflanzen auf Elizitierung mit flg22 anders als auf PsojNip oder PaNie. So ist flg22 nicht in der Lage, einen Anstieg der JA- und OPDA-Gehalte zu induzieren. Es wurden auch keine erhöhten JA- und OPDA-Level in *pad4*, *sid2* und *nabG* detektiert, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass SA die JA-

Akkumulation nicht hemmt. Auch Ethylen wirkt nicht reprimierend auf die JA-Akkumulation, was anhand der Mutanten *ein2* und *ein3eil1* festgestellt werden konnte. Grundsätzlich kann die Resistenz gegen Nichtwirtspathogene JA-abhängig verlaufen. (Nürnberger et al., 2005). Für Peptidelizitoren konnte bisher jedoch nur für Pep13 neben der Induktion des SA-Anstiegs auch eine Erhöhung der JA-Konzentrationen in Kartoffel nachgewiesen werden (Halim et al., 2004).

Wie bisher verschiedentlich publiziert wurde, induzieren NLPs die Phytoalexinakkumulation in starkem Maße (Fellbrich et al., 2002; Qutob et al., 2006). Auch PsojNip und PaNie riefen in *Arabidopsis*-Wildtyppflanzen und Petersilie einen deutlichen Anstieg der Phytoalexingehalte hervor. Auf *flg22* reagierten *Arabidopsis*-Pflanzen nicht mit einem Anstieg der Camalexinkonzentration, während in Petersiliezellen durch Pep13-Behandlung eine extreme Zunahme der Furanocoumarinkonzentration erfolgte (Abb. 3-28). Auffällig war die signifikant geringere Konzentration der Phytoalexine sowohl in Col-0 als auch in Petersilie nach PaNie-Behandlung. Die Zelltodausprägung nach PaNie-Elizitierung verläuft stärker als durch PsojNip. Ob den Zellen dadurch weniger Zeit bleibt, hohe Mengen Phytoalexin zu bilden, ist spekulativ.

Wie die Analysen der verschiedenen Genotypen ergaben, ist die Camalexinakkumulation unabhängig vom *oxidative burst*, von MAP-Kinase-Aktivierungen, Ethylen und Jasmonsäure. Wie auch schon bei den Messungen von JA bleibt anzumerken, dass aufgrund von Redundanzen keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Reduziert sind die Camalexin-Gehalte in der Biosynthesemutante *pad3* und nach PsojNip-Elizitierung in der GSH1-Mutante *pad2*.

Zusätzlich wurden in *pad4* und *nabG* nur sehr geringe Camalexinkonzentrationen gemessen, was auch für die Infektion von *Arabidopsis* mit *PsmES4326* bekannt ist (Zhao and Last, 1996; Zhou et al., 1998). Dies belegt den positiven Einfluss von SA auf die Camalexinakkumulation. Erstaunlicher Weise hat aber ein Verlust der Isochorismatsynthase keine Reduktion der Camalexingehalte nach PsojNip- und PaNie-Behandlung zur Folge. Diese Beobachtung deckt sich mit Veröffentlichungen von Nawrath et al., 1999 und Heck et al. 2003, nach denen in *sid2* sowohl nach Behandlung mit virulentem *Pst*DC3000 als auch avirulentem *Pst/avrRpt2* wildtypähnliche Camalexingehalte bestimmt wurden.

Obwohl ROS-generierende Chemikalien in *Arabidopsis* die Camalexinproduktion induzieren können (Zhao et al., 1998) und DPI in Petersilie die Phytoalexinproduktion deutlich reduziert

(Jabs et al., 1997), war in dieser Arbeit der Anstieg der Camalexinkonzentration nach PsojNip- und PaNie-Elizitierung nicht von der RBOHD- und RBOHF-Aktivität beeinflusst.

Offenbar unterdrückt Camalexin die ROS-Produktion, da die gebildeten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Mengen nach PsojNip-Behandlung in der Camalexinbiosynthesemutante *pad3* deutlich über dem Wildtyp lagen. Da in flg22-behandelten *pad3*-Pflanzen diese Verstärkung des *oxidative burst* nicht beobachtet wurde, kann der Effekt auf Camalexin zurückgeführt werden.

Worin liegt das unterschiedliche Ergebnis bei den Camalexinmessungen zwischen flg22 und PsojNip bzw. PaNie begründet? Diese Frage stellt sich zudem durch die Beobachtung, dass SA für eine Camalexinakkumulation zwar nicht hinreichend so doch notwendig ist. Offenbar ist das SA-Basislevel und nicht die Erhöhung der SA-Konzentration für die Camalexinakkumulation durch PsojNip und PaNie wichtig. Blume et al. stellten für *Petersilie* einen Zusammenhang zwischen der Kalziumsignatur und der Phytoalexinproduktion her. Nur Elizitoren, durch die ein plateauartiger Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration ausgelöst wird, sind in der Lage, die Phytoalexinproduktion zu stimulieren (Blume et al., 2000). Dieses Plateau in der Kalziumsignatur tritt auch nach PsojNip- und PaNie-Behandlung auf, jedoch nicht nach flg22-Elizitierung. Dies wäre somit eine mögliche Erklärung für den ausbleibenden Anstieg der Camalexinkonzentration nach flg22-Elizitierung.

#### ***4.2.1.3 Die Rolle von R-Gen-beeinflussenden Faktoren auf die flg22-induzierte Antwort ist unterschiedlich zur Antwort auf PsojNip und PaNie***

Resistenzen, die mit Zelltod einhergehen, werden von avr-R-Protein-Interaktionen vermittelt. Welche Rolle Proteine, die die R-Gen-Resistenz beeinflussen, in Bezug auf die PsojNip- und PaNie-induzierte Antwort haben, ist nicht genauer untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Beeinflussung des Zelltodes sowie anderer Reaktionen in der Antwort auf PsojNip und PaNie durch SGT1B, RAR1 und PAD4 ausgeschlossen werden. Auch in der Zelltodausprägung nach NPP1-Elizitierung sind diese Proteine und zudem NDR1 nicht involviert (Qutob et al., 2006). Die Funktion von NDR1, das die Aktivität von CC-NB-LRR-Proteinen reguliert, und EDS1, verantwortlich für TIR-NB-LRR-Proteine (Century et al., 1995; Parker et al., 1996), wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Da allerdings RAR1 neben CC-NB-LRR- auch TIR-NB-LRR-Proteine beeinflusst (Muskett et al., 2002), kann ein dramatischer Effekt von EDS1 und NDR1 auf die PsojNip- und PaNie-induzierte Respons ausgeschlossen werden.

Hervorzuheben ist die Reaktion von *rar1* und *sgt1b* auf flg22. Während Ler-0 nur mit einem leichten Anstieg der SA- und SAG-Konzentration reagierte, akkumulierten *rar1* und *sgt1b*

ungefähr die dreifache Menge (Abb. 3-23). Dies bedeutet eine Negativregulation der SA-Akkumulation durch RAR1 und SGT1B und liefert ein weiteres Beispiel der PTI-Reprimierung durch RAR1. So ist RAR1 für die AvrB-vermittelte Suppression der Kalloseedeposition nach Elizitierung von *Arabidopsis* mit flg22 verantwortlich (Kim et al., 2005; de Torres et al., 2006; Shang et al., 2006). Da die Kalloseeinlagerung abhängig von SA ist (Donofrio and Delaney, 2001), könnten die hier erhaltenen Daten mit den Ergebnissen von Shang et al. verbunden werden. Auf andere Signalwege in Antwort auf flg22 nehmen SGT1B und RAR1 offenbar keinen Einfluss. Obwohl reduzierte SA-Gehalte wie in *sid2* oder *nabG* mit einem verminderten *oxidative burst* einhergehen, führten erhöhte SA-Konzentrationen in *rar1* oder *sgt1b* nicht zu verstärkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Akkumulation.

#### **4.2.1.4 Der Zelltod, induziert durch PsojNip und PaNie, ist unabhängig von bekannten Regulationsmechanismen**

In vielen Veröffentlichungen wird eine Ausprägung des Zelltodes durch Elizitierung mit Proteinen berichtet. Dies kann durch Infiltration verschiedener Proteine und Toxine, aber auch durch transiente Expression korrespondierender *avr*- und *R*-Gene in Pflanzen geschehen (Van der Hoorn et al., 2000). Eine Behandlung von *A. thaliana* mit Harpin, einem hitzestabilen Protein der *HRP*-Gengruppe phytopathogener Bakterien, löst HR aus (He et al., 1993; Lee et al., 2001). So kommt es 6 Stunden nach Besprühen mit 15 µg/ml Harpin zu einer deutlichen Zunahme toter Zellen und mit einem Maximum nach 16 Stunden (Peng et al., 2003). Werden 100 nM rekombinantes INF1, was HR in Tabak induziert, infiltriert, kann nach 24 Stunden makroskopisch beginnender Zelltod detektiert werden (Kamoun et al., 1997).

Im Vergleich dazu verlief die Induktion des Zelltodes durch PsojNip und PaNie wesentlich schneller. Mit den minimal notwendigen Proteinkonzentrationen (0,5 µM = 13 µg/ml PsojNip, 0,1 µM = 2,5 µg/ml PaNie) war schon nach 2 Stunden mithilfe von Trypanblaufärbung makroskopischer Zelltod sichtbar. Beim Einsatz eines Überschusses (2 µM, entspricht ca. 50 µg/ml) trat makroskopisch detektierbarer Zelltod schon nach 15 min auf. Diese schnelle Respons wurde auch für NPP1 sowie NEP1 aus *Botrytis cinerea* beschrieben (Bae et al., 2006; Kufner, 2008). Der ausgelöste Zelltod ist unabhängig von allen bisher bekannten Regulativen für eine HR (SGT1B, RAR1, SA, ROS, Ca<sup>2+</sup>) (Abb. 3-14, Abb. 3-15). Zusätzlich wurde die Akkumulation eines Schlüsselmoleküls für die HR, Salicylsäure, durch PsojNip oder PaNie nicht induziert. Gebildet wurde jedoch JA, was im Fall der Harpin-induzierten HR inhibitorisch wirken kann (Andi et al., 2001). Auf Grund dieser Argumente ist die Reaktion auf PsojNip und PaNie nicht als hypersensitive Reaktion einzuordnen. Für eine

abschließende Beurteilung sollten aber die Transkriptionslevel der bekannten HR-Markergene *HIN1* oder *AtMYB30* bestimmt werden (Gopalan et al., 1996; Daniel et al., 1999).

Entgegen den Beobachtungen von Qutob et al. mit NPP1 kann der Zelltod durch PsojNip und PaNie nicht durch den Kalziumkanalinhibitor  $\text{LaCl}_3$  verhindert werden. Es konnte durch Strukturanalysen von NPP1 eine Bindestelle für zweiwertige Kationen, vermutlich Kalzium, identifiziert werden (Aminosäuren D93, H101, D104, E106), die essentiell für die zelltodinduzierende Aktivität des Proteins ist (Küfner, 2008). Diese Aminosäuren sind auch in PsojNip und PaNie konserviert. Somit können diese Proteine vermutlich Kalzium binden, was aber nicht auf die Notwendigkeit von Kalziumkanälen für den Zelltod hinweist.

Da jedoch der *oxidative burst* vom Kalziumeinstrom durch Kanäle abhängig ist (Abb. 3-16), könnte wie in Kap. 4.1.4 gemutmaßt werden, dass die Zelltodaktivität und die Abwehrreaktionen über verschiedene Mechanismen ausgelöst werden.

### 4.3 PsojNip und PaNie: PAMPs, Effektoren oder Toxine?

In den vorangegangenen Kapiteln wurde erörtert, dass PsojNip und PaNie in *A. thaliana* einen Zelltod hervorrufen, der unabhängig von der Aktivität der Pflanzenzelle ist. Zusätzlich werden jedoch verschiedene Abwehrsignale aktiviert. Sind diese Proteine nun den Elizitoren, speziell PAMPs, Effektoren oder Toxinen zuzuordnen?

PAMPs sind definiert als hochkonservierte und für das Überleben der Pathogene essentielle Moleküle, die über membranständige Rezeptoren von der Pflanzenzelle erkannt werden (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006; Miya et al., 2007). Für diese Erkennung ist ein Minimalmotiv bestehend aus wenigen Aminosäuren ausreichend (Nürnberger et al., 1994; Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004). Bei der Infektion der Sojabohne mit *P. sojae* wird die Expression von NIP dagegen erst bei der Umstellung des Pathogens von biotropher zu nekrotropher Lebensweise aktiviert (Qutob et al., 2002) Das bedeutet, dass dieses Protein nicht grundsätzlich für das Leben von *P. sojae* notwendig ist. Weiterhin konnte kein Minimalmotiv für NPP1 gefunden werden (Romanski, 2001). Auch ein Rezeptor für die NLP-Erkennung ist bisher nicht bekannt und seine Existenz wird mittlerweile ausgeschlossen (Küfner, 2008). Zusätzlich ist bisher nur für Pep13 in Kartoffel eine zelltodinduzierende Aktivität beschrieben (Halim et al., 2004). Im Gegenzug dazu induzieren die NLPs PsojNip und PaNie neben Abwehrantworten, die denen der PTI sehr ähneln, einen schnellen und aggressiven Zelltod. Durch diese Charakterisierungen der NLPs kann eine Zuordnung zu PAMPs ausgeschlossen werden.

Gehen Abwehrmechanismen mit Zelltod (HR) einher, sind R-Genprodukte der Pflanze involviert. Dadurch ist der Zelltod eine sehr spezifische Antwort auf spezielle Pathogene. NLPs wirken dagegen bei Dikotyledonen unselektiv. Zusätzlich läuft der PsojNip- und PaNie-induzierte Zelltod, wie bereits in Kap. 4.2.1.4. erörtert, sehr schnell und unabhängig von pflanzlichen Prozessen ab. Würden PsojNip und PaNie zu den Effektoren (Avr-Proteine) gehören, wäre ein korrespondierendes Protein in der Pflanze notwendig, was über Mutagenese identifiziert werden könnte. Da Mutagenesen durch die Arbeitsgruppe um Nürnberger zu keiner NLP-insensitiven Mutante führten, ist eine Existenz eines solchen Proteins unwahrscheinlich (Küfner, 2008). Es ist somit auszuschließen, dass NLPs wie PsojNip und PaNie zu PAMPs oder pathogenen Effektoren zählen und somit eine Form der Resistenz induzieren.

Wahrscheinlicher ist eine toxische Aktivität. Toxine zerstören direkt die Pflanzenzellen und ermöglichen so Krankheits- und Symptomentwicklung. Als Toxine werden Moleküle von Phytopathogenen bezeichnet, wenn

- I) auch das gereinigte Toxin die Krankheitssymptome hervorruft,
- II) eine direkte Korrelation zwischen Toxinkonzentration und Pathogenizität besteht,
- III) das Toxin während der Wachstumsphase des Pathogens *in planta* produziert wird,
- IV) ein Verlust des Toxins zu reduzierter Virulenz führt (Bender et al., 1999).

Alle diese Kriterien sind für die NLP-Familie zutreffend und wurden in der Literatur (Veit et al., 2001; Fellbrich et al., 2002; Qutob et al., 2002; Mattinen et al., 2004; Qutob et al., 2006) und der vorliegenden Arbeit beschrieben.

Toxine werden in unspezifische und wirtsspezifische (*host-specific toxins*, HST) Toxine eingeteilt, wobei die Reaktion auf HSTs von einem speziellen Gen kontrolliert wird. Für die volle Wirksamkeit des T-Toxins aus *Bipolaris maydis* in Mais beispielsweise ist URF13 notwendig. (Dewey et al., 1988; Rhoads et al., 1995). Während die bisher bekannten proteinogenen Toxine wie PtrToxA wirtsspezifisch fungieren (Ballance et al., 1989), lösen NLPs in Dikotyledonen unspezifisch Zelltod aus (Qutob et al., 2006). Demnach gehören sie nicht in die Gruppe der HSTs.

Dass Phytotoxine neben Zelltod auch Komponenten der Abwehr initiieren, ist hinlänglich bekannt. So wird durch die nichtspezifischen Toxine Trichothecen oder FB1 aus *Fusarium* die

Kallosedeposition, ein *oxidative burst*, Expression von PR-Genen, Akkumulation von Camalexin und Salicylsäure induziert (Stone et al., 2000; Nishiuchi et al., 2006). Der FB1-induzierte Zelltod ist abhängig von aktivem Zellmetabolismus, JA, SA und Ethylen (Asai et al., 2000). Auch NLPs wie NPP1, PsojNip und PaNie induzieren Abwehrmechanismen. Aber im Gegensatz zu FB1 ist der NLP-induzierte Zelltod nicht über Phytohormone reguliert. Die Notwendigkeit eines aktiven Zellmetabolismus müsste für PsojNip und PaNie durch Verwendung von Inhibitoren wie  $\alpha$ -Amanitin (DNA-Transkription) und Cycloheximid (Proteinbiosynthese) weiter untersucht werden.

Durch PsojNip und PaNie werden frühe Signale wie Anstieg von zytosolischem  $Ca^{2+}$ , *oxidative burst* oder MAPK-Phosphorylierung aktiviert. Doch diese Antworten könnten auch durch Zellerstörung hervorgerufen werden. Im Zusammenhang mit der HR wird beispielsweise spekuliert, dass ROS einerseits eine zelltodinduzierende Wirkung haben, andererseits durch den Zelltod freigesetzt werden (Levine et al., 1994; Shapiro and Zhang, 2001).

Die Wirkungsweisen von Toxinen sind vielfältig. FB1 beispielsweise ist ein Sphinganalogen und inhibiert somit die Sphingolipidbiosynthese (Wang et al., 1991; Nelson et al., 1993). Trichothecene dagegen wirken als Translationsinhibitoren (Nishiuchi et al., 2006). Für das Toxin Cyt1A aus *Bacillus thuringiensis*, das *in vivo* toxisch für Insektenzellen ist, ist eine direkte Toxin-Lipid-Interaktion beschrieben worden, wodurch die Zellmembran zerstört wird (Butko, 2003).

Mittlerweile konnte ein Modell für den Mechanismus des Zelltodes durch NLPs am Beispiel von NPP1 aufgestellt werden. Demnach bindet NPP1 an nicht proteinogene Strukturen der Zellmembran, wodurch die Membran destabilisiert und die Zelle innerhalb von 10 min lysiert wird (Küfner, 2008). Membran- und Chloroplastenschädigungen sowie eine massive Freisetzung von Metaboliten und Ionen wurden auch für NEP1 beschrieben (Bae et al., 2006). Dadurch lässt sich endgültig der Zelltod als toxischer Effekt einordnen. Da auch für NEP1 und NEP2 aus *B. cinerea* eine Bindung an die Zellmembran und damit einhergehend eine schnelle Zellerstörung beschrieben wurde (Schouten et al., 2008), könnte die postulierte Wirkungsweise für die gesamte NLP-Familie gelten. Wie allerdings die Membrandestabilisierung genau abläuft ist noch unklar. Möglich wäre eine Porenbildung oder die Wirkung von detergenzähnlichen Eigenschaften.

Es stellt sich nun die Frage, wodurch vor allem die Akkumulation von JA und Camalexin induziert wird.

Aus tierischen Systemen sind sogenannte *damage associated molecular pattern* (DAMP) (auch als Alarmin bezeichnet) bekannt, wodurch Zellen auf nichtphysiologischen Zelltod, Stress, Hitze, Chemikalien und Zerstörung reagieren können (Bianchi, 2007). DAMPs sind endogene, meist zytosolische Strukturen, die von beschädigten Zellen freigesetzt, von Nachbarzellen registriert werden und somit eine Immunreaktion induzieren (Kono et al., 2008). Neben Hitzeschockproteinen, Interleukinen oder Harnsäure sind *High-mobility group box protein1s* (HMGB1) die bekanntesten DAMPs (Bianchi, 2007; Piesetsky et al., 2008).

Auch Pflanzen reagieren auf endogene Signale. So können Zellwandbausteine, die durch hydrolytische Enzyme von Phytopathogenen freigesetzt werden, als endogene Elizitoren wirken (Ebel and Scheel, 1997). Auch durch Stress und Verwundung freigesetztes ATP aktiviert Abwehrmechanismen wie z.B. die Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration, Aktivierung von AtMEKK1 und AtMPK3, *oxidative burst* und die Ethylensynthese (Jeter et al., 2004; Song et al., 2006).

Eine Verwundung von Pflanzen führt lokal und systemisch zu einer starken JA-Biosynthese, (Farmer and Ryan, 1992; Pearce et al., 2003; Stratmann, 2003). Auch in tierischen Zellen sind Prostaglandine, die sowohl in der Struktur als auch in der Biosynthese den Jasmonaten sehr ähneln (Hamberg et al., 1992), bei der Antwort auf Verwundung involviert (Kaneko et al., 1995; Savla et al., 2001). In Tomate löst eine Verwundung die Expression von Prosystemin aus, was zum Systemin prozessiert wird. Lokal bindet Systemin an den plasmamembranlokalisierten Rezeptor SR160, wodurch  $\alpha$ -Linolensäure, Ausgangsstoff der JA-Biosynthese, freigesetzt wird. Dadurch werden verstärkt Jasmonate gebildet (Farmer and Ryan, 1992; Bergey et al., 1996; Jacinto et al., 1997; Scheer et al., 2002). Auch extrazellulär existieren Bindestellen für Systemin, weshalb eine Freisetzung von  $\alpha$ -Linolensäure und damit eine JA-Bildung in benachbarten Zellen postuliert werden kann. Somit kann durch Verwundung freigesetztes Systemin die systemische Wundantwort verstärken (Neumerkel, 2003; Wasternack et al., 2006).

Die durch PsojNip und PaNie hervorgerufene starke Akkumulation von JA und vermutlich Ethylen (O'Donnell et al., 1996; Orozco-Cardenas et al., 2001), legt eine pflanzliche Reaktion auf die Proteine analog zur Verwundung nahe. Da Systemin als Wundsignal in *Arabidopsis* kaum eine Rolle spielt, ist unklar, welches endogene Signal als DAMP wirken könnte. Neben ATP ist die Freisetzung von Oligogalakturoniden ( $((C_6H_{11}N_{10})_n$ ) aus der Zellwand durch Verwundung zu nennen (Benhamou et al., 1990; Bergey et al., 1999). Allerdings kann die

Antwort auf NPP1 auch in Protoplasten hervorgerufen werden, weshalb eine Beteiligung von Zellwandstrukturen als Signal ausgeschlossen ist (Fellbrich et al., 2002). Zudem wirken in *A. thaliana* OGAs in der Wundantwort antagonistisch zu JA (Rojo et al., 1999).

Neuere Untersuchungen belegen eine Beteiligung von Phospholipiden an der Wundantwort in *A. thaliana* (Mosblech et al., 2008). Änderungen im Phospholipidhaushalt als Antwort auf verschiedene Stressoren sind mehrfach beschrieben worden und sind bei Testerink et al. zusammengefasst (Testerink et al., 2005). Mosblech et al. konnten nachweisen, dass durch Verwundung Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP<sub>3</sub>) gebildet wird. Diese Bildung ist allerdings abhängig von JA. Wesentlich interessanter ist die Verringerung der Gehalte von Strukturlipiden wie Phosphatidylcholin (PC) und Monogalactosyldiacylglycerol (MGDG), was auf eine generelle Veränderung der Lipidzusammensetzung hinweist (Mosblech et al., 2008).

Das entstandene PC kann von der Phospholipase D (PLD) zu Phosphatidylsäure (PA) und Cholin abgebaut werden (Pappan et al., 1998). Aktiviert wird PLD über sowohl biotische als auch abiotische Stresse (Testerink and Munnik, 2005), beispielsweise Membranzerstörung (Qin et al., 1997; Pappan et al., 1998; Zheng et al., 2000). So erfolgt die Aktivierung von PLD nach Verwundung in kürzester Zeit. Diese Aktivierung kann direkt an der JA-Bildung sowie der Aktivierung von NADPH-Oxiasen beteiligt sein (Wang et al., 2000; Sang et al., 2001).

Durch PsojNip und PaNie wird eine starke JA-Akkumulation sowie ein NADPH-Oxidase-abhängiger *oxidative burst* induziert. Somit könnte die Beteiligung von Phospholipiden die Verbindung zwischen der beschriebenen Zellzerstörung und den induzierten Abwehrantworten bilden. Diese Annahme ist allerdings nur hypothetisch. Zur Überprüfung müsste ein Phospholipid-*profiling* durchgeführt sowie JA-Gehalte in PLC und PLD-Mutanten bestimmt werden. Da aber PLDs zu einer Multigenfamilie mit 12 Mitgliedern gehören (Testerink and Munnik, 2005), kann es zu Redundanzen kommen.

#### 4.4 Flg22 und die NLPs PsojNip und PaNie induzieren verschiedene Reaktionen in *Arabidopsis thaliana*

In dieser Arbeit wurden die durch PsojNip und PaNie in *A. thaliana* induzierten Abwehrreaktionen untersucht und mit den flg22-abhängigen verglichen. Alle drei Elizitoren induzieren in *A. thaliana* die für PTI typischen frühen Signalwege wie Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, *oxidative burst* und MAPK-Aktivierung. Dabei sind die NADPH-Oxidasen RBOHD und RBOHF stark an der Bildung des *oxidative burst* beteiligt. Eine positive Regulation des *oxidative burst* erfolgt durch Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6. Für PsojNip und PaNie konnte zudem gezeigt werden, dass der *oxidative burst* abhängig vom Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration ist. Dies wurde für flg22 nicht untersucht, könnte allerdings vermutet werden.

Die Aktivierung von Phytohormon- oder Phytoalexinakkumulation sowie Zelltod laufen jedoch vollständig verschieden ab. So wird durch flg22 ein Anstieg der Salicylsäurekonzentration induziert, der durch RAR1 und SGT1B gehemmt wird. Eine Akkumulation von Camalexin und Jasmonaten erfolgt nicht. Auch ein Zelltod wird durch flg22 nicht ausgelöst (Abb. 4-2 A).

Im Gegensatz dazu wird durch PsojNip und PaNie sowohl ein starker Anstieg der Jasmonsäure- und Camalexinkonzentration als auch ein schneller und Zelltod, vermutlich durch Zellzerstörung, ausgelöst, jedoch keine Zunahme der SA-Gehalte (Abb. 4-2 B).

Somit aktivieren flg22 und die NLPs PsojNip und PaNie in *A. thaliana* vollständig unterschiedliche Mechanismen, was auf der nächsten Seite in Abb. 4-2 unter Einbeziehung der gängigen Literatur zusammengefasst ist.

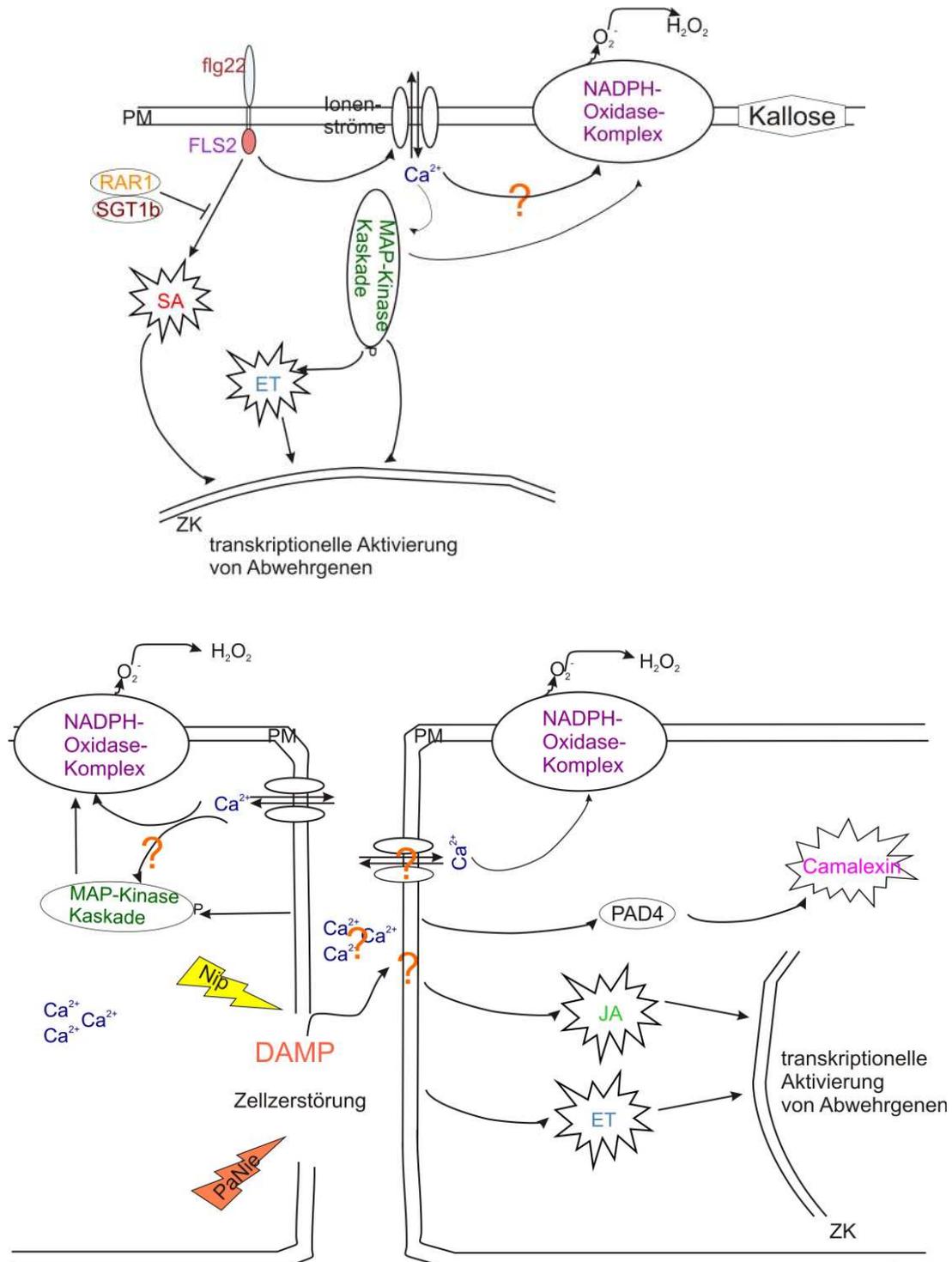


Abb. 4-2 Modell der Antworten von *A. thaliana* auf Elizitierung mit flg22, PsojNip und PaNip

(A) Durch Elizitierung mit flg22 werden ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, *oxidative burst*, MAP-Kinaseaktivierung, Kallosedeposition und Ethylenakkumulation ausgelöst. RAR1 und SGT1B reprimieren die Akkumulation von Salicylsäure.

(B) Durch Behandlung mit PsojNip oder PaNip kommt es zur Destabilisierung der Membran und damit zur Zellzerstörung, durch die vermutlich DAMPs freigesetzt werden. Weiterhin werden ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, ein *oxidative burst*, die Aktivierung von MAP-Kinasen, sowie die Akkumulation von JA, ET und Camalexin hervorgerufen. PM=Plasmamembran, ZK=Zellkern, ET=Ethylen, JA=Jasmonsäure, SA=Salicylsäure

## 5 Zusammenfassung

NLPs verschiedener Phytopathogene sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Zelltodinduktion sowie der Aktivierung von verschiedenen Abwehrreaktionen in Dikotyledonen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Antworten von *A. thaliana* auf die NLPs PsojNip und PaNie genauer untersucht und mit den Reaktionen auf den Peptidelizitor flg22 verglichen. Diesen Charakterisierungen gingen Expressionsstudien des Proteins PsojNip voraus. Es konnten keine Bedingungen zur löslichen Expression des Proteins in *E. coli* identifiziert werden, weshalb das Protein *in vitro* aus *inclusion bodies* rückgefaltet wurde. 57 Rückfaltungslösungen wurden für die Renaturierung von PsojNip getestet. Mit einem basischen Tris-Puffer und GSH/GSSG als Redoxsystem konnte das Protein optimal renaturiert werden. Auch die Rückfaltung von PaNie war unter diesen Bedingungen erfolgreich. In Stabilitätsuntersuchungen wurde deutlich, dass beide Proteine relativ hitze- und proteasestabil sind. Die Cysteine von PsojNip sind für dessen Aktivität nicht essentiell.

Die frühen, für die PTI typischen Reaktionen wie der Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration, *oxidative burst* und Aktivierung von MAP-Kinase-Kaskaden werden in *Arabidopsis thaliana* sowohl durch flg22 als auch PsojNip und PaNie ausgelöst. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die Quelle des *oxidative burst* die NADPH-oxidasen RBOHD und RBOHF sind. Weiterhin ist die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion abhängig vom Kalziumeinstrom und der Aktivierung von MAP-Kinasen.

Deutliche Unterschiede in der Antwort auf NLPs *vs.* flg22 traten bei der Analyse später Reaktionen, wie Salicylsäure-, Jasmonsäure- und Phytoalexinakkumulation auf. So wird durch flg22 ein leichter Anstieg der SA-Konzentration hervorgerufen. Diese SA-Akkumulation wird unterdrückt durch RAR1 und SGT1B, was ein weiteres Beispiel für die Unterdrückung der flg22 induzierten PTI darstellt. Akkumulationen von JA, OPDA und Camalexin konnten dagegen nicht detektiert werden.

Im Gegensatz dazu rufen PsojNip und PaNie zwar einen starken Anstieg der JA-, OPDA- und Camalexingehalte hervor, jedoch keine Akkumulation von SA.

Beide Proteine lösen in *Arabidopsis* einen schnellen Zelltod aus, der unabhängig von den analysierten Abwehrmechanismen verläuft. Somit ist der induzierte Zelltod nicht der HR zuzuordnen. Unter Einbeziehung der Dissertation von I. Kufner konnte ein Modell entwickelt werden, nachdem die NLPs die Zelle innerhalb von 15 min zerstören und somit *damage-*

*associated-molecular-pattern* freisetzen, die die beobachteten Reaktionen wie JA und Camalexin hervorrufen.

## 6 Literatur

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E. (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10306-10311.
- Adams, D.O., and Yang, S.F. (1979). Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 170-174.
- Ade, J., DeYoung, B.J., Golstein, C., and Innes, R.W. (2007). Indirect activation of a plant nucleotide binding site-leucine-rich repeat protein by a bacterial protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 2531-2536.
- Ahmed, A.K., Schaffer, S.W., and Wetlaufer, D.B. (1975). Nonenzymic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffers. *J Biol Chem* **250**, 8477-8482.
- Aist, J.R. (1976). Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. rev. phytopathol.* **14**, 145-163.
- Allan, A.C., and Fluhr, R. (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *Plant Cell* **9**, 1559-1572.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., and Ecker, J.R. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 2148-2152.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Ecker, J.R. (2003). Five components of the ethylene-response pathway identified in a screen for weak ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2992-2997.
- Amsellem, Z., Cohen, B.A., and Gressel, J. (2002). Engineering hypervirulence in a mycoherbicide fungus for efficient weed control. *Nat Biotechnol* **20**, 1035-1039.
- Anderluh, G., and Macek, P. (2002). Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: *Actiniaria*). *Toxicon* **40**, 111-124.
- Andi, S., Taguchi, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Ichinose, Y. (2001). Effect of methyl jasmonate on harpin-induced hypersensitive cell death, generation of hydrogen peroxide and expression of PAL mRNA in tobacco suspension cultured BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* **42**, 446-449.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- Arsene, F., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (2000). The heat shock response of *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* **55**, 3-9.
- Arteca, J.M., and Arteca, R.N. (1999). A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (ACS6) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol Biol* **39**, 209-219.

- Asai, S., Ohta, K., and Yoshioka, H.** (2008). MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* **20**, 1390-1406.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J., and Ausubel, F.M.** (2000). Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* **12**, 1823-1836.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Atkinson, M.M., Midland, S.L., Sims, J.J., and Keen, N.T.** (1996). Syringolide 1 triggers  $Ca^{2+}$  influx,  $K^{+}$  efflux, and extracellular alkalinization in soybean cells carrying the disease-resistance gene *Rpg4*. *Plant Physiol* **112**, 297-302.
- Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J., and Mischke, C.F.** (1990). Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K/H and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol* **92**, 215-221.
- Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J.** (2003a). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., and Staskawicz, B.J.** (2003b). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol* **49**, 1537-1546.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.
- Bae, H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Bae, H.J., and Bailey, B.A.** (2006). Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **141**, 1056-1067.
- Bailey, B.A.** (1995). Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytology* **85**, 1250-1255.
- Bailey, B.A., Apel-Birkhold, P.C., Akingbe, O.O., Ryan, J.L., O'Neill, N.R., and Anderson, J.D.** (2000). Nep from *Fusarium oxysporum* enhances biological control of Opium Poppy by *Pleospora papaveracea*. *Phytopathology* **99**, 812-818.
- Ballance, G.M., Lamari, L., and Bernier, C.C.** (1989). Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol Mol Plant Pathol* **35**, 203-213.
- Baynes, B.M., Wang, D.I., and Trout, B.L.** (2005). Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* **44**, 4919-4925.
- Bell, E., and Mullet, J.E.** (1993). Characterization of an *Arabidopsis* lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Physiol* **103**, 1133-1137.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F., and Gross, D.C.** (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev* **63**, 266-292.
- Benhamou, N., Chamberland, H., and Pauze, F.J.** (1990). Implication of pectic components in cell surface interactions between tomato root cells and *Fusarium*

- oxy-sporum* f. sp. radicles-lycopersici: A cytochemical study by means of a lectin with polygalacturonic acid-binding specificity. *Plant Physiol* **92**, 995-1003.
- Bent, A.F., Innes, R.W., Ecker, J.R., and Staskawicz, B.J.** (1992). Disease development in ethylene-insensitive *Arabidopsis thaliana* infected with virulent and avirulent *Pseudomonas* and *Xanthomonas* pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **5**, 372-378.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., and Staskawicz, B.J.** (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**, 1856-1860.
- Bergey, D.R., Howe, G.A., and Ryan, C.A.** (1996). Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12053-12058.
- Bergey, D.R., Orozco-Cardenas, M., de Moura, D.S., and Ryan, C.A.** (1999). A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1756-1760.
- Bianchi, M.E.** (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* **81**, 1-5.
- Bleecker, A.B., and Kende, H.** (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 1-18.
- Bleecker, A.B., Estelle, M.A., Somerville, C., and Kende, H.** (1988). Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**, 1086-1089.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., and Alfano, J.R.** (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 396-403.
- Blum, H., Beier, H., and Gross, H.J.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Blum, P., Velligan, M., Lin, N., and Matin, A.** (1992). DnaK-mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Biotechnology (N Y)* **10**, 301-304.
- 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. *Plant Cell* **12**, 1425-1440.
- Bolen, D.W., and Baskakov, I.V.** (2001). The osmophobic effect: natural selection of a thermodynamic force in protein folding. *J Mol Biol* **310**, 955-963.
- Boller, T., Hener, R.C., and Kende, H.** (1979). Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-Aminocyclopropane-l-Carboxylic Acid. *Planta* **145**, 293-303.
- Bolwell, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C., and Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**, 1367-1376.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.
- Brandts, J.F., Halvorson, H.R., and Brennan, M.** (1975). Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to *cis-trans* isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953-4963.

- 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. *Embo J* **21**, 6681-6688.
- Buchner, J.** (1996). Supervising the fold: functional principles of molecular chaperones. *Faseb J* **10**, 10-19.
- Buchter, R., Stromberg, A., Schmelzer, E., and Kombrink, E.** (1997). Primary structure and expression of acidic (class II) chitinase in potato. *Plant Mol Biol* **35**, 749-761.
- Butko, P.** (2003). Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2415-2422.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.** (1994). Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.
- Century, K.S., Holub, E.B., and Staskawicz, B.J.** (1995). NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6597-6601.
- Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., and Staskawicz, B.J.** (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for *Arabidopsis* disease resistance. *Science* **278**, 1963-1965.
- Chao, Q., Rothenberg, M., Solano, R., Roman, G., Terzaghi, W., and Ecker, J.R.** (1997). Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* **89**, 1133-1144.
- Chen, G.Q., and Bleecker, A.B.** (1995). Analysis of ethylene signal transduction kinetics associated with seedling-growth responses and chitinase induction in wild-type and mutant *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **108**, 597-607.
- Chen, G.Q., and Gouaux, E.** (1997). Overexpression of a glutamate receptor (GluR2) ligand binding domain in *Escherichia coli*: application of a novel protein folding screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 13431-13436.
- Chen, Z., Silva, H., and Klessig, D.F.** (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* **262**, 1883-1886.
- Chico, J.M., Chini, A., Fonseca, S., and Solano, R.** (2008). JAZ repressors set the rhythm in jasmonate signaling. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 486-494.
- Cleland, J.L., and Randolph, T.W.** (1992). Mechanism of polyethylene glycol interaction with the molten globule folding intermediate of bovine carbonic anhydrase B. *J Biol Chem* **267**, 3147-3153.
- Conconi, A., Smerdon, M.J., Howe, G.A., and Ryan, C.A.** (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature* **383**, 826-829.
- Cosio, E.G., Frey, T., Verduyn, R., van Boom, J., and Ebel, J.** (1990). High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett* **271**, 223-226.
- Creighton, T.E.** (1978). Experimental studies of protein folding and unfolding. *Prog Biophys Mol Biol* **33**, 231-297.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.

- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.B., and Roby, D. (1999). A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant J* **20**, 57-66.
- de Pater, S., Greco, V., Pham, K., Memelink, J., and Kijne, J. (1996). Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **24**, 4624-4631.
- de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammouneh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M., and Boch, J. (2006). *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 368-382.
- Degousée, N., Triantaphylidès, C., Montillet, J.L. (1994). Involvement of oxidative processes in the signaling mechanisms leading to the activation of Clyceollin synthesis in soybean (*Glycine max*). *Plant Phys* **104**, 945-952.
- del Pozo, O., Pedley, K.F., and Martin, G.B. (2004). MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *Embo J* **23**, 3072-3082.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**, 1247-1250.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Molecular Plant* **1**, 423-445.
- Derman, A.I., Prinz, W.A., Belin, D., and Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* **262**, 1744-1747.
- Desikan, R., S, A.H.-M., Hancock, J.T., and Neill, S.J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* **127**, 159-172.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y. (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8024-8029.
- Dewey, R.E., Siedow, J.N., Timothy, D.H., and Levings, C.S., 3rd. (1988). A 13-kilodalton maize mitochondrial protein in *E. coli* confers sensitivity to *Bipolaris maydis* toxin. *Science* **239**, 293-295.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A., and Dangel, J.L. (1994). *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Doke, N. (1983). Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiol Plant Pathol* **23**, 359-367.
- Donofrio, N.M., and Delaney, T.P. (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defence-compromised *Arabidopsis* nim1-1 and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 439-450.
- Droillard, M.J., Boudsocq, M., Barbier-Brygoo, H., and Lauriere, C. (2004). Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and

- plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. FEBS Lett **574**, 42-48.
- Durner, J., and Klessig, D.F.** (1999). Nitric oxide as a signal in plants. Curr Opin Plant Biol **2**, 369-374.
- Ebel, J., and Scheel, D.** (1997). Signals in host-parasite interactions. In The Mycota. Plant Relationship. Part A, G.C. Carroll and P. Tudzynski, eds (Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag), pp. 85-105.
- Ecker, J.R., and Davis, R.W.** (1987). Plant defense genes are regulated by ethylene. Proc Natl Acad Sci U S A **84**, 5202-5206.
- Epple, P., Apel, K., and Bohlmann, H.** (1995). An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. Plant Physiol **109**, 813-820.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E.** (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. Embo J **18**, 4689-4699.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. Proc Natl Acad Sci U S A **96**, 3292-3297.
- Farmer, E.E., and Ryan, C.A.** (1992). Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. Plant Cell **4**, 129-134.
- Felix, G., Regenass, M., and Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. Plant Journal **4**, 307-316.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. Plant J **18**, 265-276.
- Felix, G., Regenass, M., Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells. Induction of extracellular alkalization, changes in protein phosphorylation, an establishment of refractory state. Plant Journal **4**, 307-316.
- Fellbrich, G.** (2001). Interaktion zwischen Pflanzen und phytopathogenen Oomyceten. In Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät (Halle: Martin-Luther-Universität).
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., and Nurnberger, T.** (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. Plant J **32**, 375-390.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G., and Ausubel, F.M.** (2003). *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires EDS4 and PAD2, but not SID2, EDS5 or PAD4. Plant J **35**, 193-205.
- Feys, B., Benedetti, C.E., Penfold, C.N., and Turner, J.G.** (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. Plant Cell **6**, 751-759.

- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J* **20**, 5400-5411.
- Fischer, G., Bang, H., and Mech, C.** (1984). Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. *Biomed Biochim Acta* **43**, 1101-1111.
- Flor, H.H.** (1971). Current status of gene-for-gene concept. *annu. rev. phytopathol.* **9**, 275-296.
- Fremaux, I., Mazerès, S., Brisson-Lougarre, A., Arnaud, M., Ladurantie, C., and Fournier, D.** (2002). Improvement of *Drosophila* acetylcholinesterase stability by elimination of a free cysteine. *BMC Biochem* **3**, 21.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy, N., Tor, M., Sjolander, K.V., and Jones, J.D.** (2005). Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **138**, 611-623.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., and Ryals, J.** (1993). Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* **261**, 754-756.
- Galan, J.E., and Collmer, A.** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Gekko, K., and Timasheff, S.N.** (1981). Mechanism of protein stabilization by glycerol: preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochemistry* **20**, 4667-4676.
- Geraats, B.P., Bakker, P.A., and van Loon, L.C.** (2002). Ethylene insensitivity impairs resistance to soilborne pathogens in tobacco and *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1078-1085.
- Gijzen, M., and Nurnberger, T.** (2006). Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**, 1800-1807.
- Giles, N.M., Giles, G.I., and Jacob, C.** (2003). Multiple roles of cysteine in biocatalysis. *Biochem Biophys Res Commun* **300**, 1-4.
- Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., and Halkier, B.A.** (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8245-8250.
- Glazebrook, J., and Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8955-8959.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**, 381-392.
- Goldberg, M.E., Rudolph, R., and Jaenicke, R.** (1991). A kinetic study of the competition between renaturation and aggregation during the refolding of denatured-reduced egg white lysozyme. *Biochemistry* **30**, 2790-2797.

- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**, 277-284.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
- Gopalan, S., Wei, W., and He, S.Y.** (1996). hrp gene-dependent induction of hin1: a plant gene activated rapidly by both harpins and the avrPto gene-mediated signal. *Plant J* **10**, 591-600.
- Granado, J., Felix, G., and Boller, T.** (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol* **107**, 485-490.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A., and Mansfield, J.** (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* **23**, 441-450.
- Grant, M.R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (1995). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**, 843-846.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F., and Ausubel, F.M.** (1994). Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.
- Greenfield, N.J.** (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* **1**, 2876-2890.
- Guisbert, E., Herman, C., Lu, C.Z., and Gross, C.A.** (2004). A chaperone network controls the heat shock response in *E. coli*. *Genes Dev* **18**, 2812-2821.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kutchan, T.M., and Zenk, M.H.** (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2389-2393.
- Guzman, P., and Ecker, J.R.** (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513-523.
- Halim, V., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nürnberger, 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 Pathol* **64**, 311-318.
- Hamberg, M., and Hughes, M.** (1988). Fatty acid allene oxides. III. Albumin-induced cyclization of 12,13(*S*)-epoxy-9(*Z*), 11-octadecadienoic acid. *Lipids* **23**, 469.
- Hamberg, M., and Gardner, H.W.** (1992). Oxylin pathway to jasmonates: biochemistry and biological significance. *Biochim Biophys Acta* **1165**, 1-18.
- Hamilton, A.J., Bouzayen, M., and Grierson, D.** (1991). Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 7434-7437.
- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.

- Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 177-193.
- Hano, C., Addi, M., Fliniaux, O., Bensaddek, L., Duverger, E., Mesnard, F., Lamblin, F., and Laine, E.** (2008). Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells. *Plant Physiol Biochem* **46**, 590-600.
- Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M.** (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.
- Hauck, P., Thilmony, R., and He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8577-8582.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nurnberger, T., and Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- He, S.Y., Huang, H.C., and Collmer, A.** (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: a protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266.
- Heck, S., Grau, T., Buchala, A., Metraux, J.P., and Nawrath, C.** (2003). Genetic evidence that expression of NahG modifies defence pathways independent of salicylic acid biosynthesis in the *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* pv. *tomato* interaction. *Plant J* **36**, 342-352.
- Hogg, P.J.** (2003). Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends Biochem Sci* **28**, 210-214.
- Huang, H.C., Schuurink, R., Denny, T.P., Atkinson, M.M., Baker, C.J., Yucel, I., Hutcheson, S.W., and Collmer, A.** (1988). Molecular cloning of a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* gene cluster that enables *Pseudomonas fluorescens* to elicit the hypersensitive response in tobacco plants. *J Bacteriol* **170**, 4748-4756.
- Huang, J., Schmelz, E.A., Alborn, H., Engelberth, J., and Tumlinson, J.H.** (2005). Phytohormones mediate volatile emissions during the interaction of compatible and incompatible pathogens: the role of ethylene in *Pseudomonas syringae* infected tobacco. *J Chem Ecol* **31**, 439-459.
- Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L.** (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *Embo J* **22**, 5679-5689.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., and Shirasu, K.** (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **281**, 36969-36976.
- Ingham, J.L.** (1973). Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. *Phytopathologische Zeitschrift* **78**, 314-335.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4800-4805.

- Jacinto, T., McGurl, B., Francheschi, V., Delano-Freier, J., and Ryan, C.A. (1997). Tomato prosystemin promoter confers wound-inducible, vascular bundle-specific expression of the  $\beta$ -glucuronidase gene transgenic tomato plants *Planta* **203**, 406-412.
- Jaenicke, R., and Seckler, R. (1997). Protein misassembly in vitro. *Adv Protein Chem* **50**, 1-59.
- Jennings, J.C., Apel-Birkhold, P.C., Mock, N.M., Baker, C.J., Anderson, J.D., and Bailey, B.A. (2001). Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Science* **161**, 891-899.
- Jeter, C.R., Tang, W., Henaff, E., Butterfield, T., and Roux, S.J. (2004). Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2652-2664.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* **19**, 4004-4014.
- Jiang, M., and Zhang, J. (2003). Cross-talk between calcium and reactive oxygen species originated from NADPH oxidase in abscisic acid-induced antioxidant defence in leaves of maize seedlings. *Plant Cell Environ* **26**, 929-939.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13583-13588.
- Jocelyn, P.C. (1987). Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol* **143**, 44-67.
- Jones, J.D., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11086-11091.
- Kamoun, S., Huitema, E., and Vleeshouwers, V.G. (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**, 196-200.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G., and Govers, F. (1997). A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 13-20.
- Kandath, P.K., Ranf, S., Pancholi, S.S., Jayanty, S., Walla, M.D., Miller, W., Howe, G.A., Lincoln, D.E., and Stratmann, J.W. (2007). Tomato MAPKs LeMPK1, LeMPK2, and LeMPK3 function in the systemin-mediated defense response against herbivorous insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 12205-12210.
- Kaneko, F., Zhang, J.Z., Maruyama, K., Nihei, Y., Ono, I., Iwatsuki, K., and Yamamoto, T. (1995). Prostaglandin I<sub>1</sub> analogues, SM-10902 and SM-10906, affect human keratinocytes and fibroblasts in vitro in a manner similar to PGE<sub>1</sub>: therapeutic potential for wound healing. *Arch Dermatol Res* **287**, 539-545.
- Kauss, H., and Jeblick, W. (1995). Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **108**, 1171-1178.

- Keates, S.E., Kostman, T.A., Anderson, J.D., and Bailey, B.A.** (2003). Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol* **132**, 1610-1622.
- Kiefhaber, T., Rudolph, R., Kohler, H.H., and Buchner, J.** (1991). Protein aggregation in vitro and in vivo: a quantitative model of the kinetic competition between folding and aggregation. *Biotechnology (N Y)* **9**, 825-829.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D.** (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**, 749-759.
- Klink, T.A., Woycechowsky, K.J., Taylor, K.M., and Raines, R.T.** (2000). Contribution of disulfide bonds to the conformational stability and catalytic activity of ribonuclease A. *Eur J Biochem* **267**, 566-572.
- Knöster, M., LINTHORST, H.J.M., BOL, J.F., and LOON, L.C.V.** (2001). Involvement of ethylene in lesion development and systemic acquired resistance in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **59**, 45-57.
- Kobe, B., and Deisenhofer, J.** (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *Trends Biochem Sci* **19**, 415-421.
- Koch, M., Vorwerk, S., Masur, C., Sharifi-Sirchi, G., Olivieri, N., and Schlaich, N.L.** (2006). A role for a flavin-containing mono-oxygenase in resistance against microbial pathogens in *Arabidopsis*. *Plant J* **47**, 629-639.
- Koch, W., Wagner, C., and Seitz, H.U.** (1998). Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta* **206**, 523-532.
- Kono, H., and Rock, K.L.** (2008). How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* **8**, 279-289.
- Koukol, J., and Conn, E.E.** (1961). The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J Biol Chem* **236**, 2692-2698.
- Krause, M., Rudolph, R., and Schwarz, E.** (2002). The non-ionic detergent Brij 58P mimics chaperone effects. *FEBS Lett* **532**, 253-255.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nurnberger, T., Gabler, Y., Lee, J., and Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* **278**, 2256-2264.
- Küfner, I.** (2008). Physiologische und molekulare Charakterisierung der Wirkung von NEP1-ähnlichen Proteinen (NLPs) auf Pflanzen. In Fakultät für Biologie (Tübingen: Eberhard-Karls-Universität).
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y., Nishi, A.** (1987). The elicitation of phytoalexins by Ca<sup>2+</sup> and cyclic cAMP in carrot cells. *Phytochemistry* **26**, 1919-1923.
- Kwak, Y.-H., Kim, S.-J., Lee, K.-J., and Kim, H.-B.** (2000). Stress responses of the *Escherichia coli* *groE* Promoter. *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**, 63-68.

- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**, 105-132.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lahaye, T., and Bonas, U. (2001). Molecular secrets of bacterial type III effector proteins. *Trends Plant Sci* **6**, 479-485.
- Lamari, L., Bernier, C.C., and Smith, R.B. (1991). Wheat genotypes that develop both Tan necrosis and extensive chlorosis in response to isolates of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Diseases* **75**, 121-122.
- Laudert, D., and Weiler, E.W. (1998). Allene oxide synthase: a major control point in *Arabidopsis thaliana* octadecanoid signalling. *Plant J* **15**, 675-684.
- Lebrun-Garcia, A., Ouaked, F., Chiltz, A., and Pugin, A. (1998). Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* **15**, 773-781.
- Lee, J., Klessig, D.F., and Nurnberger, T. (2001). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* **13**, 1079-1093.
- Lee, S.C., and Olins, P.O. (1992). Effect of overproduction of heat shock chaperones GroESL and DnaK on human procollagenase production in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **267**, 2849-2852.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
- Levine, A., Pennell, R.I., Alvarez, M.E., Palmer, R., and Lamb, C. (1996). Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* **6**, 427-437.
- Lindgren, P.B., Peet, R.C., and Panopoulos, N.J. (1986). Gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola controls pathogenicity of bean plants and hypersensitivity of nonhost plants. *J Bacteriol* **168**, 512-522.
- Lipari, F., and Herscovics, A. (1996). Role of the cysteine residues in the alpha1,2-mannosidase involved in N-glycan biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. The conserved Cys340 and Cys385 residues form an essential disulfide bond. *J Biol Chem* **271**, 27615-27622.
- Liu, Y., and Zhang, S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3386-3399.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., and Dinesh-Kumar, S.P. (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.
- Livaja, M., Zeidler, D., von Rad, U., and Durner, J. (2008). Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology* **213**, 161-171.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.

- Marston, F.A.** (1986). The purification of eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Biochem J* **240**, 1-12.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 23-61.
- Martin, J.T.** (1964). Role of cuticle in the defense against plant disease. *Ann. Rev. Phytopathol* **2**, 81-100.
- Mason, H.S., DeWald, D.B., and Mullet, J.E.** (1993). Identification of a methyl jasmonate-responsive domain in the soybean vspB promoter. *Plant Cell* **5**, 241-251.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A., and Pirhonen, M.** (2004). Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 1366-1375.
- Mauch-Mani, B., and Slusarenko, A.J.** (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**, 203-212.
- McRee, D.E., Redford, S.M., Getzoff, E.D., Lepock, J.R., Hallewell, R.A., and Tainer, J.A.** (1990). Changes in crystallographic structure and thermostability of a Cu, Zn superoxide dismutase mutant resulting from the removal of a buried cysteine. *J Biol Chem* **265**, 14234-14241.
- Menke, F.L., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M., and Klessig, D.F.** (2004). Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Menzella, H.G., Gramajo, H.C., and Ceccarelli, E.A.** (2002). High recovery of prochymosin from inclusion bodies using controlled air oxidation. *Protein Expr Purif* **25**, 248-255.
- Metraux, J.P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., and Inverardi, B.** (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**, 1004-1006.
- Meyer, A., Puhler, A., and Niehaus, K.** (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**, 214-222.
- Miles, G.P., Samuel, M.A., Zhang, Y., and Ellis, B.E.** (2005). RNA interference-based (RNAi) suppression of AtMPK6, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase, results in hypersensitivity to ozone and misregulation of AtMPK3. *Environ Pollut* **138**, 230-237.
- Miller, J.A., Narhi, L.O., Hua, Q.-X., Rosenfeld, R., Arakawa, T., Rohde, M., Prestrelski, S., Lauren, S., Stoney, K.S., Tsai, L., and Weiss, M.A.** (1993). Oxidative refolding of insulin-like growth factor I yields two products of similar thermodynamic stability: a bifurcating protein-folding pathway. *Biochemistry* **32**, 5203-5213.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19613-19618.
- Moiseyev, G.P., Fedoreyeva, L.I., Zhuravlev, Y.N., Yasnetskaya, E., Jekel, P.A., and Beintema, J.J.** (1997). Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses.

- New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins. *FEBS Lett* **407**, 207-210.
- Monache, G.D., de Rosa, M.C., Scurria, R., Vitali, A., Cuteri, A., Monacelli, B., Pasqua, G., and Botta, B.** (1995). Comparison between metabolite productions in cell culture and in whole plant of *Maclura pomifera*. *Phytochemistry* **39**, 575-580.
- Mosblech, A., König, 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. *Molec Plant* **1**, 249-261.
- Mur, L.A., Bi, Y.M., Darby, R.M., Firek, S., and Draper, J.** (1997). Compromising early salicylic acid accumulation delays the hypersensitive response and increases viral dispersal during lesion establishment in TMV-infected tobacco. *Plant J* **12**, 1113-1126.
- Mur, L.A., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O., and Wasternack, C.** (2006). The outcomes of concentration-specific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. *Plant Physiol* **140**, 249-262.
- Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., and Parker, J.E.** (2002). *Arabidopsis* RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* **14**, 979-992.
- Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.
- Neidhardt, F.C., Van Bogelen, R.A.** (1987). Heat shock response. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, J.L.I. F. C. Neidhardt, K. B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter, H. E. Umbarger, ed (Washington, D.C.: American Society for Microbiology), pp. 1339.
- Nelson, P.E., Desjardins, A.E., and Plattner, R.D.** (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by fusarium species: biology, chemistry, and significance. *Annu Rev Phytopathol* **31**, 233-252.
- Neumerkel, J.** (2003). Gewebsspezifische Analyse der Jasmonatwirkungsweise in der lokalen Wundantwort der Tomate. In *Fachbereich Biochemie/Biotechnologie* (Halle: Martin-Luther-Universität).
- Newman, M.A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J., and Dow, J.M.** (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* **29**, 487-495.
- Nishiuchi, T., Masuda, D., Nakashita, H., Ichimura, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Kimura, M., Yamaguchi, I., and Yamaguchi, K.** (2006). Fusarium phytotoxin trichothecenes have an elicitor-like activity in *Arabidopsis thaliana*, but the activity differed significantly among their molecular species. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 512-520.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S.Y.** (2005). Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 361-368.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y.H., Pumplin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**, 220-223.

- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., and Boller, T. (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem* **275**, 7521-7526.
- Nürnberger, T., and Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**, 372-379.
- Nürnberger, T., and Lipka, V. (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**, 335-345.
- Nürnberger, 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.
- O'Donnell, P.J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C., Leyser, H.M.O., and Bowles, D.J. (1996). Ethylene as a Signal Mediating the Wound Response of Tomato Plants. *Science* **274**, 1914-1917.
- Orozco-Cardenas, M.L., Narvaez-Vasquez, J., and Ryan, C.A. (2001). Hydrogen peroxide acts as a second messenger for the induction of defense genes in tomato plants in response to wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Cell* **13**, 179-191.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Panabieres, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J.P. (2001). Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell* **12**, 2825-2834.
- Ou, W.B., Park, Y.D., and Zhou, H.M. (2002). Effect of osmolytes as folding aids on creatine kinase refolding pathway. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 136-147.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D., and Hirt, H. (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Embo J* **22**, 1282-1288.
- Pappan, K., Austin-Brown, S., Chapman, K.D., and Wang, X. (1998). Substrate selectivities and lipid modulation of plant phospholipase D alpha, -beta, and -gamma. *Arch Biochem Biophys* **353**, 131-140.
- Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., and Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a gamma-glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *Plant J* **49**, 159-172.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., and Feyereisen, R. (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in *Arabidopsis* due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* **31**, 1-12.
- Park, S.W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**, 113-116.
- Parker, J.E., Schulte, W., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Molecular Plant-Microbe Interaction* **4**, 19-27.
- Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J. (1996). Characterization of eds1, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.

- Pearce, G., and Ryan, C.A.** (2003). Systemic signaling in tomato plants for defense against herbivores. Isolation and characterization of three novel defense-signaling glycopeptide hormones coded in a single precursor gene. *J Biol Chem* **278**, 30044-30050.
- Pena-Cortes, H., Fisahn, J., and Willmitzer, L.** (1995). Signals involved in wound-induced proteinase inhibitor II gene expression in tomato and potato plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4106-4113.
- Pena-Cortes, H., Albrecht, T., Prat, S., Weiler, E.W., and Willmitzer, L.** (1993). Aspirin prevents wound-induced gene expression in tomato leaves by blocking jasmonic acid biosynthesis. *Planta* **191**, 123-128.
- Peng, J.-L., Dong, H.-S., Dong, H.-P., Delaney, T.P., Bonasera, J.M., and Beer, S.V.** (2003). Harpin-elicited hypersensitive cell death and pathogen resistance require the *NDR1* and *EDS1* genes. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**, 317-326.
- Peng, M., Kuc, J.** (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf discs. *Phytopathology* **82**, 696-699.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 2103-2113.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M., and Broekaert, W.F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**, 2309-2323.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., Sharma, S.B., Klessig, D.F., Martienssen, R., Mattsson, O., Jensen, A.B., and Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Piesetsky, D.S., Erlandsson-Harris, H., and Andersson, U.** (2008). High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease. *Arthritis Research and Therapy* **10**, 209-218.
- Pieterse, C.M., and Van Loon, L.C.** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 456-464.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J., and van Loon, L.C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1571-1580.
- Ploss, E.** (1968). Die BASF. - Aus der Arbeit der Badischen Anilin-& Soda-Fabriken – AG. **18**, 91-96.
- Pradeep, L., and Udgaonkar, J.B.** (2002). Differential salt-induced stabilization of structure in the initial folding intermediate ensemble of barstar. *J Mol Biol* **324**, 331-347.
- Prinz, W.A., Aslund, F., Holmgren, A., and Beckwith, J.** (1997). The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *J Biol Chem* **272**, 15661-15667.
- Qin, W., Pappan, K., and Wang, X.** (1997). Molecular heterogeneity of phospholipase D (PLD). Cloning of PLDgamma and regulation of plant PLDgamma, -beta, and -alpha by polyphosphoinositides and calcium. *J Biol Chem* **272**, 28267-28273.

- Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M.** (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J* **32**, 361-373.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberacki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M., and Nurnberger, T.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**, 3721-3744.
- Ranf, S., Wunnenberg, P., Lee, J., Becker, D., Dunkel, M., Hedrich, R., Scheel, D., and Dietrich, P.** (2008). Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does not impair Ca<sup>2+</sup> signals induced by abiotic and biotic stresses. *Plant J* **53**, 287-299.
- Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P., and Watkins, C.B.** (1997). Influence of salicylic acid on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, oxidative stress, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiol* **115**, 137-149.
- Rate, D.N., and Greenberg, J.T.** (2001). The *Arabidopsis* aberrant growth and death2 mutant shows resistance to *Pseudomonas syringae* and reveals a role for NPR1 in suppressing hypersensitive cell death. *Plant J* **27**, 203-211.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., and Greenberg, J.T.** (1999). The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* **11**, 1695-1708.
- Ray, M.V.L.** (1993). Production of recombinant salmon calcitonin by in vitro amidation of an *Escherichia coli* produced precursor peptide. *Bio Technology* **11**, 64-70.
- Reddy, K.R., Lilie, H., Rudolph, R., and Lange, C.** (2005). L-Arginine increases the solubility of unfolded species of hen egg white lysozyme. *Protein Sci* **14**, 929-935.
- Ren, D., Yang, H., and Zhang, S.** (2002). Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **277**, 559-565.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J., and Zhang, S.** (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5638-5643.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H., and Knight, M.R.** (2004). OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* **427**, 858-861.
- Rhoads, D.M., Levings, C.S., 3rd, and Siedow, J.N.** (1995). URF13, a ligand-gated, pore-forming receptor for T-toxin in the inner membrane of cms-T mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* **27**, 437-445.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G., and Pernellet, J.C.** (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* **183**, 555-563.
- Ride, J.P.** (1983). Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (J.A. Callow, ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 215-236.

- Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbahri, L., Mauch, F., and Mauch-Mani, B.** (2001). Characterization of an *Arabidopsis-Phytophthora* pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J* **28**, 293-305.
- Rojo, E., Leon, J., and Sanchez-Serrano, J.J.** (1999). Cross-talk between wound signalling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **20**, 135-142.
- Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M., and Ecker, J.R.** (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**, 1393-1409.
- Romanoko, R.** (1959). A physiological basis for resistance of oats to victoria blight. *Phytopathology* **49**, 32-36.
- Romanski, A.** (2001). Das Elicitorprotein NPP1 - Isolierung und Charakterisierung der korrespondierenden cDNA, heterologe Expression des Proteins und Studien zur Signalperzeption (Halle-Wittenberg: Martin-Luther Universität).
- Romeis, T., Piedras, P., and Jones, J.D.** (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**, 803-816.
- Romeis, T., Ludwig, A.A., Martin, R., and Jones, J.D.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J* **20**, 5556-5567.
- Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., and Jones, J.D.** (1999). Rapid Avr9- and Cf-9 -dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **11**, 273-287.
- Royer, C.A.** (1995). fluorescence spectroscopy. In *Methods in molecular biology*, B.A. Shirley, ed (Totowa, New Jersey: Humana Press), pp. 65-90.
- Rudolph, R., and Lilie, H.** (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *Faseb J* **10**, 49-56.
- Rushton, P.J., Macdonald, H., Huttly, A.K., Lazarus, C.M., and Hooley, R.** (1995). Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conserved *zls*-element in the promoters of alpha-Amy2 genes. *Plant Mol Biol* **29**, 691-702.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K., and Somssich, I.E.** (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *Embo J* **15**, 5690-5700.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., and Hunt, M.D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.
- Ryerson, D.E., and Heath, M.C.** (1996). Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. *Plant Cell* **8**, 393-402.
- Sagi, M., and Fluhr, R.** (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* **126**, 1281-1290.
- Sakaguchi, M., Takezawa, M., Nakazawa, R., Nozawa, K., Kusakawa, T., Nagasawa, T., Sugahara, Y., and Kawakita, M.** (2008). Role of disulphide bonds in a

- thermophilic serine protease aqualysin I from *Thermus aquaticus* YT-1. *J Biochem* **143**, 625-632.
- Samanani, N., Alcantara, J., Bourgault, R., Zulak, K.G., and Facchini, P.J.** (2006). The role of phloem sieve elements and laticifers in the biosynthesis and accumulation of alkaloids in opium poppy. *Plant J* **47**, 547-563.
- Sandgren, M., Gualfetti, P.J., Paech, C., Paech, S., Shaw, A., Gross, L.S., Saldajeno, M., Berglund, G.I., Jones, T.A., and Mitchinson, C.** (2003). The Humicola grisea Cel12A enzyme structure at 1.2 Å resolution and the impact of its free cysteine residues on thermal stability. *Protein Sci* **12**, 2782-2793.
- Sang, Y., Cui, D., and Wang, X.** (2001). Phospholipase D and phosphatidic acid-mediated generation of superoxide in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **126**, 1449-1458.
- Sasabe, M., Takeuchi, K., Kamoun, S., Ichinose, Y., Govers, F., Toyoda, K., Shiraishi, T., and Yamada, T.** (2000). Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* **267**, 5005-5013.
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., and Tabata, S.** (2001). Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in *Arabidopsis* by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res* **8**, 153-161.
- Savla, U., Appel, H.J., Sporn, P.H., and Waters, C.M.** (2001). Prostaglandin E<sub>2</sub> regulates wound closure in airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**, L421-431.
- Saxena, V.P., and Wetlaufer, D.B.** (1970). Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry* **9**, 5015-5023.
- Scheer, J.M., and Ryan, C.A., Jr.** (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 9585-9590.
- Schein, C.** (1989). Production of soluble recombinant proteins in bacteria. *Bio/Technology* **7**, 1141-1149.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C., and Manners, J.M.** (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11655-11660.
- Schmele, I., and Kauss, H.** (1990). Enhanced activity of the plasma membrane localized callose synthase in cucumber leaves with induced resistance. *Physiol Mol Plant Pathol* **37**, 221-228.
- Schouten, A., van Baarlen, P., and van Kan, J.A.** (2008). Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol* **177**, 493-505.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A., and Glawischnig, E.** (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**, 1248-1254.
- Schumann, W., and Ferreira, L.C.S.** (2004). Production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Genetics and Molecular Biology* **27**, 442-453.

- Seo, S., Ishizuka, K., and Ohashi, Y. (1995). Induction of salicylic acid  $\beta$ -glucosidase in tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant Cell Physiol* **36**, 447-453.
- Shain, L., and Wheeler, H. (1975). Production of ethylene by oats resistant and susceptible to victorin. *Phytopathology* **65**, 88-89.
- Shang, Y., Li, X., Cui, H., He, P., Thilmony, R., Chintamanani, S., Zwiesler-Vollick, J., Gopalan, S., Tang, X., and Zhou, J.M. (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19200-19205.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W. (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- Shapiro, A.D., and Zhang, C. (2001). The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**, 1089-1101.
- Sharp, J.K., Valent, B., and Albersheim, P. (1984). Purification and partial characterization of a beta-glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J Biol Chem* **259**, 11312-11320.
- Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P. (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci* **8**, 252-258.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., and Lamb, C. (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**, 261-270.
- Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M.W., Zhou, F., Azevedo, C., and Schulze-Lefert, P. (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* **99**, 355-366.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2001a). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 10763-10768.
- Shiu, S.H., and Bleecker, A.B. (2001b). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* **2001**, RE22.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F., and Li, W.H. (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* **16**, 1220-1234.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev* **12**, 3703-3714.
- Song, C.J., Steinebrunner, I., Wang, X., Stout, S.C., and Roux, S.J. (2006). Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **140**, 1222-1232.
- Sorensen, H.P., Mortensen, K. K. (2005). Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microbial Cell factories* **4**, 1.
- Staswick, P.E., Yuen, G.Y., and Lehman, C.C. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J* **15**, 747-754.

- Steczko, J., Donoho, G.A., Dixon, J.E., Sugimoto, T., and Axelrod, B.** (1991). Effect of ethanol and low-temperature culture on expression of soybean lipoxygenase L-1 in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* **2**, 221-227.
- Stintzi, A., and Browse, J.** (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, opr3, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10625-10630.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J., and Farmer, E.E.** (2001). Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12837-12842.
- Stone, J.M., Heard, J.E., Asai, T., and Ausubel, F.M.** (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) *Arabidopsis* mutants. *Plant Cell* **12**, 1811-1822.
- Stratmann, J.W.** (2003). Long distance run in the wound response--jasmonic acid is pulling ahead. *Trends Plant Sci* **8**, 247-250.
- Strawn, M.A., Marr, S.K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C., and Wildermuth, M.C.** (2007). *Arabidopsis* isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J Biol Chem* **282**, 5919-5933.
- Strelkov, S., Lamari, L., Ballance, G.M., and Orolaza, N.P.** (1998). Isolation and mode of action of PTR chlorosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. In *Molecular Genetics of Host-specific Toxins in Plant Disease*, K. Kohmoto and O.C. Yoder, eds (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers), pp. 137-138.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., and Krysan, P.J.** (2007). MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **143**, 661-669.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K.** (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11777-11782.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K.** (2007). The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 805-818.
- Tanaka, T., Ono, S., Watakabe, Y., and Hiratsuka, K.** (2006). Bioluminescence reporter assay system to monitor *Arabidopsis* MPK3 gene expression in to infection by *Botrytis cinerea*. *J Gen Plant Pathol* **72**, 1-5.
- Tatara, Y., Yoshida, T., and Ichishima, E.** (2005). A single free cysteine residue and disulfide bond contribute to the thermostability of *Aspergillus saitoi* 1,2-alpha-mannosidase. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**, 2101-2108.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L., and Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **15**, 141-152.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1995). Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 4158-4163.

- Testerink, C., and Munnik, T.** (2005). Phosphatidic acid: a multifunctional stress signaling lipid in plants. *Trends Plant Sci* **10**, 368-375.
- Thannhauser, T.W., Konishi, Y., and Scheraga, H.A.** (1984). Sensitive quantitative analysis of disulfide bonds in polypeptides and proteins. *Anal Biochem* **138**, 181-188.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S.Y., Howe, G.A., and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661-665.
- Thomas, J.G., and Baneyx, F.** (1996). Protein misfolding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli* cells overexpressing Heat-shock proteins. *J Biol Chem* **271**, 11141-11147.
- Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**, 163-171.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 15107-15111.
- Tietjen, K.G., and Matern, U.** (1983). Differential response of cultured parsley cells to elicitors from two non-pathogenic strains of fungi. 2. Effects on enzyme activities. *Eur J Biochem* **131**, 409-413.
- Tör, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., and Holub, E.B.** (2002). *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **14**, 993-1003.
- Torero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**, 1005-1015.
- Torres, M.A., and Dangl, J.L.** (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 517-522.
- Torres, M.A., Onouchi, H., Hamada, S., Machida, C., Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1998). Six *Arabidopsis thaliana* homologues of the human respiratory burst oxidase (gp91phox). *Plant J* **14**, 365-370.
- Tsuda, K., Sato, M., Glazebrook, J., Cohen, J.D., and Katagiri, F.** (2008). Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J* **53**, 763-775.
- Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., and Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **98**, 1304-1309.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L.** (1988). NMR evidence for an early framework intermediate on the folding pathway of ribonuclease A. *Nature* **335**, 694-699.
- Udgaonkar, J.B., and Baldwin, R.L.** (1990). Early folding intermediate of ribonuclease A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 8197-8201.

- Van der Hoorn, R.A., Laurent, F., Roth, R., and De Wit, P.J.** (2000). Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 439-446.
- van der Straeten, D., Rodrigues-Pousada, R.A., Villarroel, R., Hanley, S., Goodman, H.M., and Van Montagu, M.** (1992). Cloning, genetic mapping, and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9969-9973.
- van Loon, L.C., and van Strien, E.A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**, 85-97.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P., and Linthorst, H.J.** (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **11**, 184-191.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.** (2006b). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 135-162.
- van Wees, S.C., and Glazebrook, J.** (2003). Loss of non-host resistance of *Arabidopsis* NahG to *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J* **33**, 733-742.
- Veit, S., Worle, J.M., Nurnberger, T., Koch, W., and Seitz, H.U.** (2001). A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiol* **127**, 832-841.
- Vick, B.A., and Zimmerman, D.C.** (1983). The biosynthesis of jasmonic acid: a physiological role for plant lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **111**, 470-477.
- Vick, B.A., and Zimmerman, D.C.** (1984). Biosynthesis of Jasmonic Acid by Several Plant Species. *Plant Physiol* **75**, 458-461.
- Vijayan, P., Shockey, J., Levesque, C.A., Cook, R.J., and Browse, J.** (1998). A role for jasmonate in pathogen defense of *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7209-7214.
- von Malek, B., van der Graaff, E., Schneitz, K., and Keller, B.** (2002). The *Arabidopsis* male-sterile mutant dde2-2 is defective in the ALLENE OXIDE SYNTHASE gene encoding one of the key enzymes of the jasmonic acid biosynthesis pathway. *Planta* **216**, 187-192.
- Wakulinski, W.** (1989). Phytotoxicity of the secondary metabolites of fungi causing wheat head fusariosis (head blight). *Acta Physiol Plant* **11**, 301-306.
- Walton, J.D.** (1996). Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell* **8**, 1723-1733.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F., and Wang, X.** (2000). Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 2237-2246.
- Wang, E., Norred, W.P., Bacon, C.W., Riley, R.T., and Merrill, A.H., Jr.** (1991). Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266**, 14486-14490.
- Wang, H., Li, J., Bostock, R.M., and Gilchrist, D.G.** (1996). Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *Plant Cell* **8**, 375-391.

- Warm, E., and Laties, G.G. (1982). Quantification of hydrogen peroxide in plant extracts by the chemiluminescence reaction with luminol. *Phytochemistry* **21**, 827-831.
- Wasternack, C., Stenzel, I., Hause, B., Hause, G., Kutter, C., Maucher, H., Neumerkel, J., Feussner, I., and Miersch, O. (2006). The wound response in tomato--role of jasmonic acid. *J Plant Physiol* **163**, 297-306.
- Wedemeyer, W.J., Welker, E., Narayan, M., and Scheraga, H.A. (2000). Disulfide bonds and protein folding. *Biochemistry* **39**, 7032.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature* **358**, 169-170.
- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.
- Williamson, J.D., and Scandalios, J.G. (1992). Differential response of maize catalases and superoxide dismutases to the photoactivated fungal toxin cercosporin. *Plant J* **2**, 351-358.
- Wong, H.L., Pinontoan, R., Hayashi, K., Tabata, R., Yaeno, T., Hasegawa, K., Kojima, C., Yoshioka, H., Iba, K., Kawasaki, T., and Shimamoto, K. (2007). Regulation of rice NADPH oxidase by binding of Rac GTPase to its N-terminal extension. *Plant Cell* **19**, 4022-4034.
- Wörle, J.M. (2004). Reaktionsketten in Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana*, ausgelöst durch den gereinigten Proteinelicitor PaNie aus *Pythium aphanidermatum*. In Fakultät für Biologie (Tübingen: Eberhard-Karls-Universität).
- Xie, D.X., Feys, B.F., James, S., Nieto-Rostro, M., and Turner, J.G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**, 1091-1094.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077-1085.
- Yalpani, N., Leon, J., Lawton, M.A., and Raskin, I. (1993). Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus-inoculated tobacco. *Plant Physiol* **103**, 315-321.
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., and Akatsuka, T. (1993). Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-Acetylchitooligosaccharides. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry* **57**, 405-409.
- Yu, I.C., Parker, J., and Bent, A.F. (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis dnd1* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7819-7824.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15811-15816.
- Zemojtel, T., Frohlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., and Durner, J. (2006). Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* **11**, 524-525; author reply 526-528.
- Zeyen, R.J., Bushnell, W.R., Carver, T.L.W., Robbins, M.P., Clark, T.A., Boyles, D.A., and Vance, C.P. (1995). Inhibiting phenylalanine lyase and cinnamyl-alcohol

- dehydrogenase suppresses *Mla1* (HR) but not *mlo5* (non-HR) barley powdery mildew resistances. *Physiol Mol Plant Pathol* **47**, 119-140.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X., and Zhou, J.M. (2007). A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* **1**, 175-185.
- Zhang, S., and Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**, 809-824.
- Zhao, J., and Last, R.L. (1996). Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **8**, 2235-2244.
- Zhao, J., Williams, C.C., and Last, R.L. (1998). Induction of *Arabidopsis* tryptophan pathway enzymes and camalexin by amino acid starvation, oxidative stress, and an abiotic elicitor. *Plant Cell* **10**, 359-370.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y., and Zhang, W.H. (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**, 206-217.
- Zheng, L., Krishnamoorthi, R., Zolkiewski, M., and Wang, X. (2000). Distinct Ca<sup>2+</sup> binding properties of novel C2 domains of plant phospholipase D alpha and beta. *J Biol Chem* **275**, 19700-19706.
- Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J. (1999). *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**, 2419-2428.
- Zhou, N., Tootle, T.L., Tsuji, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J. (1998). PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1021-1030.
- Ziegler, D.M., Poulsen, L. L. (1977). Protein disulfide bond synthesis: a possible intracellular mechanism. *Trends in biochemical science* **2**, 79-81.
- Zimmermann, S., Nurnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., and Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 2751-2755.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G., and Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**, 764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.
- Zulak, K.G., Khan, M.F., Alcantara, J., Schriemer, D.C., and Facchini, P.J. (2009). Plant defense responses in opium poppy cell cultures revealed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry proteomics. *Mol Cell Proteomics* **8**, 86-98.

## 7 Anhang

### PsojNip (AAM48170)

```

1   atgaacctcc gccctgact cctcgtctag ctggcttcat tcgcgtacgt gagcgccagc
61  gttatcaacc acgaccaggt cgtgccattc acccagccga cgcctacgac cgctctccaa
121 caagcggccg tcaagtataa gcctcaaata cacatcagca acggctgcca cccgtaccct
181 gccgtggaca ataacggcaa cacgagcggc gggttgaatc ctaccggcag cgagagcggc
241 gggtgcaagg gctccggcta cggcactcaa atctacggtc gcgccgtcaa gtaccaaggt
301 gtctacgcct tcatgtactc gtggtacatg cccaaagacg aaaccttgac cgggctgggg
361 caccgccacg actgggaggc gtgctgtgtc tgggtcgacg acatcgctgc gtccagtccg
421 aagatcgctc cgctgtccgc ttcagcgcac agcggataca acaagtacta cccgccgagc
481 tcctcctact tcagtggcaa cagcgccaag atcgactact cgtccagcta cgtgggtcatc
541 aaccacgcgc tgtcggccac gtcaactgcg ggcgagacgc agcctctgat catgtgggac
601 cagctcacgg acgcggcccg cagggcactg gaggacacgg actttggcga cgccaacgtg
661 ccgtttaagg atgccaaactt ccagaccaag ctcggcaacg cctactacgc ttaa

```

### PaNie (AAD53944)

```

1   attctgcgat tcacatcgtg tcccacaagt caagatggtc cgcttcgtgt ctgctctgct
61  cctcgcggcc gccggtgtgc ttgcctccac caacgccgcc gtgatcaacc atgatgctgt
121 gccagtgtgg ccgcaaccag agccagctga tgcgacgcag gcgctagctg tgcgtttcaa
181 gccacagctc gacgtcgtca acggctgcca gccataccct gcagtcgacc cacagggcaa
241 caccagcggc ggtctcaagc catcgggctc tcaggctgcc gcgtgccctg acatgagcaa
301 ggcgcaggtc tactcgcgct caggcaccta caatggctac tacgccatca tgtactcgtg
361 gtacatgcca aaggactcgc cgtccactgg cattggccac cgccacgact gggagaacgt
421 cgtcgtgtgg ctcgacaacg ctgctcggc caacatcgtg gcgctctcgg catcggctca
481 cagtggctac aagaagtcgt tcccagccga caagagctac ctcgatggca ttaccgcaa
541 gatctcgtac aagtcgacat ggctctgga ccacgagctg ggcttcacga ccagtgtctg
601 caagcagcag cctctgatcc agtgggagca gatgacgcag gcagctcgtg acgctcttga
661 gagcaccgac tttggcaacg ccaacgtgcc gttcaagagc aacttcagg acaagctcgt
721 gaaggcgttt ttccagtaaa g

```

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und die den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Diese Arbeit wurde an keiner anderen Fakultät oder Universität zur Begutachtung eingereicht.

Ich bewerbe mich mit dieser Arbeit zum ersten Mal um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den

Franziska Handmann

## Veröffentlichung

**Handmann, F.** (2008). Response of *Arabidopsis thaliana* to a necrosis-inducing protein from *Phytophthora sojae*. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB), Tampere (Finland), 17.-22. August 2008

## Lebenslauf

Name: Franziska Handmann  
Geburtsdatum: 18.01.1979  
Geburtsort: Meißen  
Nationalität: deutsch

## Werdegang

09/1985 – 07/1997 Schulausbildung in Meißen  
Abschluss: Abitur

10/1997 – 09/2002 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle/Saale  
Abschluss: Diplom  
Thema der Diplomarbeit: „Das Decapping von mRNA in Säugern“  
angefertigt am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, AG Allgemeine  
Biochemie bei Prof. Dr. E. Wahle

03/2003 – 08/2004 Arbeiten zur Charakterisierung einer pflanzlichen NADPH-Oxidase  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Prof. Dr. D. Scheel)

Seit 08/2004 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle (Abt.  
Stress und Entwicklung, Prof. Dr. D. Scheel)  
Thema: „Reaktionen von *Arabidopsis thaliana* auf ein nekrose-  
induzierendes Protein aus *Phytophthora sojae*“

## Danksagung

Als erstes danke ich Prof. Dr. Dierk Scheel für die Überlassung des herausfordernden und interessanten Themas sowie die Unterstützungen und konstruktiven Diskussionen. Auch möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, Konferenzen und Workshops zu besuchen und so meinen Horizont zu erweitern. Ebenso bedanke ich mich bei Dr. Justin Lee für die Betreuung sowie den Gutachtern.

Jan Oschmann danke ich ganz herzlich für seine immerwährenden Hilfestellungen bei allen Proteinfragen.

Der gesamten Abteilung SE danke ich für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre. Besonders erwähnen möchte ich Rita, Kai, Sylvia, Andrea, die Claudias, Tino und Mieder. mit denen auch schwierige Zeiten meist fröhlich durchstanden wurden. Rita und Steffi danke ich außerdem für die im wahrsten Sinne des Wortes enge Zusammenarbeit im U007.

Auch für die technischen Unterstützungen möchte ich mich herzlich bedanken bei:

- ... Christel und Sylvia für ihre unermüdliche Hilfe
- ... Frau Ortel, Herrn Steen und Herrn Kramell für die JA-Bestimmung
- ... meinen Korrekturlesern
- ... Herrn Bartz für die schnellen Rettungen bei Computerstreiks
- ... den Mitarbeitern der Institutsverwaltung
- ... dem Mann, der immer den Schokoladenautomaten auffüllte

Einen großen Anteil haben meine „Nicht-Institutsfreunde“, die mir immer den Rücken gestärkt und an mich geglaubt haben und mir immer wieder zeigten, dass es noch ein Leben neben PsojNip gibt.

Zum Schluss möchte ich meiner gesamten Familie danken, die mich auf diesem Weg in jeglicher Hinsicht unterstützt haben. Besonders wichtig für mich war und ist Steffen. Durch sein Vertrauen in mich, das Ertragen meiner Arbeitszeiten und seinen bedingungslosen Rückhalt half er mir über Durststrecken hinweg. Meinem Vater danke ich zudem für seine ausgeprägte Neugier und Interesse an meiner Arbeit.