

"Funktionelle Charakterisierung des *Arabidopsis* MAP-  
Kinase 6-Substrates, AtERF104, in Hinblick auf die basale  
Resistenz"

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

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalis

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau  
Diplom-Biologin  
Gerit Bethke

geb. am: 18.08.1980 in Ilmenau

Gutachter /in

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Klaus Humbeck
3. Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

Halle (Saale), 27.03.2009



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Pflanzen und ihre Umwelt</b>	<b>1</b>
1.1.1	Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogen	1
1.1.1.1	PTI ( <i>PAMP-Triggered Immunity</i> )	2
1.1.1.2	ETS ( <i>Effector-Triggered Susceptibility</i> )	3
1.1.1.3	ETI ( <i>Effector-Triggered Immunity</i> )	3
1.1.2	Unterschiedliche Lebensweisen von Pathogenen	4
1.1.3	Die Rolle des PAMPs flg22 in der basalen Resistenz	6
<b>1.2</b>	<b>MAPK-Kaskaden in <i>Arabidopsis thaliana</i></b>	<b>7</b>
1.2.1	MAPK-Kaskaden in der PAMP-assoziierten Signaltransduktion	9
1.2.2	Die Rolle von MAPKs in der Phytohormonsignaltransduktion	11
<b>1.3</b>	<b>Bereits für <i>Arabidopsis thaliana</i> beschriebene MAPK-Interaktoren</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>Die ERF-Genfamilie</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>19</b>
2.1.1	Chemikalien	19
2.1.2	Pflanzen	19
2.1.3	Zellkulturen	20
2.1.4	Bakterienstämme	20
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>20</b>
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1.1	Polymerase-Ketten-Reaktion	20
2.2.1.2	Agarosegele	21
2.2.1.3	Klonierungen	21
2.2.1.4	Restriktionen	23
2.2.1.5	Plasmidpräparationen	23
2.2.1.6	Transformationen	23

2.2.1.6.1	<i>Escherichia coli</i>	23
2.2.1.6.2	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	23
2.2.1.6.3	<i>Arabidopsis</i> -Protoplasten	24
2.2.1.6.4	<i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	25
2.2.1.7	Sequenzspezifische Mutagenese	25
2.2.1.8	Northern-Blot-Analysen	26
2.2.1.9	cDNA-Synthese und semiquantitative RT-PCR	26
2.2.1.10	Mikroarray-Analysen	27
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	27
2.2.2.1	Protein Extraktion	27
2.2.2.2	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	28
2.2.2.3	SDS-Gelelektrophorese	28
2.2.2.4	Western-Blot-Analyse	28
2.2.2.5	Immunkomplex-Kinase-Experiment	29
2.2.2.6	EMSA-Analysen ( <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> )	29
2.2.2.7	Messungen der GUS-Aktivität	29
2.2.2.8	ChIP	30
2.2.3	Färbungen	30
2.2.3.1	GUS-Färbung	30
2.2.3.2	DAB / Trypan-Blau	30
2.2.4	Mikroskopische Methoden	31
2.2.4.1	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)	31
2.2.4.2	Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)	31
2.2.5	Infektionen von <i>Arabidopsis</i> mit Pathogenen	32
2.2.5.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	32
2.2.5.2	<i>Botrytis cinerea</i>	32
2.2.5.3	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	33
2.2.6	Behandlung mit PAMPs und Inhibitoren	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der FRET-Methode</b>	<b>35</b>
3.1.1	Positiv- und Negativkontrollen	35
3.1.2	Validierung der FRET-Methode mit bekannten Mitgliedern einer MAPK-Kaskade	37

<b>3.2</b>	<b>FRET-Analyse für ausgewählte, in einer Hefe-2-Hybrid-Analyse</b>	
	<b>gefundene, MAPK-Interaktoren</b>	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Charakterisierung der AtMPK6- bzw. AtMPK11-AtERF104-Interaktion</b>	<b>44</b>
3.4.1	Die MAPK-AtERF104-Interaktion ist dynamisch	44
3.4.2	Der Einfluß des Ethylensignalweges auf die AtERF104-AtMPK6- Interaktion	47
3.4.2.1	Die Position von AtMPK6 im Ethylensignalweg	49
3.4.3	Die Rolle der endogenen AtMPK6 in der Auflösung der AtMPK6- AtERF104-Interaktion	52
3.4.4	Wirken die kinaseinaktiven AtMPK6-Varianten als „Substratfalle“?	54
<b>3.5</b>	<b>AtMPK6 phosphoryliert AtERF104</b>	<b>55</b>
<b>3.6</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von AtERF104</b>	<b>57</b>
3.6.1	AtERF104 kann an ein synthetisches GCC-Element binden	57
3.6.2	AtERF104 wirkt als Transkriptionsfaktor und kann Promotoren aktivieren, welche das GCC-Element enthalten	59
3.6.3	Einfluß von Phosphorylierungen auf die AtERF104- Transkriptionsfaktoraktivität und -Proteinstabilität	60
<b>3.7</b>	<b>Der Einfluß von AtERF104 auf die Expression von Abwehrgenen</b>	<b>62</b>
3.7.1	Mikroarray-Analysen	62
3.7.2	Analyse von Markergenen mittels semiquantitativer RT-PCR	64
3.7.3	AtPDF1.2 – ein direktes AtERF104 Zielgen	65
<b>3.8</b>	<b>AtERF104 Überexpressions- / Knockout- und RNAi-Linien – Eine phänotypische Analyse</b>	<b>66</b>
3.8.1	Wachstum und Entwicklung	67
3.8.2	flg22-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums	68
3.8.3	Pathogenbehandlungen	69
3.8.3.1	Biotrophes Pathogen: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	69
3.8.3.2	Nekrotrophes Pathogen: <i>Botrytis cinerea</i>	71
3.8.3.3	Nichtadaptiertes Pathogen: <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	72
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>74</b>

<b>4.1</b>	<b>Die Interaktion von AtMPK6 und AtERF104 ist auflösbar</b>	<b>74</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Position von AtMPK6 im Ethylensignalweg</b>	<b>75</b>
<b>4.3</b>	<b>AtERF104 ist ein in vivo-Substrat von AtMPK6</b>	<b>80</b>
4.3.1	Transkriptionsfaktor-Freigabe im Zellkern	80
4.3.2	Regulation der AtERF104-Proteinstabilität durch AtMPK6	81
4.3.3	Mikroarray-Analysen zeigen eine Aktivierung der Pathogenabwehr in AtERF104 <sup>OE</sup>	83
<b>4.4</b>	<b>Die Rolle von AtERF104 in der basalen Resistenz</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>Die Rolle von AtMPK11 in der PAMP-induzierten Signaltransduktion</b>	<b>87</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>90</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>101</b>
<b>7.1</b>	<b>pENSG-CFP/YFP</b>	<b>105</b>
<b>7.2</b>	<b>pEXSG-CFP/YFP</b>	<b>106</b>
<b>7.3</b>	<b>Primerliste</b>	<b>107</b>

## Abkürzungsverzeichnis

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
ABA	Abszisionsäure
Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure
ACS	ACC-Synthase
AGI	<i>Arabidopsis Genom Initiative</i>
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i> , Ackerschmalwand
ATP	Adenosintriphosphat
AVG	Aminoethoxyvinylglycin
Avr	Avirulenz
<i>Bc</i>	<i>Botrytis cinerea</i> , Grauschimmel
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	Centi, lat. <i>centesimus</i> = hundertster ( $10^{-2}$ )
ca.	circa
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i> , Blumenkohl Mosaik Virus
cDNA	<i>copy (complementary) DNA</i>
CFP	<i>Cyan Fluorescent Protein</i> , Cyanfluoreszierendes Protein aus <i>Aequorea victoria</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscope</i> , Konfokales Laser-Raster-Mikroskop
Col-0	Ökotyp Columbia von <i>A. thaliana</i>
ctr	<i>constitutive triple response</i>
d	lat. <i>dies</i> , Tag
d.h.	das heißt
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DRE	<i>Dehydration-responsive Element</i>
dNTP	Desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

## Abkürzungsverzeichnis

---

ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E <sub>F</sub>	Fluoreszenzeffizienz
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraacetat
ein	<i>ethylene-insensitive</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EREBP	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN
ERF	<i>ethylene response factor</i>
<i>et al.</i>	lat. <i>et alii</i> , und andere
ETI	<i>Effector-triggered Immunity</i>
etr	<i>ethylene-resistant</i>
ETS	<i>Effector-triggered Susceptibility</i>
f. sp.	lat. <i>forma specialis</i>
flg22	22 Aminosäuren langes Peptid aus der hochkonservierten N-terminalen Domäne von Flagellin
FLS2	<i>Flagellin Sensitive 2</i> (Rezeptorkinase)
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
g	Einheit der Fallbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , Grünfluoreszierendes Protein
h	lat. <i>hora</i> , Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HA	12 Aminosäuren langes Epitop (CYPYDVPDYASL) von Hämagglutinin A
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HR	Hypersensitive Reaktion
IgG	Immunglobulin G
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
K.O.	<i>knockout</i>
l	Liter
LB	Luria-Bertani
Ler	Ökotyp Landsberg von <i>Arabidopsis thaliana</i>



LRR	<i>leucine rich repeat</i>
m	Milli, lat. <i>millesimus</i> = tausendster ( $10^{-3}$ )
MAMP	<i>Microbe-associated molecular patterns</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MAP2K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase
MAP3K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase
MBP	<i>myelin basic protein</i> ; allgemeines Substrat von MAPK
MKP	MAPK Phosphatase
MKS1	MPK4 Substrat 1
MS	Murashige und Skoog
n	Nano, gr. <i>vávoς</i> , <i>nánoς</i> und ital. <i>nano</i> = Zwerg ( $10^{-9}$ )
NLS	<i>nuklear localisation signal</i> ; Kernimportsignal
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i> , Reis
ORF	<i>open reading frame</i>
p	statistische Wahrscheinlichkeit
P	Symbol für Phosphatgruppe
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> , pathogen-assoziierte Molekülmuster
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
<i>Pc</i>	<i>Petroselinum crispum</i> , Petersilie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pH	Maß für die Azidität einer Lösung
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	<i>pathogenesis related</i> ; mit der Pathogenese in Zusammenhang stehend
PTI	<i>PAMP-triggered Immunity</i>
pv.	Pathovar
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
s.	siehe

## Abkürzungsverzeichnis

---

STOP-Codon	Nukleotidmotiv, welches zum Abbruch der Translation führt, UAA, UAG und UGA
SOD	Superoxiddismutase
TAIR	<i>The Arabidopsis Information Resource</i>
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBST	<i>Tris buffered saline-Tween</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIR	<i>toll and IL-1-receptor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>unit(s)</i> ; Einheit(en)
u.a.	unter anderem
V	Volt
var.	Varietät
Vgl.	Vergleiche
Vol	Volumen
WT	Wildtyp
YFP	Gelb Fluoreszierendes Protein ( <i>Yellow Fluorescent Protein</i> )
z.B.	zum Beispiel
% (v/v)	<i>volume per volume</i> ; Volumenprozent
% (w/v)	<i>weight per volume</i> ; Gewichtsprozent
μ	Mikro, gr. <i>μικρός</i> , <i>mikrós</i> = klein ( $10^{-6}$ )
λ	Lambda, Symbol für Wellenlänge

**Verzeichnis der proteinogenen Aminosäuren mit Ein-Buchstaben-Code**

A	Alanin	N	Asparagin
B	Asparagin oder Aspartat	P	Prolin
C	Cystein	Q	Glutamin
D	Aspartat	R	Arginin
E	Glutamat	S	Serin
F	Phenylalanin	T	Threonin
G	Glycin	V	Valin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
K	Lysin	Z	Glutamin oder Glutamat
L	Leucin		
M	Methionin	X	beliebige Aminosäure



# 1 Einleitung

## 1.1 Pflanzen und ihre Umwelt

Pflanzen sind im Verlauf ihrer Individualentwicklung verschiedensten biotischen und abiotischen Streßsituationen ausgesetzt. Da Pflanzen, im Gegensatz zu tierischen Organismen, nicht über die Fähigkeit zur Lokomotion verfügen, mußten sie im Zuge der Evolution effektive Anpassungsreaktionen auf veränderliche Standortbedingungen entwickeln. Neben abiotischen Stressen wie Salz-, Wasser- und Temperaturstreß, kommen Pflanzen auch in Kontakt mit verschiedensten biotischen Einflüssen. Zu diesen biotischen Einflüssen zählen unter anderem Konkurrenz um Licht, Wasser und Nährstoffe mit anderen Pflanzen, Fraßfeinde wie Insekten und Säugetiere sowie pathogene Mikroorganismen. Solche Mikroorganismen können z.B. dem Reich der Bakterien, Pilze, Viren oder Oomyceten zugeordnet sein.

### 1.1.1 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogen

Obwohl sie in ihrer Umwelt Kontakt mit einer großen Anzahl von potentiell pathogenen Mikroorganismen haben, sind die meisten Pflanzen normalerweise gesund (Ingle *et al.*, 2006). Die Nicht-Wirts-Resistenz ist definiert als die Resistenz gegen alle Isolate einer bestimmten Mikrobenspezies (Nürnberger und Brunner, 2002). Ein wichtiger erster Schritt zur Gesunderhaltung der Pflanze ist die basale Resistenz. Die basale Resistenz ist der angeborenen Immunität tierischer Organismen ähnlich. Diese Abwehrleistung umfaßt einerseits präformierte chemische und physikalische Barrieren, wie Zellwand und Cuticula, andererseits werden induzierbare Abwehrmechanismen angeschaltet. Beispiele für solche induzierbaren Abwehrmechanismen sind die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, die Akkumulation von antimikrobiellen Substanzen, wie Phytoalexinen (Nürnberger *et al.*, 1994), Kalloseauflagerungen, der Verschluß der Stomata (Melotto *et al.*, 2006) und Zellwandverstärkungen (Schwessinger und Zipfel, 2008). Wichtig für die Initiierung dieser Abwehrmechanismen ist die Detektion der

Mikroben und Signaltransduktionsprozesse, die z.B. Calciumströme und Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK)-Kaskaden umfassen.

### 1.1.1.1 PTI (*PAMP-Triggered Immunity*)

Die Erkennung von Pathogenen geschieht vor allem über die Bindung sogenannter PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), auch MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) genannt, an Plasmamembran-gebundene Rezeptoren (Nürnberger *et al.*, 2004). PAMPs sind Molekülmuster, die in den Pflanzen selbst nicht vorkommen, von einer großen Zahl verschiedener Pflanzen erkannt werden, dabei in einer ganzen Klasse von Mikroorganismen weit verbreitet und dort für das Überleben wichtig sind (Schwessinger und Zipfel, 2008). Als Beispiele seien oberflächenassoziierte PAMPs wie das Pep13-Peptid einer Zellwand-Transglutaminase von *Phytophthora sojae* genannt (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002), weiterhin Lipopolysaccharide Gram-negativer Bakterien (Meyer *et al.*, 2001), Peptidoglycane Gram-positiver Bakterien (Gust *et al.*, 2007), das flg22-Peptid von Flagellin, dem Hauptbestandteil der Flagelle Gram-negativer Bakterien (Gomez-Gomez *et al.*, 1999), Zellwandbestandteile wie Chitin (Walker-Simmons *et al.*, 1983) oder  $\beta$ -Glucane (Klarzynski *et al.*, 2000). Aber auch innerhalb der Zelle befindliche Proteine wie der Translations-Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) können PAMPs darstellen (Kunze *et al.*, 2004). Normalerweise kommt es nach der Erkennung von PAMPs, früher auch als Elicitoren bezeichnet, nicht zu Zelltodreaktionen. Eines der wenigen Gegenbeispiele stellt die Familie der Nep1-ähnlichen Phytotoxine von Oomyceten dar, die ebenfalls die basale Resistenz anschalten und früher zu den Elicitoren gerechnet wurden (Qutob *et al.*, 2006). Diese basalen Abwehrprozesse werden auch als *PAMP-triggered immunity* (PTI) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Beispiele für Nicht-Wirts-Interaktionen in denen die basale Abwehr zur Resistenz führt sind z.B. die Interaktion von *Arabidopsis thaliana* mit dem Solanaceen-Pathogen *Phytophthora infestans* (Kamoun *et al.*, 1999), dem Bohnenpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Simonich und Innes, 1995; Ham *et al.*, 2007) oder dem Gerstenpathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Lipka *et al.*, 2008). Diese Organismen erzeugen starke Krankheitssymptome auf ihren Wirtspflanzen, sind jedoch nicht in der Lage andere Pflanzen, z.B. *Arabidopsis*, zu infizieren.

### 1.1.1.2 ETS (*Effector-Triggered Susceptibility*)

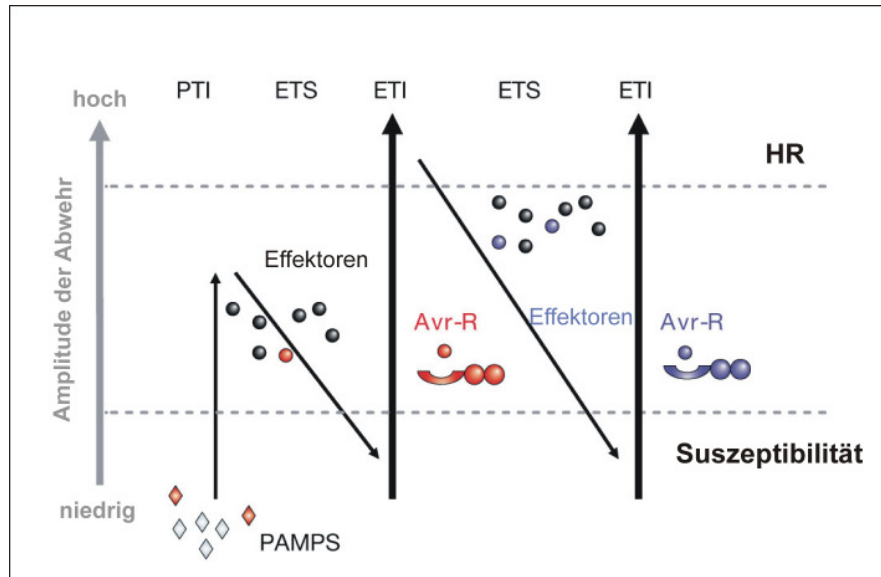
Natürlich gibt es auch Pathogene, gegen die diese präformierten Abwehrmechanismen nicht effektiv sind, oder die die basale Abwehr unterdrücken können. Bakterielle Pathogene können z.B. über das Typ-III-Sekretionssystem sogenannte Effektoren in die Pflanzenzelle einschleusen. Die Effektoren können die basalen Abwehrmechanismen unterdrücken. Diesen Prozeß bezeichnet man als *Effector-triggered susceptibility* (ETS) (Jones und Dangl, 2006). Beispielhaft für solche Effektoren sei HopPtoD2 aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* genannt. Dieses Protein zeigt *in vitro* Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivität und kann in Tabak die durch Expression einer konstitutiv aktiven MAPKK, *NtMEK2<sup>DD</sup>*, initiierten Zelltodreaktionen unterdrücken (Espinosa *et al.*, 2003). Weiterhin können AvrPto und AvrPtoB aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* frühe PAMP-aktivierte Abwehrprozesse und die initiierte Signaltransduktion in *Arabidopsis* unterdrücken (He *et al.*, 2006).

### 1.1.1.3 ETI (*Effector-Triggered Immunity*)

Im Verlauf der Evolution haben Pflanzen sogenannte R-Proteine vom NBS-LRR (*nucleotide binding site-leucine-rich repeat*)-Typ entwickelt (Chisholm *et al.*, 2006), welche die Effektoren entweder direkt (Jia *et al.*, 2000) oder indirekt (Mackey *et al.*, 2002) binden und damit perzipieren können. Solche Effektoren, die durch pflanzliche Resistenz-Proteine erkannt werden, bezeichnet man dann als Avr (Avirulenz)-Proteine, da sie sich negativ auf die Virulenz des Pathogens auswirken. Nach der Erkennung der Avr-Proteine werden dann Abwehrmechanismen angeschaltet, die zur *Effector-triggered immunity* (ETI) führen (Jones und Dangl, 2006). Dabei kommt es oftmals zur Hypersensitiven Reaktion (HR), die als Zelltodreaktion die weitere Ausbreitung biotropher Pathogene einschränken kann.

Im Verlauf der Koevolution von Pflanzen und Pathogenen überwinden Pathogene eventuell die ETI mit Hilfe neuer Effektoren, welche z.T. von neuen pflanzlichen R-Proteinen erkannt werden. Diese Pflanzen sind dann resistent. Daraufhin entwickeln Pathogene möglicherweise neue Effektoren und überwinden damit die pflanzliche Abwehr. Dieser Prozeß setzt sich im Verlauf der Evolution immer weiter fort. Zur

Visualisierung der hier beschriebenen Koevolution von Pflanzen und pathogenen Mikroorganismen ist in Abb. 1.1. das Zickzack-Modell von Jones und Dangl abgebildet (Jones und Dangl, 2006).



**Abb. 1.1 Das Zickzack-Modell:** zeigt die Koevolution von Pflanzen und Pathogenen. Pflanzen erkennen PAMPs potentieller Pathogene und erreichen dadurch Immunität (PTI – *PAMP-Triggered Immunity*). Pathogene injizieren jedoch Effektoren, z.B. über das Typ-III-Sekretionssystem, in die Pflanzenzelle, wo einige Effektoren helfen die PTI zu überkommen. Einige Pflanzen werden suszeptibel (ETS – *Effector-Triggered Susceptibility*). Im Zuge der Evolution haben Pflanzen sogenannte R-Gene entwickelt, welche die injizierten Effektoren z.T. erkennen können, diese erkannten Effektoren nennt man Avr-Proteine. Die Pflanze ist resistent gegen bestimmte Pathogene, deren Avr-Proteine sie durch ihre R-Proteine detektieren kann (ETI – *Effector-Triggered Immunity*). Einige Pathogene entwickeln neue Effektoren, welche die Abwehrreaktionen nach Avr-Protein-Erkennung überkommen können. Die Pflanze ist suszeptibel gegenüber diesen Pathogenen (ETS). Im Verlauf der Evolution können einige Pflanzen auch diese neuen Effektoren erkennen und entsprechende Abwehrmechanismen initiieren. Diese Pflanzen sind dann resistent (ETI). Im Verlauf der Koevolution zwischen Pflanze und Pathogen entwickeln einige der Pathogene immer wieder neue Effektoren, die von den Pflanzen z.T. erkannt werden können (Jones und Dangl, 2006).

## 1.1.2 Unterschiedliche Lebensweisen von Pathogenen

Pathogene können unterschiedliche Lebensweisen verfolgen. Einerseits gibt es biotroph lebende Pathogene, die zur Vervollständigung ihres Lebenszyklus auf das Vorhandensein lebender Wirtszellen angewiesen sind. Die Abwehr gegen solche Pathogene erfolgt meist über salizylsäureabhängige Wege und führt ultimativ zur Hypersensitiven Reaktion (HR), einer Zelltodreaktion, welche durch den Entzug der Nahrungsgrundlage zur Restriktion des Wachstums biotropher Pathogene führt. Beispiele für solche Pathogene sind *Hyaloperonospora parasitica* (früher *Peronospora parasitica*) oder *Erysiphe orontii* auf *Arabidopsis* (Koch und Slusarenko, 1990; Glazebrook, 2005). In transgenen *NahG*-



Pflanzen, die eine bakterielle Salizylat-Hydroxylase exprimieren, was zur Hydroxylierung der Salizylate führt, bzw. in der *npr1*-Mutante, wo das Ankyrin-repeat Protein *AtNPR1* mutiert ist, welches in der Regulation der salizylatabhängigen Antworten eine Rolle spielt, ist die Resistenz von *Arabidopsis* gegen *Hyaloperonospora parasitica* gebrochen (Thomma *et al.*, 1998). Markergene, die bei einer Reaktion mit einem biotroph lebenden Pathogen verstärkt exprimiert werden, sind z.B. *AtPR1* (*PATHOGENESIS-RELATED 1*), *AtPR2* und *AtPR5* (Penninckx *et al.*, 1996).

Andererseits können Pathogene eine nekrotrophe Lebensweise aufweisen. Diese Pathogene töten ihre Wirtspflanze und ernähren sich von den so freigesetzten Nährstoffen. Beispiele für solche Pathogene sind *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* auf *Arabidopsis*. Die Abwehr gegen solche Pathogene erfolgt meist jasmonat- (*Botrytis* und *Alternaria*) und z.T. ethylenabhängig (*Botrytis*). Zum Beispiel können in der *coil* (*coronatine insensitive 1*)-Mutante, wo das F-Box-Protein *AtCOI1* mutiert ist, welches eine Untereinheit des SCF-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellt, der für jasmonatabhängige Antworten benötigt wird, *Alternaria* und *Botrytis* deutlich besser wachsen (Thomma *et al.*, 1998). In *ein-2*, einer Mutante in dem Nramp-Protein *AtEIN2*, das am Ethylensignalweg beteiligt ist, konnte zwar *Botrytis* nicht aber *Alternaria* oder *Hyaloperonospora* besser wachsen (Thomma *et al.*, 1999). Es erfolgt normalerweise keine HR, welche solche nekrotrophen Pathogene bevorteilen würde. Die Markergene *AtPDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) und *AtERF1* (*ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1*) werden beim Befall mit nekrotrophen Pathogenen verstärkt exprimiert (Lorenzo *et al.*, 2003).

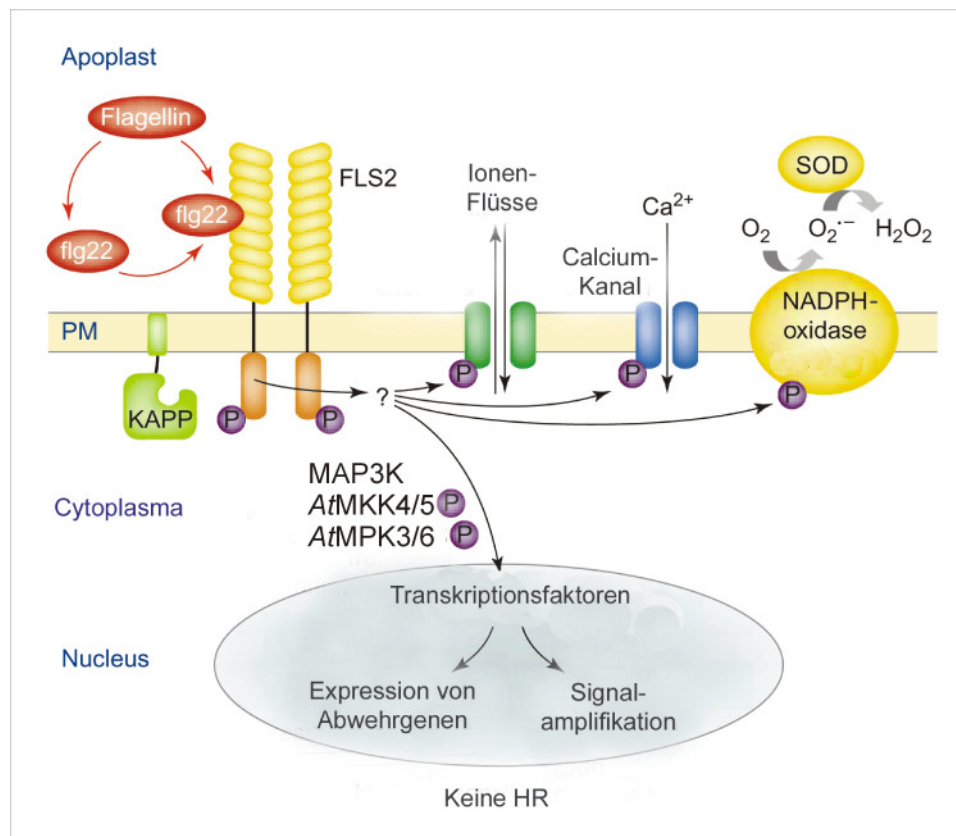
Weiterhin existieren hinsichtlich der Lebensweise auch Zwischenformen. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* weist beispielsweise eine hemibiotrophe Lebensweise auf (Glazebrook, 2005). Das heißt, daß das Pathogen zuerst biotroph lebt und im Verlauf des Fortschreitens der Infektion eine Umschaltung auf nekrotrophe Lebensweise erfolgt. Ein weiteres Beispiel für eine hemibiotrophe Lebensweise des Pathogens stellt die Infektion von Kartoffel mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* dar.

### 1.1.3 Die Rolle des PAMPs flg22 in der basalen Resistenz

Der in den vorliegenden Analysen verwendete PAMP, flg22, ist ein 22 Aminosäuren langes Peptid aus der hochkonservierten N-terminalen Domäne des bakteriellen Flagellins. *Agrobacterium tumefaciens* und *Rhizobium meliloti* zeigen ein verändertes flg22-Epitop und können dadurch die basale Resistenz umgehen (Felix *et al.*, 1999).

Flg22 wird durch die Rezeptorkinase AtFLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE 2) über einen AtFLS2-AtBAK1 (BRI1-ASSOCIATED KINASE 1)-Komplex erkannt (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Chinchilla *et al.*, 2007). Die direkte Bindung an AtFLS2 wurde nachgewiesen (Chinchilla *et al.*, 2006). Nach flg22-Erkennung werden verschiedene Abwehrreaktionen initiiert, diese umfassen Calciumflüsse, die Aktivierung von zwei verschiedenen MAP-Kinase (MAPK)-Kaskaden, Ethylenproduktion, Kalloseauflagerungen und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Diese Abwehrmechanismen sind in Abbildung 1.2 dargestellt (Gomez-Gomez und Boller, 2002). Eine der MAPK-Kaskaden umfaßt eine bislang unbekannte MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K), die MAPK-Kinase-Kinasen (MAP2Ken) AtMKK4 und AtMKK5 sowie die MAPKen AtMPK3 und AtMPK6 (Asai *et al.*, 2002; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Die andere Kaskade besteht aus der MAP3K AtMEKK1, den MAP2Ken AtMKK1 und AtMKK2 und der MAPK AtMPK4 (Ichimura *et al.*, 2006; Meszaros *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2008). Außerdem werden verschiedene Abwehrgene unter anderem AtPRI (PATHOGENESIS-RELATED 1), AtPR5, AtFRK1 (FLAGELLIN-RECEPTOR KINASE 1), AtPAL1 (PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE 1), AtGST1 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE 1) und AtWRKY29 nach flg22-Behandlung verstärkt exprimiert (Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Asai *et al.*, 2002).

Pathogene Bakterien infizieren Wirtspflanzen meist über natürliche Öffnungen z.B. Stomata. Die Perzeption von flg22 führt zum Schluß der Stomata in *Arabidopsis* und Tomate. Interessanterweise kann das adaptierte Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 diesen Verschuß der Stomata durch Sekretion des Jasmonatanalogen Coronatin inhibieren (Melotto *et al.*, 2006).



**Abb. 1.2 Modell der flg22-induzierten Signaltransduktionsprozesse in *Arabidopsis thaliana*:** Nach Bindung von flg22 an die Rezeptorkinase AtFLS2 werden verschiedenste Signaltransduktionsprozesse initiiert. Es kommt zu Ionenflüssen, Calciumströmen, zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und zur Aktivierung von MAPK-Kaskaden. Eine MAPK-Kaskade, die in Reaktion auf flg22-Behandlung angeschaltet wird, enthält eine unbekannte MAP3K, die MAP2Ken AtMKK4 und AtMKK5 sowie die MAPKEN AtMPK3 und AtMPK6. Die MAPKEN induzieren vermutlich die Transkriptionsfaktor-vermittelte Expression von Abwehrgenen. Transkriptionsfaktoren wirken auch in der Signalamplifikation. Nach flg22-Behandlung kommt es nicht zur HR (Gomez-Gomez und Boller, 2002).

## 1.2 MAPK-Kaskaden in *Arabidopsis thaliana*

MAPK-Kaskaden sind evolutionär konservierte Proteinkinase-Kaskaden, die bei der Integration extrazellulärer Signale in zelluläre Antworten in allen Eukaryoten eine Rolle spielen. Sie bestehen in der Regel aus drei Kinasetypen, die konsekutiv angeordnet sind, einer MAP3K, einer MAP2K und einer MAPK. MAP3Ken sind Serin-/Threonin-Kinasen, die zwei Aminosäuren im konservierten Serin/Threonin-xxxxx-Serin/Threonin-Motiv der pflanzlichen MAP2K phosphorylieren und diese dadurch aktivieren. MAP2Ken sind dualspezifische Kinasen, die MAPKEN durch duale Phosphorylierung innerhalb des Threonin-X-Tyrosin-Motives der Aktivierungsdomäne (*activation-*, *T-loop*) zwischen den Kinasedomänen VII und VIII aktivieren (Ichimura *et al.*, 2002).

MAPKen, die finalen Komponenten der MAPK-Kaskaden, sind Serin-/Threonin-Kinasen, die eine ganze Reihe verschiedener Substrate phosphorylieren können, unter anderem andere Kinasen oder Transkriptionsfaktoren (Ichimura *et al.*, 2002). Möglicherweise können auch MAP3K-Kinasen (MAP4Ken) als Adaptoren dienen, um im Signalweg übergeordnete Komponenten mit den MAP3Ken zu verbinden (Champion *et al.*, 2004). Die Spezifität der MAPK-Kaskaden wird vermutlich über Interaktionsmotive der MAPKen selbst, z.B. besitzen MAP3Ken regulatorische Domänen (Asai *et al.*, 2002), oder über die Bildung von MAPK-Komplexen mit Hilfe von Gerüst-Proteinen erreicht. Solche Gerüst-Proteine wurden für Hefe und Säuger bereits dokumentiert (Gustin *et al.*, 1998). Weitere Regulationsmechanismen sind Dephosphorylierungen über MAPK-Phosphatasen (MKP), welche die Signalstärke oder den zeitlichen Verlauf der MAPK-Aktivität steuern können (Colcombet und Hirt, 2008). Zum Beispiel kann die PP2C-Typ Serin-/Threonin-Phosphatase *AtAP2C1 AtMPK6* und *AtMPK4* dephosphorylieren und dadurch einen Einfluß auf die angeborene Immunität in *Arabidopsis* ausüben (Schweighofer *et al.*, 2007).

In *Arabidopsis* wurden bisher, entsprechend Homologie-Vergleichen, 20 MAPKen, zehn MAP2Ken und ca. 80 MAP3Ken gefunden (Ichimura *et al.*, 2002; Colcombet und Hirt, 2008). Die MAP3Ken lassen sich in drei Untergruppen einteilen, MEKK (MAPK /ERK Kinase Kinase)-ähnliche, Raf-ähnliche bzw. ZIK-ähnliche MAP3Ken. In Pflanzen konnte bislang nur für die 20 Mitglieder der MEKK-Familie MAP3K-Aktivität nachgewiesen werden. Diese Familie ist bislang am besten untersucht und beinhaltet unter anderem *AtMEKK1*, *AtYODA* und *AtANP1* (Colcombet und Hirt, 2008). Ein bekanntes Beispiel für eine der 48 Raf-ähnlichen MAP3Ken stellt *AtCTR1* (Constitutive Triple Response 1) dar (Kieber *et al.*, 1993). MAP2Ken und MAPKen stellen wesentlich homogenere Gruppen als die MAP3Ken dar. Sie werden jeweils in vier Untergruppen (A bis D) eingeteilt und verhalten sich sehr ähnlich ihren tierischen oder Hefe-Homologen (Ichimura *et al.*, 2002). MAP2Ken stellen die am geringsten diverse Gruppe innerhalb der MAPK-Gruppe dar. Pflanzliche MAP2Ken besitzen eine N-terminale MAPK-Bindedomäne mit einer [K/R] [K/R] [K/R] x(1-5) [L/I] x [L/I] Konsensussequenz (Ichimura *et al.*, 2002). Da in primitiven Algen nur jeweils eine MAP2K gefunden wurde (Merchant *et al.*, 2007), nimmt man an, daß sich in höheren Pflanzen die verschiedenen MAPK-Signalwege aus einer Kaskade evolviert haben könnten (Colcombet und Hirt, 2008). MAPKen teilt man entsprechend ihrer Phosphorylierungsstelle in die TDY (Threonin-Asparaginsäure-Tyrosin)-Kinasen (Gruppe D) und die TEY (Threonin-

Glutaminsäure-Tyrosin)-MAPKEn der Gruppen A bis C ein. Zur Untergruppe A zählen hauptsächlich MAPKEn die in der Signalweiterleitung nach Umwelteinflüssen und Hormonbehandlung eine Rolle spielen, u.a. *AtMPK3* und *AtMPK6*. Die MAPKEn der Untergruppe B sind weniger gut untersucht, scheinen aber in der Reaktion auf Umweltstress und in der Kontrolle der Zellteilung eine Rolle zu spielen, dazu zählen z.B. *AtMPK4* und *AtMPK11*. Zur Untergruppe C gibt es kaum Informationen. Beispielfhaft seien *AtMPK1*, *AtMPK2*, *AtMPK7* und *AtMPK14* genannt (Ichimura *et al.*, 2002). Die Mitglieder der Untergruppen A und B besitzen im C-terminalen Bereich eine evolutionär konservierte CD-Domäne, die als Bindestelle für MAP2KEn, Phosphatasen und Substrate dient und folgende Konsensussequenz aufweist: [LH] [LHY] D x x [DE] x x [DE] E p x C (Ichimura *et al.*, 2002).

MAPKEn spielen in *Arabidopsis* bei vielen verschiedenen Prozessen eine Rolle. Dazu zählen die Reaktionen auf abiotischen und biotischen Stress, die Entwicklung der Stomata sowie die Reaktion auf Phytohormone.

### 1.2.1 MAPK-Kaskaden in der PAMP-assoziierten Signaltransduktion

Wie bereits in Abschnitt 1.1.3 erwähnt, werden die MAPKEn *AtMPK3*, *AtMPK4* und *AtMPK6* nach *flg22*-Behandlung aktiviert. Diese Kinasen sind auch allgemein die bestuntersuchten MAPKEn in *Arabidopsis*. Zur Funktion anderer MAPKEn gibt es bis jetzt nur wenige Informationen.

Asai *et al.* (2002) beschrieben eine MAPK-Kaskade aus der MAP3K *AtMEKK1*, den MAP2KEn *AtMKK4* und *AtMKK5* und den MAPKEn *AtMPK3* und *AtMPK6*. Für diese Untersuchungen wurde allerdings eine konstitutiv aktive Variante von *AtMEKK1* verwendet, der eine regulatorische Domäne fehlte. Neuere Untersuchungen zeigten, daß in *mekk1* weiterhin Aktivierung von *AtMPK3* und *AtMPK6*, nicht jedoch von *AtMPK4* erfolgt (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Das bedeutet, daß *AtMEKK1* nicht notwendig für die Aktivierung von *AtMPK3* und *AtMPK6* und möglicherweise nicht die MAP3K in dieser Kaskade ist. Welche MAP3K in dieser MAPK-Kaskade eine Rolle spielt ist umstritten. Colcombet und Hirt (2008) vermuten, daß eventuell *AtYODA* die nunmehr fehlende MAP3K sein könnte, da *AtYODA* *AtMKK4*-/*AtMKK5*-vermittelt *AtMPK3* und *AtMPK6* in einer Kaskade aktivieren kann, die bei der Stomata-Entwicklung eine Rolle

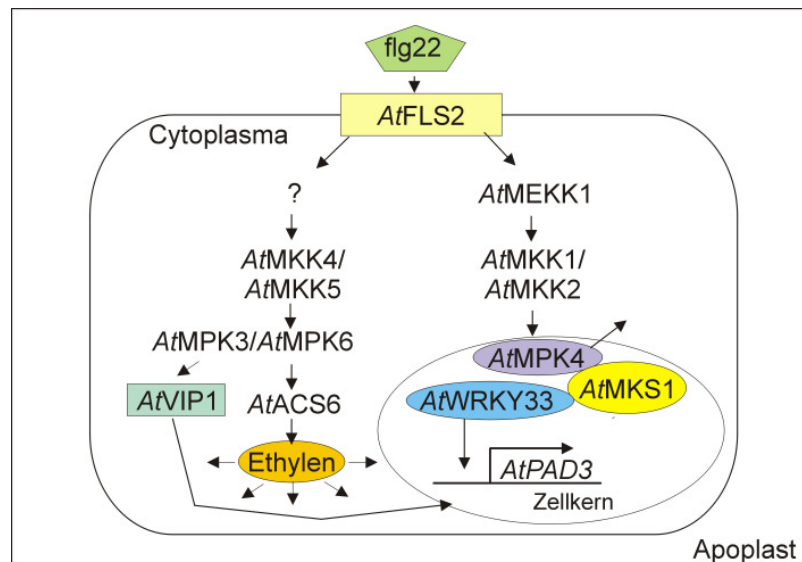
spielt (Wang *et al.*, 2007). Diese Vermutung widerspricht jedoch der Annahme, daß die Signalspezifität einzelner MAPK-Kaskaden durch das Zusammenwirken aller Mitglieder determiniert wird und nicht durch die MAPKs allein.

Für *AtMPK4* konnte in letzter Zeit eine MAPK-Kaskade mit der MAP3K *AtMEKK1* und den MAP2Ks *AtMKK1* und *AtMKK2* identifiziert werden (Petersen *et al.*, 2000; Meszaros *et al.*, 2006; Brader *et al.*, 2007; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008). Eine Zusammenfassung der durch *flg22*-induzierten MAPK-Kaskaden liefert Abbildung 1.3.

Auch in Antwort auf andere PAMPs werden ähnliche Signaltransduktionsprozesse wie nach *flg22*-Behandlung aktiviert. EF-Tu z.B. initiiert Ethylenproduktion, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies aber auch die Aktivierung von MAPKs (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Durch Chitin-Behandlung können die MAPKs *AtMPK3* und *AtMPK6* aktiviert werden (Wan *et al.*, 2008). Harpin kann die MAPKs *AtMPK4* und *AtMPK6* in *Arabidopsis* Zellkulturen aktivieren (Desikan *et al.*, 2001). Auch *PpNLP* (Nep1-like protein) aus *Phytophthora parasitica* kann MAPKs aktivieren (Qutob *et al.*, 2006).

Das heißt verschiedenste PAMPs aktivieren ähnliche MAPKs und die PAMP-assoziierten MAPK-Kaskaden in Pflanzen scheinen stark konserviert zu sein. Vielleicht stellen solche MAPK-Kaskaden daher Komponenten der basalen Resistenz dar, die von vielen Effektoren als Angriffspunkt (Shan *et al.*, 2007) genutzt werden. Interessanterweise führt die Behandlung mit *flg22*, EF-Tu und Chitin nicht zur HR, jedoch kann man HR-ähnliche Symptome nach Harpin- und NLP-Behandlung beobachten.

Nicht nur für PAMPs auch für Pathogene selbst konnte MAPK-Aktivierung beobachtet werden: In Tabak-Zellkultur z.B. nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus (Zhang und Klessig, 1998), in Soja-Zellkulturen nach Behandlung mit *Pseudomonas* (Anstätt und Tenhaken, 2003) und in *Arabidopsis*-Pflanzen nach Behandlung mit *Botrytis cinerea* (Ren *et al.*, 2008).



**Abb. 1.3 MAPK-Kaskaden nach flg22-Behandlung:** Flg22 aktiviert zwei verschiedene MAPK-Kaskaden. Eine enthält eine bislang unbekannte MAP3K, die MAP2Ken AtMKK4 und AtMKK5 und die MAPKen AtMPK3 und AtMPK6. AtMPK3 phosphoryliert AtVIP1, welches in den Kern wandert und dort die PR-Genexpression initiiert. AtMPK6 phosphoryliert AtACS6, was zur Ethylenproduktion führt. Die andere MAPK-Kaskade enthält die MAP3K AtMEKK1, die MAP2Ken AtMKK1 und AtMKK2, sowie die MAPK AtMPK4. AtMPK4 liegt vor Elicitation im Zellkern in einem Komplex mit AtMKS1 und AtWRKY33 vor. Nach Elicitation phosphoryliert AtMPK4 AtMKS1 und es kommt zur Auflösung des Komplexes und damit verbunden zur Freisetzung von AtWRKY33. AtWRKY33 bindet nun an den AtPAD3-Promotor und initiiert die AtPAD3-Expression. Pathogenerkennung führt zur Produktion des Phytoalexins Camalexin, Erkennung des PAMP flg22 selbst nicht (Petersen *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002; Liu und Zhang, 2004; Andreasson *et al.*, 2005; Djamei *et al.*, 2007; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Qiu *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008).

## 1.2.2 Die Rolle von MAPKen in der Phytohormonsignaltransduktion

MAPK-Kaskaden spielen auch für die Feinsteuerung von Phytohormon-Signalwegen eine Rolle. Wie bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, spielen salizylatinduzierte Prozesse eine Rolle bei der Abwehr von biotrophen Pathogenen, jasmonat- und ethylenabhängige Prozesse hingegen spielen eine Rolle bei der Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene (Glazebrook, 2005). Petersen *et al.* (2000) konnten zeigen, daß in der *mpk4*-Mutante, die Zwergwuchs aufwies, neunfach erhöhte Salizylatwerte im Vergleich zum Wildtyp (Ler) vorlagen. Weiterhin waren die Markergene *AtPR1*, *AtPR2* und *AtPR5* für salizylatabhängige Antwortprozesse in diesen Mutanten konstitutiv exprimiert. Die *mpk4*-Mutanten wiesen zusätzlich eine verstärkte Resistenz gegen das hemibiotrophe Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und das biotrophe Pathogen *Hyaloperonospora parasitica* auf. In weiterführenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß in *mpk4* die ethylenabhängige Aktivierung von *AtPDF1.2* nicht stattfinden

kann und *mpk4* suszeptibler gegen das nekrotrophe Pathogen *Alternaria brassicicola* war (Brodersen *et al.*, 2006). *AtMPK4* scheint also den Salizylatweg negativ und den Ethylen-/Jasmonat-Weg positiv zu regulieren. Suarez-Rodriguez *et al.* (2007) beschrieben die Rolle von *AtMEKK1* im *AtMPK4*-Signalweg. In *mekk1* erfolgte keine flg22-abhängige *AtMPK4*-Aktivierung. Weiterhin zeigte *mekk1* einen starken Zwergwuchs, konstitutive PR-Gen-Expression und Kalloseablagerungen. Unlängst beschrieben zwei Gruppen (Gao *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008) die Rolle von *AtMCKK1* und *AtMCKK2* in diesem Signalweg. Auch die *mkk1/mkk2*-Doppelmutante zeigte einen starken Zwergwuchs, einen erhöhten Salizylatgehalt, konstitutive PR-Genexpression und verstärkte Resistenz gegen das hemibiotrophe Pathogen *Pseudomonas syringae* und das biotrophe Pathogene *Hyaloperonospora parasitica*. Eine MAPK-Kaskade aus der MAP3K *AtMEKK1*, den MAP2Ken *AtMCKK1* und *AtMCKK2* sowie der MAPK *AtMPK4* scheint also salizylatabhängige Signaltransduktion negativ zu beeinflussen.

Für *AtMPK6* hingegen konnte gezeigt werden, daß diese MAPK sowohl durch ethylenabhängige Signaltransduktion (Ouaked *et al.*, 2003; Yoo *et al.*, 2008) als auch durch Jasmonat-Behandlung (Takahashi *et al.*, 2007) aktiviert wird. Weiterhin spielt *AtMPK6* auch eine Rolle in der Regulation der Ethylenbiosynthese (Kim *et al.*, 2003; Liu und Zhang, 2004; Joo *et al.*, 2008; Abb. 1.4). Ouaked *et al.* (2003) zeigten, daß *AtMPK6* und eventuell *AtMPK13* in einer MAPK-Kaskade mit der MAP3K *AtCTR1* liegen. Diese Untersuchungen waren jedoch umstritten, da die Untersuchungen einige technische Fehler (Ecker, 2004) aufwiesen und es ungewöhnlich erschien, daß diese MAPK-Kaskaden negativ regulierend wirken. Außerdem wurde gleichzeitig veröffentlicht, daß *AtMPK6* eine Rolle bei der Initiierung der Ethylenbiosynthese spielt, da sie zwei Isoformen der ACC-Synthase *AtACS2* und *AtACS6* phosphoryliert, was die Proteinstabilität von *AtACS6* erhöht, und damit einen positiven Einfluß auf die Ethylenbiosynthese hat (Liu und Zhang, 2004; Joo *et al.*, 2008).

Kürzlich wurde die Untersuchung von Ouaked *et al.* (2003) durch die Arbeiten von Yoo *et al.* (2008) aber zum Teil bestätigt. In dieser Publikation wurde gezeigt, daß *AtMPK3* und *AtMPK6* tatsächlich eine Rolle in einer MAPK-Kaskade mit *AtMCKK9* spielen, welche von *AtCTR1* negativ reguliert wird (s. Abb. 1.5). Diese MAPK-Kaskade stabilisiert *AtEIN3* durch Phosphorylierung an einer bestimmten Phosphorylierungsstelle (T592), ein paralleler durch *AtCTR1* positiv regulierter Weg destabilisiert *AtEIN3* hingegen durch Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T174. Weiterhin



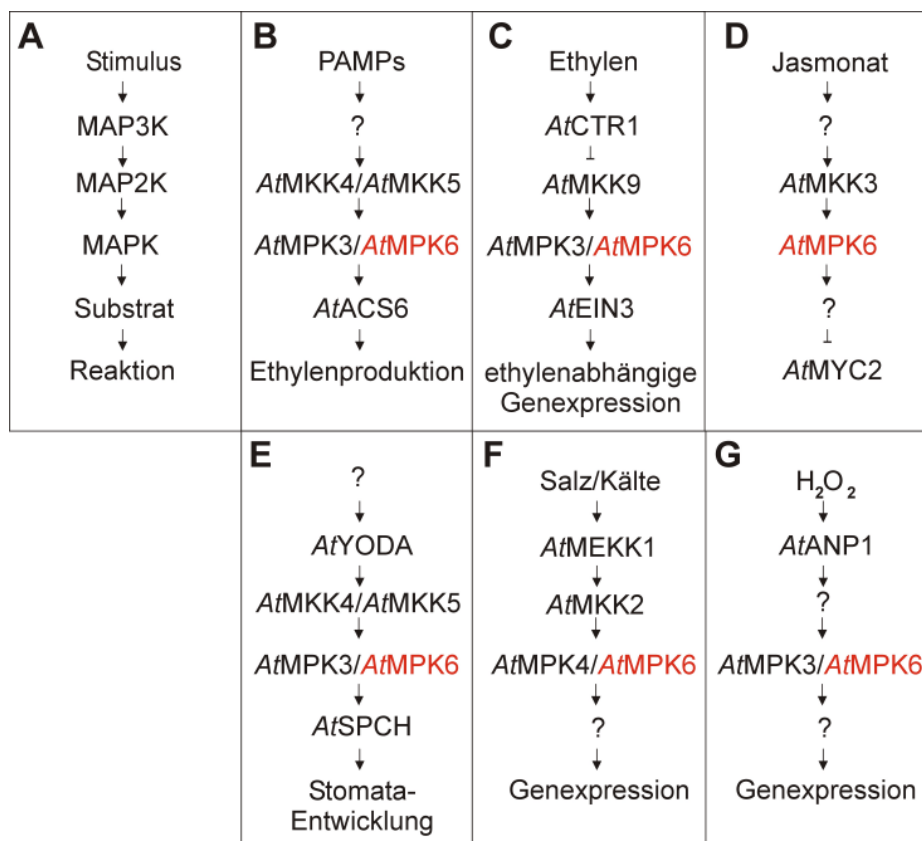
wurden zusätzliche *AtMPK3/AtMPK6*-unabhängige Wege der Ethylensignaltransduktion postuliert.

Eine Beteiligung von MAPKen an der wundinduzierten Jasmonatsignaltransduktion wurde zuerst für das Tabak-Homologe von *AtMPK3*, *NtWIPK*, beschrieben (Seo *et al.*, 1995). Takahashi *et al.* (2007) beschrieben kürzlich die jasmonatabhängige Aktivierung von *AtMPK6* über *AtMKK3*. Diese MAPK-Kaskade reguliert Jasmonat-Reaktionen und die jasmonatinduzierte Expression von Genen, wie *AtMYC2*, negativ. Allerdings wurde keine direkte Bindung von *AtMKK3* an *AtMPK6* gezeigt. Von Doczi *et al.* (2007) wurde eine direkte Bindung von *AtMKK3* an *AtMPK1*, *AtMPK2*, *AtMPK7* und *AtMPK14*, die Gruppe C-MAPKen, mittels Hefe-2-Hybrid-Analyse und für *AtMPK7* mittels Koimmunfällung gezeigt. Weiterhin konnte die *AtCOI1*-abhängige Aktivierung von *AtMPK1* und *AtMPK2* durch Verwundung und Jasmonatbehandlung gezeigt werden (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). Daher vermuten Colcombet und Hirt (2008), daß die *AtMKK3* abhängige Aktivierung von *AtMPK6* nicht direkt verläuft, sondern über die Gruppe C MAPKen. Da aber keine Beispiele bekannt sind, in denen MAPKen andere MAPKen phosphorylieren, kann man vermuten, daß *AtMPK6* eventuell parallel zu den Gruppe C-MAPKen aktiviert wird. Weiterführende Analysen müßten allerdings die Bindung von *AtMKK3* an *AtMPK6* bestätigen um eine solche Vermutung zu validieren.

Auch Abszissinsäure (ABA), ein Phytohormon, das bei der Reaktion auf verschiedene abiotische Stresse, wie Wasserstreß, eine Rolle spielt, konnte die jasmonataktivierbaren MAPKen *AtMPK1* und *AtMPK2* aktivieren (Ortiz-Masia *et al.*, 2007). Weiterhin ist bekannt, daß *AtMPK3* eine Rolle beim ABA-induzierten Verschluß der Stomata spielt (Gudesblat *et al.*, 2007). Einen indirekten Hinweis auf die Rolle von MAPKen in der ABA-Signaltransduktion geben zwei MAPK-Phosphatasen, *AtIBR5* (*INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSE 5*) ist partiell ABA-resistent (Monroe-Augustus *et al.*, 2003) und *AtABI1* (*ABA-INSENSITIVE 1*) ebenfalls ABA insensitiv. Für *AtABI1*, eine PP2C-Phosphatase, wurde mittels Hefe-2-Hybrid und *in planta* eine Interaktion mit *AtMPK6* festgestellt. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß *AtMPK12* mit *AtIBR5*, einem Modulator von ABA und Auxinsignaltransduktion, interagiert und die auxinabhängige Signalgebung reguliert (Lee *et al.*, 2008).

Man kann also feststellen, daß MAPKen in der Reaktion auf verschiedenste biotische und abiotische Signale aktiviert werden. Im Zusammenhang mit solchen Streßsituationen steht die Modulation verschiedenster Prozesse durch Phytohormone. Diese Phytohormone bilden ein sich gegenseitig positiv bzw. negativ regulierendes Netzwerk.

In dieses Netzwerk sind MAPK-Kaskaden involviert. Auch hier ist die Aktivierung der MAPKen, *AtMPK6*, *AtMPK4* und *AtMPK3* am besten untersucht. Möglicherweise wird die Spezifität der MAPK-Signalweiterleitung nicht durch die MAPKen selbst, sondern durch die anderen Mitglieder der MAPK-Kaskaden determiniert. *AtMPK6* beispielweise initiiert in Reaktion auf biotischen Streß die Ethylenbiosynthese. In der zugehörigen MAPK-Kaskade spielen die MAP2Ken *AtMKK4* und *AtMKK5* eine Rolle. Ethylensignaltransduktion hingegen aktiviert *AtMPK3* und *AtMPK6* über *AtMKK9*. Auch Jasmonat aktiviert *AtMPK6*, dies geschieht vermittelt über *AtMKK3*. Weiterhin ist es möglich, daß die Spezifität der MAPK-Signalweiterleitung über die Kinetik der MAPK-Aktivierung oder die Lokalisation der Signaltransduktions-Komponenten gesteuert wird. Eine zusammenfassende Darstellung der MAPK-Kaskaden die *AtMPK6* enthalten bietet Abbildung 1.4.



**Abb. 1.4 Signaltransduktionsprozesse in denen *AtMPK6* eine Rolle spielt:** In **A**) ist die allgemeine Struktur einer MAPK-Kaskade gezeigt. In **B**) ist die Signaltransduktion nach PAMP-Erkennung gezeigt, hier wird das *AtMPK6*-Substrat *AtACS6* phosphoryliert und damit die Ethylenbiosynthese angeschaltet (Asai *et al.*, 2002; Liu und Zhang, 2004). Abbildung **C**) zeigt die MAPK-abhängige Ethylensignaltransduktion. *AtCTR1* reguliert eine MAPK-Kaskade aus *AtMKK9* und *AtMPK3* und *AtMPK6* negativ, welche *AtEIN3* phosphoryliert und damit stabilisiert und die ethylenabhängige Genexpression initiiert (Yoo *et al.*, 2008). Auch Jasmonat aktiviert eine MAPK-Kaskade, in der *AtMPK6* *AtMKK3*-abhängig phosphoryliert wird (Takahashi *et al.*, 2007) und einen negativen Einfluß auf die Expression von *AtMYC2* hat (**D**). *AtMPK6* spielt auch eine Rolle in der Regulation der Stomataentwicklung (**E**). Hier werden *AtMPK6* und *AtMPK3* über

*At*MKK4 und *At*MKK5 sowie *At*YODA aktiviert. *At*MPK3 und *At*MPK6 können dann *At*SPEECHLESS (*At*SPCH) aktivieren und dadurch die Stomataentwicklung steuern (Wang *et al.*, 2007; Lampard *et al.*, 2008). In **F**) sieht man, daß Kälte- und Salzstreß *At*MPK6 und *At*MPK4 über *At*MKK2 und *At*MEKK1 aktivieren (Teige *et al.*, 2004). Auch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) kann *At*MPK6 zusammen mit *At*MPK3 aktivieren (**G**). Die MAP3K in dieser MAPK-Kaskade ist *At*ANP1 (*Arabidopsis* NPK1 (*Nicotiana* protein kinase 1)-related kinase 1) die MAP2K ist bislang unbekannt (Kovtun *et al.*, 2000).

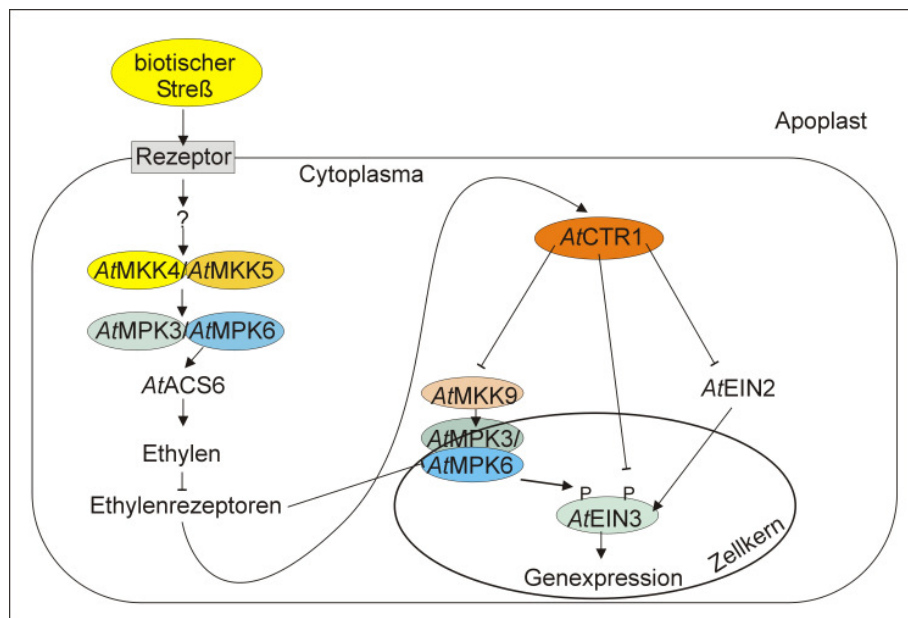
### 1.3 Bereits für *Arabidopsis thaliana* beschriebene MAPK-Interaktoren

Erst in den letzten Jahren konnten die ersten MAPK-Substrate/-Interaktoren in Pflanzen identifiziert werden. Beispielsweise interagiert *At*NDPK2 mit den MAPKs *At*MPK3 und *At*MPK6 (Moon *et al.*, 2003). Die ersten MAPK-Substrate, *At*ACS2 und *At*ACS6 wurden von Liu und Zhang (2004) beschrieben. Phosphorylierung von *At*ACS6 durch *At*MPK6 nach flg22-Behandlung führt hierbei zur Stabilisierung des *At*ACS6-Proteins und zu verstärkter Ethylenbiosynthese (Liu und Zhang, 2004; Joo *et al.*, 2008; Abb. 1.5). Kurz darauf wurde *At*MKS1 als erstes *At*MPK4-Substrat von Andreasson *et al.* (2005) beschrieben. Dieses VQ-Motiv-enthaltende Protein rekrutiert die Transkriptionsfaktoren *At*WRKY33 und *At*WRKY25 (Andreasson *et al.*, 2005). Weiterhin wurde kürzlich beschrieben, daß *At*MPK4 und *At*WRKY33 in einer *At*MKS1-vermittelten Weise als Komplex im Zellkern vorliegen. Nach Aktivierung von *At*MPK4 durch *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 oder flg22 wird *At*MKS1 von *At*MPK4 phosphoryliert. Dadurch wird der *At*MPK4-*At*MKS1-*At*WRKY33-Komplex aufgelöst und *At*WRKY33 freigesetzt. *At*WRKY33 bindet dann an den *At*PAD3-Promotor was zur Expression von *At*PAD3 (s. Abb. 1.3) und im Falle der Erkennung von *Pseudomonas* zur Biosynthese von Camalexin, einem Phytoalexin, führt (Qiu *et al.*, 2008). Nach der Erkennung von flg22 kommt es nicht zur Camalexin-Biosynthese.

*At*VIP1 (VirE2-INTERACTING PROTEIN 1), ein bZIP (*basic leucine zipper*)-Transkriptionsfaktor, wurde als erstes *At*MPK3-Substrat beschrieben Djamei *et al.* (2007). Nach flg22-Behandlung phosphoryliert *At*MPK3 *At*VIP1, was zur Translokation von *At*VIP1 in den Zellkern und damit verbunden zur Expression von Abwehrgenen wie *At*PR1 führt. *Agrobacterium tumefaciens* nutzt diesen *At*MPK3-abhängigen Abwehrmechanismus um seine Transfer (T)-DNA in den Zellkern zu transportieren (Djamei *et al.*, 2007).

Ein weiteres *AtMPK3/AtMPK6*-Substrat stellt *AtEIN3* dar, ein Transkriptionsfaktor im Ethylensignalweg, der die Expression von *AtERF1* reguliert (Yoo *et al.*, 2008). Eine MAPK-Kaskade aus *AtMKK9*, *AtMPK3* und *AtMPK6*, welche negativ durch *AtCTR1* reguliert ist, phosphoryliert *AtEIN3*. Durch die Phosphorylierung wird das *AtEIN3*-Protein stabilisiert, was dazu führt, daß Ethylensignaltransduktion stattfindet. Ein weiterer *AtCTR1*-abhängiger Weg führt zur Phosphorylierung von *AtEIN3* an einer weiteren Phosphorylierungsstelle, was zur Destabilisierung von *AtEIN3* und dadurch zur Inhibierung der Ethylensignalweitergabe führt (Yoo *et al.*, 2008; Abb. 1.5).

Kürzlich konnte als *in vitro*-Substrat von *AtMPK3* und *AtMPK6* *AtSPEECHLESS*, ein bHLH (*basic helix-loop-helix*)-Transkriptionsfaktor, der eine Rolle in der Stomataentwicklung spielt, identifiziert werden (Lampard *et al.*, 2008).



**Abb. 1.5 Zusammen zwischen Ethylenproduktion, -signaltransduktion und MAPK-Kaskaden nach Yoo *et al.* (2008):** Biotischer Streß aktiviert die MAP2Ken *AtMKK4* und *AtMKK5* und die MAPKen *AtMPK3* und *AtMPK6*. *AtMPK6* phosphoryliert und stabilisiert dadurch *AtACS6*, was zur Ethylenbiosynthese führt. Ethylen bindet an die Ethylenrezeptoren und inhibiert dadurch deren Signaltransduktion. Auch *AtCTR1* wird inhibiert, was dazu führt, daß die MAPK-Kaskade aus *AtMKK9* und *AtMPK3* und *AtMPK6* aktiviert wird. Diese MAPK-Kaskade phosphoryliert und stabilisiert dadurch *AtEIN3*. *AtEIN3* spielt eine bedeutende Rolle in der Initiierung der ethylenabhängigen Signaltransduktion. Wird kein Ethylen detektiert dann reguliert *AtCTR1* die *AtMKK9/AtMPK3* und *AtMPK6*-Kaskade negativ und destabilisiert *AtEIN3* zusätzlich durch Phosphorylierung an einer weiteren Phosphorylierungsstelle. Es kommt nicht zur ethylenabhängigen Signaltransduktion. Es gibt weitere parallele Signalweiterleitungsprozesse bei denen *AtEIN2* und die Ethylenrezeptoren eine Rolle spielen (Asai *et al.*, 2002; Liu und Zhang, 2004; Joo *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008).

## 1.4 Die ERF-Genfamilie

Wie zuvor bereits in Abschnitt 1.1.2 erwähnt, kommt es nach Befall einer Pflanze mit einem nekrotrophen Pathogen zu einer verstärkten Expression von *AtERF1*. Die Überexpression von *AtERF1* führt zu einer starken konstitutiven Expression von *AtPDF1.2* verbunden mit einer erhöhten Resistenz gegen das nekrotroph lebende Pathogen *Botrytis cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). *AtERF1* ist ein Transkriptionsfaktor, der AP2/ERF Superfamilie. Diese Familie hat für Arabidopsis 145 Mitglieder von denen 122 der ERF-Familie angehören. Mitglieder der ERF-Familie wurden zuerst in Tabak entdeckt, u.a. das *AtERF1*-Homologe *NtERF1*, und banden dort spezifisch an ein sogenanntes GCC-Element (Konsensussequenz: AGCCGCC), das in der ethylenabhängigen Genexpression eine Rolle spielt. Einige Mitglieder der ERF Familie binden auch an das sogenannte DRE (DROUGHT RESPONSIVE ELEMENT; Konsensussequenz: AGCCGAC), einer Variante des GCC-Elementes. ERF-Transkriptionsfaktoren spielen bei der Integration verschiedenster Umweltreize, wie Trockenheit, Salzstreß, Kälte aber auch biotischem Streß eine Rolle. ERF-Expression wird dabei z.B. durch Ethylen, Jasmonat und Abszissinsäure induziert. *AtERF1* und andere Mitglieder der Gruppe IX der ERF-Transkriptionsfaktoren wurden mit der Expression von Abwehrgenen in Verbindung gebracht. Die Überexpression von *AtERF1* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002), *AtERF14* (Onate-Sanchez und Singh, 2002; Onate-Sanchez *et al.*, 2007) und *AtORA59* (Pre *et al.*, 2008) führte zu einer gesteigerten Resistenz gegen verschiedene nekrotrophe Pathogene wie *Botrytis cinerea*, *Plectosphaerella cucumerina* und *Fusarium oxysporum*. Ethylen und Jasmonat regulieren die Expression der Gruppe IX ERFs differentiell. Es wird vermutet, daß Phosphorylierungen einen Einfluß auf die Aktivität von ERFs haben. *OsEREBP1* bindet zum Beispiel an die MAPK *OsBWMK1*. Diese phosphoryliert *OsEREBP1*, was zu einer Steigerung seiner DNA-Bindefähigkeit führt (Cheong *et al.*, 2003). Auch für *Arabidopsis* ERFs wurden potentielle MAPK-Phosphorylierungsstellen gefunden. Diese ERFs, *AtERF5*, *AtERF6*, *AtERF104* und *AtERF105* gehören wie *AtERF1* zur Gruppe IX, wobei *AtERF104* und *AtERF105* jeweils eine zweite putative MAPK-Phosphorylierungsstelle aufweisen (Nakano *et al.*, 2006).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Vor Beginn der hier vorliegenden Arbeiten wurde eine Hefe-2-Hybrid-Analyse in Kooperation mit Joachim Uhrig (Universität Köln, Deutschland) durchgeführt. Bei dieser Analyse konnten zahlreiche MAPK-Interaktoren identifiziert werden. Ziel der Arbeit war es, diese Interaktionen *in planta* zu verifizieren. Dazu sollte ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-System und ein Bimolekulares Fluoreszenz-Komplementations-System in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Ausgewählte Interaktoren sollten anschließend funktionell charakterisiert werden. Detaillierte Analysen sollten für *AtERF104*, einem Mitglied der ERF-Genfamilie, durchgeführt werden. *AtERF104* zeigte eine *flg22*-abhängige Interaktion mit *AtMPK6* (Bethke, 2004) wurde jedoch nicht von *AtMPK3* und *AtMPK4* gebunden, MAPKen die ebenfalls nach *flg22*-Gabe aktiviert werden. Als wichtigster Aspekt sollte eine Charakterisierung in Hinblick auf eine Funktion in der basalen Resistenz gegen potentielle Pathogene durchgeführt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien in Analysequalität eingesetzt und von den Firmen GE Healthcare, Bio-Rad, Fluka, Merck, Carl Roth, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen. Organische Lösungsmittel kamen von den Firmen Roth, Calbiochem, Fluka und Merck. Die Inhaltsstoffe für Nährmedien und die Antibiotika wurden von Difco, Duchefa, Serva und Sigma bezogen. Die eingesetzten Enzyme kamen von Invitrogen, Fermentas, Sigma, Promega, Serva und NEB. Antikörper wurden von Pierce, Biorad, BD Living Colors und Sigma bezogen bzw. von Eurogentec für die Arbeitsgruppe hergestellt (Ahlfors *et al.*, 2004). Primer wurden von MWG, Peptide in unserer Abteilung, mittels Festphasensynthese mit einem *Economy Peptide Synthesizer EPS221* (Abimed) synthetisiert (Jutta Elster und Sylvia Krüger, IPB Halle, Deutschland).

#### 2.1.2 Pflanzen

Pflanzen wurden unter Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht- und 16 Stunden Dunkelphase) bei 22°C angezogen. Alle verwendeten *Arabidopsis thaliana*-Linien hatten Col-0 Hintergrund. Die *AtMPK6*-Mutante (Salk\_12507, *mpk6-3* in Liu und Zhang (2004) beschrieben und die Ethylensignaltransduktions-Mutanten (*etr1-3*, *ctr1-1*, *ein2-1*) wurden vom Salk-Institut (La Jolla, USA; Alonso *et al.*, 2003) oder von NASC (Nottingham, GB) bezogen. Die *ein3-1* and *ein3-1/eil1-1* Doppelmutanten wurden freundlicherweise von Joseph Ecker (La Jolla, USA), die *fls2* Mutante in Col-0 von Birgit Kemmerling (ZMBP, Tübingen, Deutschland), die Linien mit GUS-Reporterkonstrukt unter der Kontrolle verschiedener Promotoren mit pathogen- bzw. stressinduzierbaren Elementen von Imre Somssich (MPIZ Köln, Deutschland; Rushton *et al.*, 1996) und die *mkk9*-Mutante von Jen Sheen (Harvard, Boston, USA; Yoo *et al.*, 2008) zur Verfügung gestellt.

### 2.1.3 Zellkulturen

Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Ökotyp Columbia (Col-0) wurden in MS-Medium (Makro- und Mikronährelemente nach Murashige und Skoog einschließlich Gamborg B5 Vitaminen (Duchefa); 1 mg/l 2,4-D; 30g/l Saccharose; pH 5,7) bei 24 °C und 120 rpm (HT von INFORS) in Dunkelheit angezogen und alle sieben Tage passagiert (Jutta Elster, Christel Rülke und Sylvia Krüger alle IPB Halle, Deutschland).

### 2.1.4 Bakterienstämme

Für alle Klonierungsarbeiten wurde der *Escherichia coli* - Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 von Invitrogen eingesetzt. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium (10 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 5 g/l NaCl; pH 7,0) supplementiert mit den entsprechenden Antibiotika (100 $\mu$ g/ml Ampicillin bzw. 50  $\mu$ g/ml Kanamycin) bei 37°C. Für die *Agrobacterium tumefaciens* vermittelte Transformation von *Arabidopsis* wurde der Stamm GV3101 pMP90RK verwendet. Die Anzucht erfolgte ebenfalls in LB-Medium bei 28°C. Hier wurde das LB-Medium mit Carbenicillin (50-100 $\mu$ g/ml), Rifampicin (80 $\mu$ g/ml), Kanamycin (50 $\mu$ g/ml), Gentamycin (15 $\mu$ g/ml) bzw. Spectinomycin (50 $\mu$ g/ml) supplementiert

Für die Pathogeninfektionen wurden *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Isolat DC3000 (Whalen *et al.*, 1991; Buell *et al.*, 2003) bzw. *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Race6 (1448A); Joardar *et al.*, 2005) verwendet. Die Anzucht in LB-Medium (80 $\mu$ g/ml Rifampicin) erfolgte bei 28°C.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde für die Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt und erfolgte in einem *Thermocycler*



(*Gene Amp PCR System* 2400 und 9700; Perkin Elmer bzw. MyCycler von Biorad). Die Durchführung erfolgte laut Standard Protokoll beschrieben in Sambrook *et al.* (1989).

### 2.2.1.2 Agarosegele

DNA-Fragmente können mit Hilfe der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Es wurden Gele aus Agarose (x% (w/v), *SeaKem LE Agarose*, Biozym (Konzentration entsprechend den Herstellerangaben für die jeweiligen Fragmentgrößen)) verwendet. Die mit DNA-Probenpuffer (10x DNA-Probenpuffer 10 mM EDTA, 30% (v/v) Glycerin, 0,1% (w/v) Bromphenolblau ) versetzte DNA wurde dann aufgetragen und in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 2 mM EDTA, pH 8,5) bei ca. 1-10 V/cm aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel für 5 Minuten in 0,5 µg/ml Ethidiumbromid angefärbt und anschließend auf einem Transilluminator (Herolab UVT 2020) bzw. der Geldokumentationsanlage *Gene Genius* von Syngene betrachtet und photographiert.

### 2.2.1.3 Klonierungen

Die Klonierungen erfolgten in der Regel mit Hilfe des Gateway-Systems von Invitrogen. *Entry*-Klone für *AtERF104* (At5g61600) bzw. *AtERF105* (At5g51190) wurden von der Peking-Yale-Transkriptionsfaktor-Sammlung (Gong *et al.*, 2004) bezogen. Für *AtMPK3*, *AtMPK4*, *AtMPK6* und *AtMPK11* wurden Konstrukte mit Stop-Codon zuerst mittels genspezifischer Primer amplifiziert, die zusätzlich eine Überlappung mit den Adapter-Primern aufwiesen (s. *Gateway-Handbuch*) und anschließend mittels *Gateway*-Adapter-Primern (s. Anhang bzw. *Gateway-Protokoll* von Invitrogen) mit attB-Stellen versehen und in pDONR 201 kloniert (Rita Schlichting, IPB Halle, Deutschland). Für *AtMPK6* ohne Stop-Codon, *AtMKK4*, das prolinreiche Protein, das VQ-Motiv-enthaltende Protein, *AtVIP1* und *AtNDPK2* (alle mit Stop-Codon) erfolgte die Amplifikation ebenfalls zuerst mittels genspezifischer Primer und anschließend wurden die Konstrukte mit den oben genannten *Gateway*-Adapter-Primern mit der attB-Sequenz versehen und in pDONR221 kloniert. Die dabei verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

Folgende *destination*-Vektoren fanden bei den Experimenten Verwendung: Für die FRET-Analysen wurden pEXSG-YFP bzw. pEXSG-CFP (von Ralf Panstruga, MPIZ Köln, Deutschland freundlicherweise zur Verfügung gestellt, s. Anhang), für BiFC-Analysen pUC/pE-SPYCE bzw. pUC/pE-SPYNE (Walter *et al.*, 2004), für die Überexpression von ERF104 in Pflanzen wurde pXCSG-Strep (Witte *et al.*, 2004), für die Erzeugung von RNAi-Linien pHELLSGATE8 (Wesley *et al.*, 2001) und für die Klonierung von ERF104-HA wurde pUGW14 (Nakagawa *et al.*, 2007) verwendet.

Für die Erzeugung von leeren Vektoren als *split-YFP*-Negativkontrollen wurden pE-SPYCE bzw. -SPYNE jeweils mit *BglII* und *SmaI* verdaut um die *ccdB*-Genenthaltende Kassette zu entfernen, danach wurde die *BglII* Restriktionsstelle mit Hilfe des Klenow-Enzyms aufgefüllt und der Vektor religiert.

Auch für die Negativkontrolle freies CFP wurde die *ccdB*-enthaltende Kassette aus dem Gateway-Vektor ausgeschnitten. Hier erfolgte die Restriktion mit *PstI*.

Das CFP-YFP-Fusionskonstrukt wurde uns von Ralf Reski (Universität Freiburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt und basiert auf dem CFP-enthaltenden Vektor mAV4 in welchen YFP über *BamHI* und *SmaI*-Schnittstellen eingefügt wurde.

Die Überexpression von *AtERF104* in *E. coli* erfolgte mit Hilfe des pGEX-5-X3-Vektors von GE Healthcare. Dazu wurde *AtERF104* mittels PCR mit *Sall* bzw. *NotI*-Schnittstellen versehen. Über diese Restriktionsschnittstellen erfolgte die Klonierung in pGEX-5X-3.

Die konstitutiv aktive Version (CA) und die *loss of function* (LF)-Version von *PcMKK5* (pRT100-myc) wurden von Justin Lee (IPB Halle, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Lee *et al.*, 2004).

Die GUS-Reporterkonstrukte unter der Kontrolle des 35S-Minimal-Promotors mit verschiedenen stress-induzierten Promotorelementen in pGPTV(Kan) wurden freundlicherweise von Imre Somssich (MPIZ Köln, Deutschland) zur Verfügung gestellt (Rushton *et al.*, 1996). Der pDONR-Klon für die PP2C-Typ-Phosphatase *At2g40180* wurde freundlicherweise von Andrea Gust (ZMBP Tübingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

#### **2.2.1.4 Restriktionen**

Der Verdau von DNA erfolgte mit Restriktions-Endonukleasen, welche spezifisch vier bis acht basenpaarlange Sequenzen in einem DNA-Strang erkennen und schneiden. Alle Restriktionen wurden mit je 1 U Restriktions-Endonuklease (Fermentas) 3 h bei der für das Enzym optimalen Temperatur inkubiert und anschließend thermisch inaktiviert. Doppelverdaue wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.1.5 Plasmidpräparationen**

Die Präparation von Plasmid-DNA wurde je nach benötigter Plasmismenge mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit*, *QIAGEN Plasmid Midi Kit* bzw. *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* der Firma QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

#### **2.2.1.6 Transformationen**

##### ***2.2.1.6.1 Escherichia coli***

Die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen mittels  $\text{CaCl}_2$ -Methode und deren Transformation erfolgten nach Standard-Protokoll (Sambrook *et al.*, 1989).

##### ***2.2.1.6.2 Agrobacterium tumefaciens***

Die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte mit Hilfe der Elektrotransformation von in eiskaltem Wasser gewaschenen Bakterien bei  $200\Omega$ ,  $25\mu\text{F}$ ,  $2,5\text{kV}$ . Dabei wurden pro  $50\mu\text{l}$  Ansatz je  $0,2 - 0,5\mu\text{g}$  Plasmid-DNA eingesetzt.

### 2.2.1.6.3 *Arabidopsis*-Protoplasten

#### 2.2.1.6.3.1 Protoplasten aus Zellkulturen

Die Herstellung von Protoplasten aus Zellkulturmaterial erfolgte nach Dangl *et al.* (1987) mit nachfolgend aufgeführten Veränderungen:

Es wurden 40ml Zellkultur von *Arabidopsis thaliana*, Ökotyp Columbia, 5 Tage nach dem Umsetzen, für fünf Minuten bei 65g zentrifugiert, um die Zellen vom Medium zu trennen (MS-Medium von Duchefa ; 1mg/l 2,4-D; 30g/l Saccharose; pH 5,7). Die Zellen wurden in 70ml CaCl<sub>2</sub> (0,24 M) aufgenommen und je 35ml der Zellsuspension für 4h mit 15 ml sterilfiltrierter Enzymlösung (30mg Macerozym R-10 [Serva] und 100 mg Cellulase [Serva] gelöst in 0,24 M CaCl<sub>2</sub>) unter leichtem Schütteln (ca. 60 rpm auf einem horizontalem Schüttler KS 250 basic von IKA) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation (150g, fünf Minuten) von der Enzymlösung getrennt mit 30ml CaCl<sub>2</sub> (0,24 M) gewaschen (Zentrifugation wie zuvor) und anschließend in 20ml B5-Sucrose-Lösung (Gamborg B5 Medium (Sigma, 1 Packung je l), 1mg/l 2,4-D, 0,28 M Saccharose, pH 5,5) resuspendiert und danach bei 60g für weitere fünf Minuten zentrifugiert. Unter diesen Bedingungen flottieren die intakten Protoplasten und können so von den Zelltrümmern getrennt werden. Nach Auszählung mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde eine Endkonzentration von 10x10<sup>6</sup> Protoplasten je ml eingestellt.

Für die Transfektion wurden 100µl Protoplasten-Suspension mit 10µg Plasmid-DNA versetzt und in 300µl PEG-Lösung (25% (w/v) PEG 6000, 100mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 450mM Mannitol) für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 5ml Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,275M, pH 6,0) zugegeben, die Protoplasten durch Zentrifugation (150g, fünf Minuten) gesammelt und danach in 4ml B5-Sucrose über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Protoplasten unter Zugabe von 5ml CaCl<sub>2</sub> (0,24 M) durch Zentrifugation (630g, zehn Minuten) geerntet wurden, konnten sie für biochemische Versuche in flüssigem Stickstoff eingefroren werden. Sollten sie für mikroskopische Untersuchungen eingesetzt werden, wurde die Zentrifugation nur bei 300g für fünf Minuten durchgeführt und die lebenden Zellen weiter analysiert.

#### 2.2.1.6.3.2 Protoplasten aus Blattmaterial

Protoplasten aus *Arabidopsis*-Blattmaterial wurden entsprechend einem Protokoll von Jen Sheen mit einigen Abweichungen hergestellt und transformiert. Die Blätter wurden nach Abziehen der unteren Epidermis in schmale Streifen geschnitten und in Enzymlösung (1% (w/v) Cellulase Onozuka R-10 (Serva), 0,3% (w/v) Macerozyme R-10 (Serva), 500 mM Mannitol, 4 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM MES-KOH, pH 5,6) für zwei bis vier Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln unter Schütteln (30 rpm) inkubiert. Nachdem die erhaltenen Protoplasten durch ein 100µm Sieb gegeben wurden, erfolgte eine Zentrifugation bei 200g für sechs Minuten. Anschließend wurden die Zellen in W5-Lösung (154 mM NaCl; 125 mM CaCl<sub>2</sub>; 5 mM Glucose; 1,5 mM MES-KOH, pH 5,6) gewaschen, geerntet und auf eine Konzentration von  $2 \times 10^5$  Protoplasten je ml in MaMg-Lösung (400 mM Mannitol; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 mM MES-KOH, pH 5,6) eingestellt. Für die Protoplastentransfektion wurden 100µl dieser Protoplasten-Suspension mit 10µg Plasmid-DNA und 100µl einer PEG-Lösung (40 % (w/v) PEG 4000 von Fluka; 400 mM Mannitol; 100 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>) vermischt. Nach einer kurzen Inkubation (fünf bis zehn Minuten), wurden 3ml W5-Lösung hinzugefügt und die Protoplasten durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 5ml W5-Lösung gewaschen und zur Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in 3ml W5-Lösung aufgenommen. Nach der Ernte der Protoplasten standen diese für biochemische und mikroskopische Analysen zur Verfügung.

#### 2.2.1.6.4 *Arabidopsis*-Pflanzen

Die *floral dip*-Transformation von *Arabidopsis* mittels *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte entsprechend Logemann *et al.* (2006).

#### 2.2.1.7 Sequenzspezifische Mutagenese

Die Konstrukte AtMPK6KR (von Justin Lee zur Verfügung gestellt), AtMPK6AEF und AtERF104m wurden mittels sequenzspezifischer Mutagenese mit Hilfe des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kits* von Stratagene hergestellt. Die benutzten Primer finden sich im Anhang.

### 2.2.1.8 Northern-Blot-Analysen

Für die Erstellung aller *AtERF104*-RNAi und *AtERF104*<sup>OE</sup>-Linien wurde die Transkriptmenge mittels *Northern-Blot*-Verfahren analysiert. Da ab der T3-Generation *Silencing* der *AtERF104*-Expression eintrat, konnten für alle Experimente mit *AtERF104*<sup>OE</sup> ausschließlich Pflanzen der T2-Generation verwendet werden. Diese wurden vor Verwendung in den verschiedenen Experimenten mittels Northern-Analyse verifiziert. Für die *AtERF104*-RNAi-Pflanzen erfolgte die Verifikation ebenfalls mittels Northern-Blot-Analyse von zuvor für 3h in 100µM Cycloheximid inkubierten Blättern. Diese Vorbehandlung war notwendig, da unbehandelte Col-0-Pflanzen keine Transkriptakkumulation von *AtERF104* in Northern-Blot-Analysen zeigten. RNAi-Pflanzen wiesen auch nach Cycloheximid-Behandlung kaum *AtERF104*-Transkriptakkumulation auf.

Die Extraktion von RNA erfolgte nach der im *Arabidopsis* Buch (Weigel und Glazebrook, 2002) beschriebenen Methode. Zur Northern-Blot-Analyse wurden 3-10µg RNA auf einem denaturierenden, formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt und anschließend durch Diffusions-*Blot* mit 20xSSC (3M NaCl, 0,33M tri-Natriumcitrat-Dihydrat, pH 7,0) auf eine Nylon-Membran transferiert. Die (Prä)-Hybridisierung der Membran erfolgte bei 42°C in Hybridisierungspuffer (0,25M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH7,2-7,4, 0,25M NaCl, 1mM EDTA, 50% (v/v) Formamid, 7% (w/v) SDS). Die radioaktiv markierten Sonden wurden mittels *Random Priming kit* (GE Healthcare) hergestellt. Nach dem Waschen der Nylon-Membran bei 65°C in 1xSSC mit 0.1%SDS wurde diese mittels Phosphorimager analysiert.

### 2.2.1.9 cDNA-Synthese und semiquantitative RT-PCR

Für die cDNA-Synthese wurde 1µg DNaseI-verdaute RNA eingesetzt (DNaseI entsprechend Herstellerangaben eingesetzt). Die Synthese von cDNA erfolgte mittels *First-strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas.

Die Amplifikationen für die semi-quantitative RT-PCR erfolgten jeweils bei folgenden Bedingungen: 95°C 1 Minute, x Zyklen 95°C 15 sec, 50°C 20 sec und 72°C 45sec, sowie eine finale Elongation für fünf Minuten bei 72°C. Die idealen PCR-Zykluszahlen in der

nichtgesättigen Phase der Amplifikation wurden für jedes Zielgen einzeln bestimmt. Folgende Primer und Zyklenzahlen wurden verwendet: *AtERF104* (30 Zyklen) (At5g61600) 5'-agg ccc tag aac cat cac caa-3' und 5'-acg tcg gag ata acg gag gaa-3'; *AtFRK1* (31 Zyklen) (At2g19190) 5'-tga agg aag cgg tca gat tt-3' und 5'-ctg act cat cgt tgg cct ct-3'; *AtPDF1.2* (38 Zyklen) (At5g44420) 5'-aga agt tgt gcg aga agc caa g-3' und 5'-ttg taa caa caa cgg gaa aat aaa c-3'; *AtPR3* (35 Zyklen) (At3g12500) 5'-gcc cat cca cct gta gtt tc-3' und 5'-agc aat gtg gtc gcc aag-3'; *AtFIBRILLARIN* (32 Zyklen) (At5g52470) 5'-ctc aat caa ggc caa ctg ta-3' und 5'-tat gag gct ggg gtc ttt tg-3'.

### 2.2.1.10 Mikroarray-Analysen

Sechs Wochen alte Col-0-, *erf104*-, *mpk6-3*- und *AtERF104*<sup>OE</sup>-Pflanzen wurden mit 1µM flg22 bzw. Wasser infiltriert und 4h später geerntet. Die Gesamt-RNA wurde entsprechend des Affymetrix-Protokolls für Biotin-markierte cRNA hergestellt und ein ATH1-Chip mit dieser RNA hybridisiert. Die erhaltenen Daten wurden mit der *Genespring GX 7.3.1* Software von Agilent ausgewertet. Dabei wurden folgende Einstellungen vorgenommen: Filter für *Flags* auf *present* oder *marginal* in 50% aller verwendeten Experimente, Filter für verlässlich differentiell exprimierte Gene basierend auf einem VolcanoPlot-Programm (p-Wert <0.05 und >3-fache Änderung der Expression). Zusätzlich wurde eine Benjamini-Hochberg *false discovery rate* (FDR) von 5% verwendet. Die Mikroarray-Daten für Jasmonat- oder Ethylen-Behandlung wurden öffentlich zugänglichen Datenbanken entnommen (*GARNET*, *Genevestigator*).

## 2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1 Protein Extraktion

Proteinextraktion erfolgte wie zuvor in Ahlfors *et al.* (2004) beschrieben in einem Kinase-Extraktionspuffer (25 mM Tris/HCl pH 7,8; 75 mM NaCl; 15 mM EGTA; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 15 mM Glycerophosphat; 15 mM 4-Nitrophenylphosphat; 1 mM DTT; 1 mM NaF; 0,5 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>; 0,5 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin; 0,1 % (v/v) Tween 20). Die Proteinquantifikation wurde mittels Bradford-Analyse (Bradford, 1976) von Biorad durchgeführt.

### **2.2.2.2 Proteinexpression in *E. coli***

Für die Überexpression von AtERF104 als N-terminal GST-markiertes Protein in *E. coli* wurden der Vektor pGEX-5X-3 und der *E. coli*-Stamm BL21 verwendet. Die *E. coli*-Zellen wurden mit 0,1mM IPTG induziert und für 12h bei 18°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Ernte der Zellen wurden diese in 1xPBS (140mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,3) mit 1% (w/v) Deoxycholat, 1mM PMSF und 0.1mg/ml Lysozym aufgeschlossen und anschließend für 30' bei 20000xg zentrifugiert. GST-AtERF104 wurde aus der erhaltenen Rohproteinlösung mit Glutathion-Sepharose (GE-Healthcare) gebunden und anschließend mit 1 Volumen Elutionspuffer eluiert (50mM Tris pH 8,0; 10mM reduziertes Glutathion).

### **2.2.2.3 SDS-Gelelektrophorese**

Die Proteinproben wurden in 2 x Lämmli-Puffer (125 mM Tris/HCl pH 6,8; 4% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 2% (v/v) β-Mercaptoethanol; 0,05% (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte wie bei Laemmli (1970) beschrieben. Die Proben wurden im Sammelgel (125 mM Tris/HCl, pH 6,8; 5% (v/v) Acrylamid; 0,1% (w/v) SDS; 0,1 (w/v) APS; 0,1 % (v/v) TEMED) bei 15 mA konzentriert und im Trenngel (375 mM Tris/HCl, pH 8,8; 8-15% (v/v) Acrylamid; 0,1 (w/v) SDS; 0,1% (w/v) APS; 0,04% (v/v) TEMED) bei 30 mA elektrophoretisch aufgetrennt.

Für die Auftrennung kleinerer Peptide wurde die Methode von Schägger und Jagow verwendet (Schägger und von Jagow, 1987).

### **2.2.2.4 Western-Blot-Analyse**

Western-Blot-Analysen wurden entsprechend dem Standard-Protokoll aus Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt und die kommerziell erhältlichen Antikörper den Hersteller-Angaben, die MAPK-Antikörper Ahlfors *et al.* (2004) entsprechend verwendet.



### 2.2.2.5 Immunkomplex-Kinase-Experiment

Das Immunkomplex-Kinase-Experiment wurde wie bei Kroj *et al.* (2003) beschrieben durchgeführt. Dabei wurden für die *Arabidopsis*-MAPKs die in Ahlfors *et al.* (2004) beschriebenen Antikörper und für YFP-/CFP-markierte Proteine der  $\alpha$ -GFP Antikörper *Full-Length A.v. Polyclonal Antibody* von *BD Living* eingesetzt. Bei den Immunkomplex-Kinase-Experimenten mit GST bzw. GST-AtERF104 wurden pro Reaktion ca. 1  $\mu$ g rekombinantes Protein als Substrat verwendet.

### 2.2.2.6 EMSA-Analysen (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*)

Bei den EMSA-Analysen zur Detektion von Protein-DNA-Komplexen wurde für die Sonden ein allgemeiner *antisense* Primer (5'- attctgggtcctcttt -3') einzeln an verschiedene *sense* Primer (entsprechend den zu analysierenden Promotorelementen) angelagert (5'- cacttaacX<sub>6-7</sub>aaagaggaccagaat-3', wobei X<sub>6-7</sub> TTGACC für das WRKY-Element, AGCCGCC für die GCC-Box, ATCCTCC für eine mutierte Version der GCC-Box (GCCmut), AGCCACC für die S-Box, AGCCGAC für das DRE-Element, AGACCGCC für das JERE-Element und CACGTG für die G-Box entspricht). Die DNA-Sonden wurden durch Auffüllen der zusammengelagerten Oligonukleotide mit <sup>32</sup>P-markiertem dATP und unmarkiertem dTTP, dGTP und dCTP mittels Klenow-Enzym erhalten. Ein pmol radioaktiv-markierter Oligonukleotide wurde dann zusammen mit 4  $\mu$ g dIdC (mit 4% (w/v) Ficoll (Typ 400), 100mM NaCl) und jeweils 2  $\mu$ g rekombinantem GST-ERF104-Protein bzw. GST-Protein als Negativkontrolle inkubiert. Zur Kompetition wurde ein 100facher molarer Überschuss an unmarkiertem Oligonukleotid verwendet. Die erhaltenen Protein-DNA-Komplexe wurden auf einem 5%igen nativen Polyacrylamid-Gel (0.5xTAE-Puffer) aufgetrennt und mittels Phosphor-Imager visualisiert.

### 2.2.2.7 Messungen der GUS-Aktivität

Die transienten Analysen zur Aktivierbarkeit verschiedener Promotor-Elemente wurden in Protoplasten aus Blattmaterial durchgeführt. Diese wurden mit 5  $\mu$ g pRT100-Luc, 5  $\mu$ g

pGPTV-GCC oder pGPTV-BoxS oder pGPTV-GCC<sub>mut</sub> (Rushton 2002) und 10µg pUGW14-ERF104 bzw. Heringssperma-DNA, als Kontrolle, kotransfiziert. GUS- und LUC-Messungen erfolgten wie zuvor in Kroj *et al.* (2003) beschrieben.

### 2.2.2.8 ChIP

Die Chromatin-Immunpräzitations-Analysen (ChIP) erfolgten nach einem Protokoll von Werner Aufsatz veröffentlicht auf den Seiten von *The Epigenome Network of Excellence* (<http://www.epigenome-noe.net/researchtools/protocol.php?protid=13>). Als Primer für den PDF1.2-Promotor wurden 5'-agg tgt gtc cca ggg ata-3' und 5'-gct gct teg gct ttt agc-3', für den PR3-Promotor 5'-cag tga gat tgg aga tta g-3' und 5'-cta tga tca atg ttg gac-3' verwendet. Die Immunpräzitation erfolgte mittels *Strep-Tactin-Sepharose* (IBA) bzw. parallel mittels *α-Strep-Tactin Macroprep* von IBA. Als Mock-Kontrolle diente ProteinA-Sepharose von GE Healthcare. Die Anaylisen wurden immer parallel in Col-0 und *AtERF104<sup>OE</sup>* durchgeführt.

### 2.2.3 Färbungen

#### 2.2.3.1 GUS-Färbung

Die GUS-Färbungen in den stabilen GUS-Reporter-Linien (Rushton *et al.*, 1996) wurden entsprechend Martin *et al.* (1992) durchgeführt.

#### 2.2.3.2 DAB / Trypan-Blau

Die Färbungen von *Arabidopsis*-Blättern mit Diaminobenzidin und Trypan-Blau erfolgten entsprechend Halim *et al.* (2007).

## 2.2.4 Mikroskopische Methoden

### 2.2.4.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)

Alle Daten für FRET wurden mit dem LSM 510 Meta von Zeiss generiert. Dabei wurde die *Acceptor-Photobleaching*-Methode (Karpova *et al.*, 2003) verwendet. Die Messungen wurden bei voller Laserleistung (Argonlaser) im *Channel-Mode* (Filter CFP: 473,3-505,4 nm und YFP: 516,1-548,2 nm) durchgeführt. Für jedes Experiment wurden mindestens zwölf Protoplasten analysiert und dazu zweimal vor und nach dem Bleichen (514nm, volle Laserleistung, 80mal) bei 458nm Aufnahmen angefertigt. Die relative Fluoreszenz-Intensität (I) in einem bestimmten Bereich (*region of interest, roi*) wurde mittels der *roi mean*-Funktion der Zeiss Software bestimmt. Die resultierende mittlere FRET-Effizienz ( $E_F$ ) wurde nach der Formel  $E_F = (I_{\text{vor dem Bleichen}} - I_{\text{nach dem Bleichen}}) \times 100 / I_{\text{nach dem Bleichen}}$  berechnet. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung der  $E_F$ -Werte mittels GraphPad Prism Software-Paket. Zuerst wurde unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnov-Verfahrens getestet, ob die Werte normal verteilt waren. Dann wurde ein Grubbs-Test zur Identifikation von Ausreißern angeschlossen. Die verbliebenen Werte wurden anschließend mittels Mann-Whitney-Analyse (p-Wert  $\leq 0,05$ ) auf signifikante Übereinstimmung einerseits mit den Kontrollen und andererseits mit der positiven Interaktion von *AtMPK6-YFP* und *AtMKK4-CFP* analysiert.

### 2.2.4.2 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (BiFC)

Für die BiFC-Analysen wurden die putativen Interaktoren jeweils mit dem N- bzw. C-terminalen YFP-Fragment fusioniert und zusammen mit CFP in Protoplasten aus Col-0-Blättern exprimiert. Zur mikroskopischen Analyse der Fluoreszenz-Komplementation wurde das Zeiss *Axioplan2*-Mikroskop mit CFP (436-456nm Anregung; 480-520nm Emission)- und YFP (500-520nm Anregung und 535-565nm Emission)-spezifischen Filtern verwendet. Der Anteil der CFP-fluoreszierenden Protoplasten von der Gesamtzahl der ausgezählten Protoplasten entsprach dabei der Transfektionseffizienz. Der Anteil YFP-fluoreszierender Protoplasten an den CFP-fluoreszierenden Protoplasten wurde als Maß für erfolgreiche Fluoreszenz-Komplementation herangezogen und in einem Diagramm zusammen mit der Transfektionseffizienz aufgetragen. Die kürzlich

erschienene Publikation von Kanaoka *et al.* (2008) beschreibt eine entsprechend durchgeführte BiFC-Analyse in *Arabidopsis* Protoplasten.

## 2.2.5 Infektionen von *Arabidopsis* mit Pathogenen

### 2.2.5.1 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Die Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* erfolgte durch Sprühen mit einer 10mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung welche zusätzlich 0,05% (v/v) Silwet L-77 und  $1 \times 10^8$  colony forming units (cfu) Bakterien je ml enthielt (Katagiri *et al.*, 2002). Zur Analyse des Bakterienwachstums wurden Verdünnungsreihen eines Homogenates definierter Blattscheiben infizierter Blätter (in 10mM MgCl<sub>2</sub>) auf LB-Festmedium (mit 80µg/ml Rifampicin und 20µg/ml Cycloheximid) ausplattiert. Aus den ermittelten cfu wurde auf die Bakteriendichte zurückgerechnet und daraus die Anzahl der cfu pro cm<sup>2</sup> bestimmt.

### 2.2.5.2 *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* B05.10 (freundlicherweise von Paul Tudzynski, WWU Münster, Deutschland, zur Verfügung gestellt) wurde für zehn Tage auf 1xPotato Dextrose Agar (Duchefa), mit 12,5 % (w/v) Kartoffelpüree-Pulver aus dem Supermarkt und 10% (w/v) gemörserten *Arabidopsis*-Blättern, angezogen. Die Sporen wurden in B5-Glucose-Medium (Gamborg B5-Medium mit Vitaminen (Duchefa), 2% (w/v) Glukose) abgeschwemmt und anschließend über Glaswolle filtriert. Die gewonnene Sporensuspension wurde auf  $2 \times 10^5$  Sporen pro ml eingestellt und mit Phosphatpuffer (1M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,4) auf eine Endkonzentration von 10mM K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> eingestellt. Je 10µl der Sporensuspension wurden auf voll entwickelte *Arabidopsis*-Rosetten-Blätter aufgetropft. Aus den Inokulationsbereichen wurden mit einem Korkbohrer (10mm-Durchmesser) Blattscheiben 4 Tage nach Infektion geerntet. Die phänotypische Analyse des *Botrytis*-Wachstums erfolgte jeweils mit 54 Einzelblättern, die in drei Klassen eingeteilt wurden. Es wurde zwischen „keine Symptome“, „Läsionen“ und „Läsionen mit starker Mazeration des umliegenden Blattgewebes“ unterschieden. Für die *Real-Time*-PCR-

asierte Bestimmung der Zunahme der pilzlichen Biomasse wurde das Protokoll von Eschen-Lippold *et al.* (2007) mit den *Botrytis*-CutinaseA-Primern von Gachon und Saindrenan (2004) verwendet. Die Messungen wurden 3-6mal wiederholt. Pro Messwert wurden 18 Blattscheiben von sechs Pflanzen analysiert.

### **2.2.5.3 *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola***

Die Infektion mit dem Bohnen-Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* erfolgte entsprechend Wang *et al.* (2008). Dieses Pathogen kann *Arabidopsis thaliana* nicht infizieren

### **2.2.6 Behandlung mit *PAMPs* und Inhibitoren**

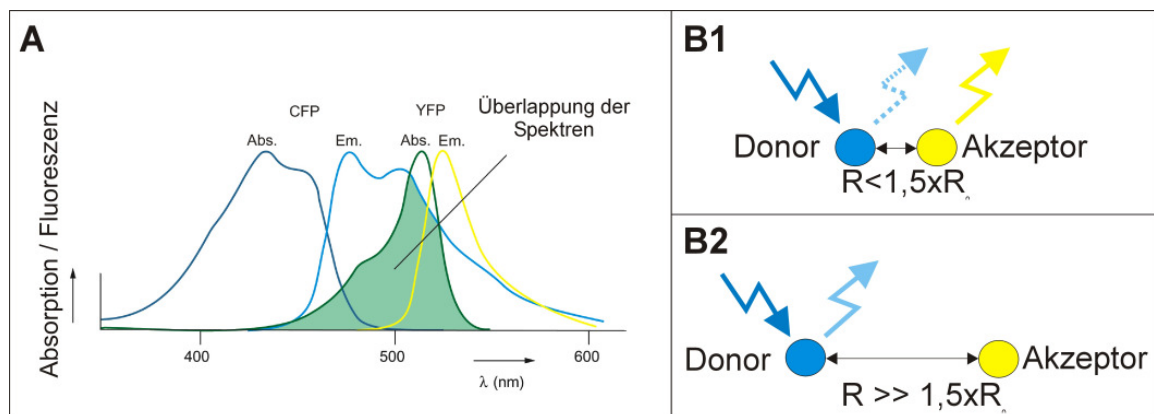
In Protoplasten erfolgte die Elicitierung stets mit 100nM flg22. Für Plattenassays und die Infiltration in Blattmaterial wurden, soweit nicht anders beschrieben, 10µM flg22 eingesetzt. Der Ethylenvorläufer ACC (1-Aminocyclopropan 1-Carboxylsäure) wurde in einer Endkonzentration von 1µM, der Ethylenbiosynthese-Inhibitor AVG (Aminoethoxyvinylglycin) von 10µM und Silberionen von 100µM verwendet. Flg15Δ5 wurde in einer Konzentration von 100nM eingesetzt.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der FRET-Methode

Zur *in planta* Analyse von Protein-Protein-Interaktionen von Komponenten der *Arabidopsis*-Signaltransduktion sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer-System (FRET; Abb. 3.1) etabliert werden. Hierfür wurden die zu analysierenden Zielproteine, jeweils mit YFP bzw. CFP fusioniert, unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors transient in *Arabidopsis*-Protoplasten überexprimiert. Anschließend erfolgte die FRET-Analyse mit einem Konfokalen Laser-Raster-Mikroskop (s. Material und Methoden und die Abbildungslegende von Abb. 3.1. für weitere Details). Zur FRET-Quantifizierung wurde die Methode des Akzeptor-Photo-Bleichens mit CFP als Donor-Fluorophor und YFP als Akzeptor-Fluorophor verwendet (Karpova *et al.*, 2003; Karpova und McNally, 2006).



**Abb. 3.1 Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer:** **A)** Voraussetzung für FRET ist, daß das Emissionsspektrum des Donor-Fluorophors (CFP) und das Anregungsspektrum des Akzeptor-Fluorophors (YFP) überlappen (Gadella *et al.*, 1999). **B)** Beträgt der Abstand zwischen den Fluorophoren weniger als das 1,5fache des Försterradius ( $R_0$ ), wie in B1 gezeigt, dann wird nach Anregung von CFP (blau) sowohl CFP-Emission als auch YFP-Emission (gelb) beobachtet. Wenn beide Fluorophore weiter voneinander entfernt sind (B2), dann erfolgt nach Anregung von CFP ausschließlich CFP-Fluoreszenz. (Abbildung nach Gadella *et al.* (1999).

##### 3.1.1 Positiv- und Negativkontrollen

Zur Etablierung des FRET-Systems wurden zuerst verschiedene Kontrollen analysiert. Als Positivkontrolle diente ein CFP-YFP Fusionsprotein, welches sowohl im Cytoplasma

als auch im Zellkern lokalisiert war (Abb. 3.2 B). FRET-Messungen für dieses Konstrukt ergaben in beiden Kompartimenten eine durchschnittliche FRET-Effizienz von  $19,8 \pm 2,5\%$  (Abb. 3.2 A). Da in diesem CFP-YFP-Fusionsprotein die beiden Fluorophore in räumlicher Nähe vorliegen, kann man vermuten, daß die hier gemessene FRET-Effizienz von ca. 20% einer der höchsten mit diesem System zu messenden Werte sein wird.

Als Negativkontrollen dienten sowohl CFP allein, als auch *AtMPK6*-YFP und CFP sowie *AtMPK6*-YFP allein. Alle genannten Kontrollen waren in Cytoplasma und Zellkern lokalisiert (Abb. 3.2 B). Diese Negativkontrollen wurden verwendet um sogenanntes Pseudo-FRET auszuschließen. Pseudo-FRET entsteht entweder durch Ausbleichen des YFPs bei den Aufnahmen (durch Überschneidungen der YFP- und CFP-Spektren im Bereich der CFP-Anregung), durch die unspezifische Interaktion von CFP und YFP, wenn beide Komponenten in ausreichender Menge vorhanden sind {Karpova, 2003 #366}, bzw. auf Grund der möglichen Photokonversion von YFP in ein bei Anregung mit 405nm, dem CFP-Absorptionsmaximum (Abb. 3.1 A), fluoreszierendes Produkt (Valentin *et al.*, 2005). In Abbildung 3.2 A ist freies CFP als Negativkontrolle dargestellt. Die durchschnittlichen FRET-Effizienzen lagen für die einzelnen Negativkontrollen bei  $-5,6 \pm 1,7\%$  (CFP allein),  $-5,8 \pm 3,2\%$  (CFP und *AtMPK6*-YFP) bzw.  $-5,8 \pm 2,9\%$  (*AtMPK6*-YFP allein).

Die negativen Werte der FRET-Effizienzen falls keine Interaktion stattfand, lassen sich auf ein Ausbleichen des CFPs bei den Aufnahmen zurückführen. Die Aufnahmen erfolgten beim CFP-Anregungsmaximum von 458nm (Abb. 3.1 A ). Dabei kann das CFP ausbleichen und es werden negative FRET-Effizienzen berechnet.

In unserem FRET-System konnte keines der zuvor genannten Pseudo-FRET Ereignisse beobachtet werden.



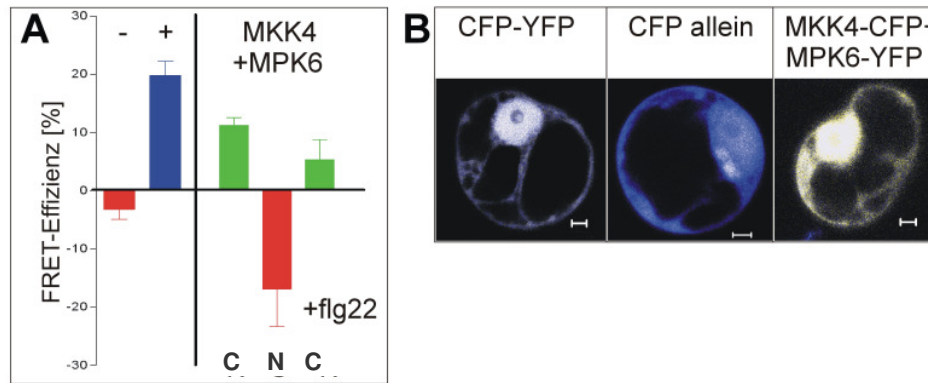


Abb. 3.2 **Das FRET-System:** **A**) Die Abbildung zeigt FRET-Messungen für die Negativkontrolle (CFP allein, -), die Positivkontrolle (Fusionsprotein aus YFP und CFP, +), und zwischen *At*MKK4-CFP und *At*MPK6-YFP im Cytoplasma (C) und Zellkern (N) und nach flg22-Behandlung (+flg22). Die Farben entsprechen Signifikanzklassen nach Mann-Whitney: rot entspricht der Negativkontrolle, blau der Positivkontrolle und grün der Interaktion zwischen *At*MPK6 und *At*MKK4. Die hier erhaltenen FRET-Ergebnisse wurden in den weiterführenden Analysen als Maßstab für Interaktion verwendet. Der angegebene Farbcode für die Signifikanz-Klassen wurde für alle nachfolgenden Analysen übernommen. In **B**) sind Aufnahmen von transfizierten aus Zellkultur gewonnenen Protoplasten zu sehen. Es erfolgte eine Überlagerung des CFP- und des YFP-Kanals. Weiße Bereiche bedeuten, daß gleiche Anteile von CFP- und YFP-Fluoreszenz vorliegen. Man erkennt, daß die Positiv- (CFP-YFP), die Negativkontrolle (CFP allein) und mit *At*MPK6-YFP koexprimierte *At*MKK4-CFP sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert vorliegen. Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 5µm.

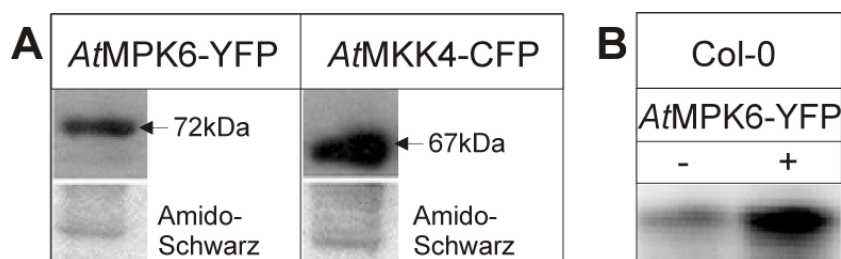
### 3.1.2 Validierung der FRET-Methode mit bekannten Mitgliedern einer MAPK-Kaskade

Da in der vorliegenden Arbeit die *in planta*-Interaktion von MAPKs mit ihren möglichen, in einer Hefe-2-Hybrid-Analyse gefundenen Interaktoren analysiert werden sollte und Interaktionen zwischen Komponenten von Signaltransduktionswegen möglicherweise transient sind, wurde das FRET-System für die bekannte Interaktion von *At*MPK6 mit einer ihrer MAPKs, *At*MKK4, getestet. Für beide Fusionsproteine konnte die entsprechende Fluoreszenz (YFP für *At*MPK6 und CFP für *At*MKK4) sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma gefunden werden (Abb. 3.2 B). Eine Western-Blot-Analyse zeigte, daß das *At*MPK6-YFP- und das *At*MKK4-CFP-Fusionsprotein intakt vorlagen (Abb. 3.3 A), die detektierte Fluoreszenz also auf die Expression des Fusionsproteines und nicht auf Abbauprodukte zurückzuführen war. Ferner konnte gezeigt werden, daß das *At*MPK6-YFP-Fusionsprotein funktionell war, d.h. durch Elicitierung der Protoplasten mit flg22 aktiviert wurde (Abb. 3.3 B). Bei der FRET-Analyse wurde eine durchschnittliche FRET-Effizienz von  $10,2 \pm 1,4\%$  im Cytoplasma, jedoch von nur  $-25,6 \pm 6,9\%$  im Zellkern gemessen (Abb. 3.2 A). Die mittlere FRET-

Effizienz im Cytoplasma unterschied sich dabei sowohl signifikant von der Positivkontrolle als auch von den Negativkontrollen. Daher wurde die mittlere FRET-Effizienz der *AtMPK6-AtMKK4*-Interaktion in den weiteren Analysen als Maßstab für eine stattfindende Interaktion zweier einzeln als YFP- bzw. CFP-Fusionsprotein exprimierter Interaktoren verwendet.

Die durchschnittliche FRET-Effizienz für die *AtMPK6*-YFP und *AtMKK4*-CFP im Kern unterschied sich nicht signifikant von der Negativkontrolle, d.h. hier konnte keine Interaktion beobachtet werden. Dies läßt sich eventuell dadurch erklären, daß *AtMPK6* ohne Elicitierung cytoplasmatisch lokalisiert vorliegt und erst nach Aktivierung eine Translokation in den Kern erfolgt (Ahlfors *et al.*, 2004; Bethke, 2004; Lee *et al.*, 2004). Das Petersilienhomologe von *AtMKK5* liegt vor und nach Elicitierung im Cytoplasma vor (Lee *et al.*, 2004) und konstitutiv aktive *AtMKK4* ist ebenfalls hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert (Yoo *et al.*, 2008), d.h. die Fluoreszenz im Kern ist eventuell auf Grund der starken Expression des *AtMKK4*-Transgens unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors zu erklären. Im Nucleus kann möglicherweise keine Interaktion zwischen MAPK und MAPKK stattfinden.

Nach flg22-Behandlung ist die FRET-Effizienz im Cytoplasma zwar leicht reduziert ( $5,6 \pm 3,9\%$ ), aber nicht statistisch signifikant von der in den unbehandelten Protoplasten verschieden (Abb. 3.2 A). Es findet also auch nach Elicitierung mit flg22 eine Interaktion zwischen *AtMPK6* und *AtMKK4* statt. Dies könnte darauf hindeuten, daß in *Arabidopsis* weitere, nicht flg22-regulierte, *AtMPK6-AtMKK4*-Komplexe vorliegen könnten. Da im Kern auch vor Elicitierung keine Interaktion meßbar war, wurden hier keine FRET-Messungen nach flg22-Behandlung durchgeführt.



**Abb. 3.3 Die Fusionsproteine sind intakt und aktivierbar:** **A)** Eine Western-Blot-Analyse mit  $\alpha$ -GFP-Antikörper zeigte, daß die *AtMPK6*-YFP-, *AtMKK4*-CFP und *AtERF104*-CFP-Fusionsproteine intakt sind. **B)** Ein Immunkomplex-Kinase-Experiment mit *AtMPK6*-YFP: Die Immunfällung erfolgte mit  $\alpha$ -GFP-Antikörper aus unbehandelten (-) bzw. mit 100nM flg22-behandelten, mit *AtMPK6*-YFP transformierten, aus Zellkultur gewonnenen Protoplasten. Zu sehen ist die Phosphorylierung des allgemeinen Kinasesubstrates MBP (*myelin basic protein*) durch aktive *AtMPK6*-YFP.

### 3.2 FRET-Analyse für ausgewählte, in einer Hefe-2-Hybrid-Analyse gefundene, MAPK-Interaktoren

Bei der zuvor bereits erwähnten Hefe-2-Hybrid-Analyse (Joachim Uhrig, Universität Köln, Deutschland) wurden die *Arabidopsis* MAPKs *AtMPK3*, *AtMPK4*, *AtMPK6* und *AtMPK11* gegen verschiedene *Arabidopsis*-cDNA-Bibliotheken getestet. Dabei wurde unter anderem ein Protein gefunden, kodiert durch *At1g28280*, welches wie das *AtMPK4*-Substrat *AtMKS1* ein VQ-Motiv aufwies (Andreasson *et al.*, 2005). Weiterhin wurde als *AtMPK6*-Interaktor ein prolinreiches Protein (kodiert durch *At3g23170*) gefunden, welches im Hefe-2-Hybrid-Screen mit *AtMPK6* und *AtMPK11* interagierte. Auch ein putativer Transkriptionsfaktor der MADS-Box Familie (*At1g65330*) wurde als *AtMPK6*-Interaktor isoliert. Zusätzlich konnten zwei Mitglieder der ERF (*Ethylene Response Factor*)-Transkriptionsfaktor-Familie, *AtERF104* (kodiert durch *At5g61600*) und *AtERF105* (kodiert durch *At5g51190*), als *AtMPK6*-Interaktoren identifiziert werden.

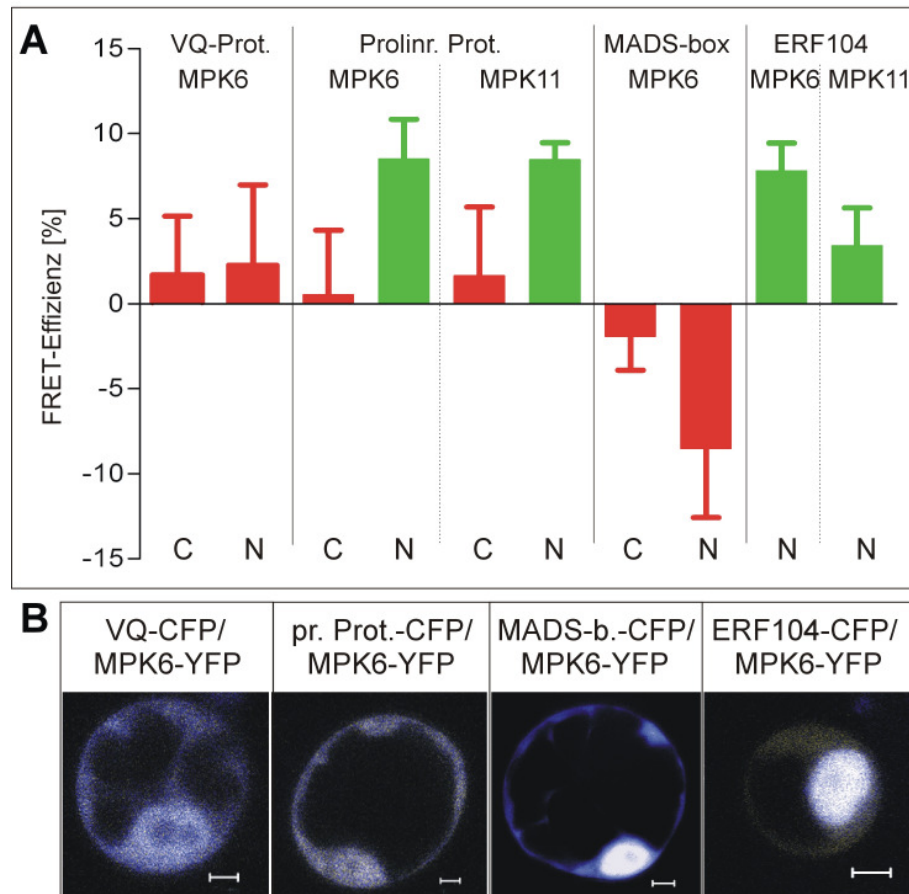
Das VQ-Motiv enthaltende Protein wurde auf Interaktion mit *AtMPK6* getestet, wobei sowohl die MAPK als auch der Kandidat mittels ihrer spezifischen Fluoreszenz (YFP für *AtMPK6*, CFP für das VQ-enthaltende Protein) im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert werden konnten (Abb. 3.4 B). Es wurden sehr geringe mittlere FRET-Effizienzen von  $1,7 \pm 3,5\%$  im Cytoplasma und  $2,3 \pm 4,7\%$  im Zellkern gefunden (Abb. 3.4 A), welche sich nicht signifikant von der Negativkontrolle unterschieden. Andere flg22-abhängig aktivierte MAPKs, *AtMPK3* und *AtMPK4*, für die in der bereits erwähnten Hefe-2-Hybrid-Analyse das VQ-Motiv enthaltene Protein nicht als Interaktor identifiziert wurde, zeigten sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nur negative FRET-Effizienzen (*AtMPK3*:  $-7,5 \pm 14,3\%$  Cytoplasma und  $-1,0 \pm 3,1\%$  Kern; *AtMPK4*:  $-4,4 \pm 4,6\%$  Cytoplasma und  $-1,4 \pm 5,9\%$  Kern; Daten nicht gezeigt), die sich nicht signifikant von denen der Negativkontrolle unterschieden. Es konnte also *via* FRET keine Interaktion zwischen dem VQ-Motiv-enthaltendem Protein und irgendeiner der getesteten MAPKs, *AtMPK3*, *AtMPK4* und *AtMPK6*, beobachtet werden.

Für das prolinreiche Protein wurde die Interaktion sowohl mit *AtMPK6* als auch mit *AtMPK11* verifiziert. Die FRET-Effizienz im Zellkern lag für *AtMPK6* bei  $8,5 \pm 2,3\%$  und für *AtMPK11* bei  $8,5 \pm 1,0\%$  (Kotransfektion von *AtMPK6* bzw. *AtMPK11* und dem prolinreichen Protein; Abb. 3.4 A) und unterschied sich nicht signifikant von der bei der

*At*MKK4-*At*MPK6-Interaktion erhaltenen FRET-Effizienz. Auch das prolinreiche Protein war, ebenso wie die MAPKen *At*MPK6 und *At*MPK11, zusätzlich cytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 3.4 B für *At*MPK6 und das prolinreiche Protein). Im Cytoplasma konnte aber keine Interaktion mit den MAPKen gemessen werden (FRET-Effizienzen  $0,5 \pm 3,8\%$  für *At*MPK6 bzw.  $1,6 \pm 4,1\%$  für *At*MPK11; Abb. 3.4 A).

Für das MADS-Box Protein konnte nach Kotransfektion mit *At*MPK6 weder im Cytoplasma ( $-8,5 \pm 4,1\%$ ) noch im Zellkern ( $-1,9 \pm 2,0\%$ ) FRET gemessen werden (Abb. 3.4 A und B). Das bedeutet, daß in diesem Fall das Hefe-2-Hybrid-Ergebnis *in planta* mit FRET nicht verifiziert werden konnte.

*At*ERF104 und *At*ERF105 zeigen eine Sequenzidentität von 91% auf DNA-Ebene und 61% Sequenzhomologie auf Proteinebene. Beide Proteine gehören zur Gruppe IV der ERF-Genfamilie (Nakano *et al.*, 2006). Für beide ERFs wurden Gateway-kompatible Entry-Clone von der Peking-Yale-Transkriptionsfaktor-Sammlung (Gong *et al.*, 2004) bestellt. Für *At*ERF105 enthielt der Peking-Yale-Entry-Klon drei Nukleotid-Austausche die zu D158N, R165H und A199V Aminosäure-Austauschen in der bei TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) vorhergesagten Proteinsequenz führten. Die Expression des korrekten Proteins, amplifiziert aus einem RIKEN (Seki *et al.*, 2002) cDNA-Klon, führte weder zu einer sichtbaren Fluoreszenz des CFP-Fusionsproteins, noch ließen sich HA-/CFP-Fusionsproteine in einer Western-Blot-Analyse detektieren (Daten nicht gezeigt). Die Verifizierung einer Interaktion von *At*ERF105 mit *At*MPK6 war daher nicht möglich. Nach Kotransfektion von *At*MPK6 bzw. 11 und *At*ERF104 wurden sowohl die MAPKen als auch *At*ERF104 nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert (Abb.3.4 B für *At*ERF104 und *At*MPK6). Die mittlere FRET-Effizienz im Kern betrug  $7,8 \pm 1,1\%$  (*At*MPK6) bzw.  $5,3 \pm 1,3\%$  (*At*MPK11) und unterschied sich nicht von der FRET-Effizienz der als Maßstab für erfolgreiche Interaktionen genommenen Interaktion von *At*MPK6 und *At*MKK4, jedoch sowohl von den Negativkontrollen als auch von der Positivkontrolle. Interaktionsstudien mit *At*ERF104 bilden den Hauptbestandteil dieser Arbeit und sind detailliert von Abschnitt 3.4 an beschrieben.



**Abb. 3.4 FRET-Analysen für MAPKs und ihre putativen Interaktoren:** **A)** Die Abbildung stellt FRET-Messungen für das VQ-haltige Protein-CFP (VQ-Prot.) und *At*MPK6-YFP (MPK6) bzw. das prolinreiche Protein (Prolinr. Prot.; C-terminal CFP markiert) mit *At*MPK6-YFP oder YFP-*At*MPK11 (MPK11), sowie für den MADS-Box-Transkriptionsfaktor (MADS-box; C-terminal CFP markiert) mit *At*MPK6-YFP, sowie *At*ERF104-CFP (ERF104) mit *At*MPK6-YFP bzw. YFP-*At*MPK11 dar. Die Farben der Säulen entsprechen den Signifikanzklassen entsprechend 3.2 A. In **B)** sind Aufnahmen von transfizierten aus Zellkultur gewonnenen Protoplasten zu sehen. Man sieht die Überlagerung des CFP- und des YFP-Kanals, wobei weiße Bereiche bedeuten, daß gleiche Anteile von CFP- und YFP-Fluoreszenz vorliegen. Man erkennt, daß für alle Kotransfektionen außer mit *At*ERF104, immer *At*MPK6-YFP (MPK6-YFP) und die C-terminal CFP-markierten Interaktoren sowohl cytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert sind. Diese Interaktoren sind das VQ-haltige Protein (VQ-CFP), das prolinreiche Protein (pr. Prot.-CFP), der MADS-Box-Transkriptionsfaktor (MADS-b.-CFP) und *At*ERF104-CFP (ERF104-CFP). Bei Kotransfektion von *At*ERF104-CFP mit *At*MPK6-YFP kann die Fluoreszenz nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert werden. Die eingezeichneten Maßstäbe entsprechen 5µm.

Um auszuschließen, daß die negativen FRET-Ergebnisse für die Interaktion einiger Kandidaten mit ihren jeweiligen MAPKs auf Grund transienter Interaktionen zustande gekommen waren, wurde zusätzlich das BiFC-System (BiFC – *bimolecular fluorescence complementation* oder auch *split-YFP*) für transient transfizierte Protoplasten in der Arbeitsgruppe etabliert.

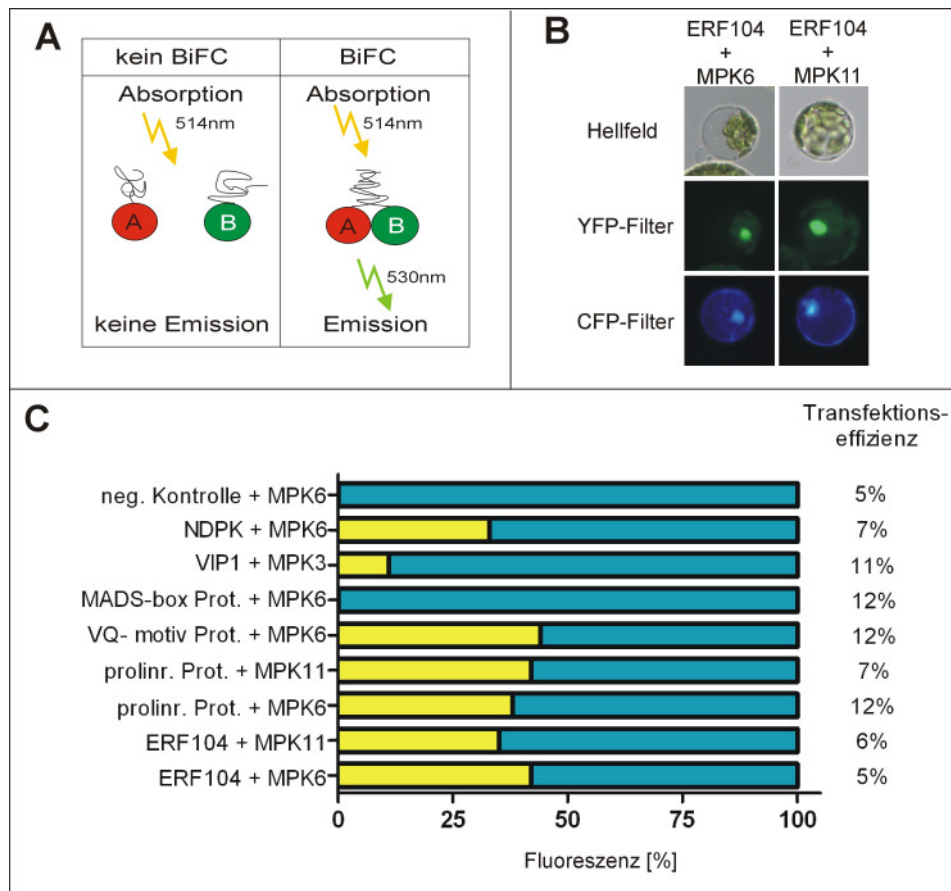
### 3.3 Bimolekulare Fluoreszenz-Komplementation

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen mit der *split-YFP*-Methode beruht auf der Faltung eines N- und eines C-terminalen YFP-Fragmentes zu einem stabilen, fluoreszierenden YFP-Protein, wenn beide Fragmente in starker räumlicher Nähe vorliegen (Hu *et al.*, 2002; Abb. 3.5 A). Die Ausbildung eines stabilen Komplexes ist zugleich Vor- und Nachteil dieser Methode. Einerseits lassen sich transiente Interaktionen analysieren, andererseits kann keine Analyse dynamischer Interaktionen erfolgen. Dies trifft zumindest auf die hier verwendeten Vektoren zu, welche von Walter *et al.* (2004) stammen. Es existieren mittlerweile auch neuere Systeme mit denen die Auflösung von *split*-YFP-Komplexen möglich ist (persönliche Mitteilung von Klaus Harter, ZMBP Tübingen, Deutschland).

Auf Grund der Möglichkeit durch die stabil gebildeten Komplexe auch transiente Interaktionen zu analysieren, wurde diese Methode für eine erneute Interaktionsstudie für die bereits im FRET untersuchten Proteine verwendet. Die BiFC-Messungen erfolgten nach transienter Überexpression der jeweiligen putativen Interaktoren fusioniert mit dem C- bzw. N-terminalen YFP-Fragment in aus Blattgewebe isolierten Protoplasten. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde zusätzlich freies CFP koexprimiert. Von allen transfizierten Protoplasten wurde dann der prozentuale Anteil YFP-fluoreszierender Protoplasten ermittelt, welcher Aufschluß über das Vorhandensein einer Interaktion zwischen den Zielproteinen gibt. Zur Kontrolle wurden die Interaktionspartner, welche mit einem der YFP-Fragmente fusioniert waren, mit dem leeren Vektor, der das andere YFP-Fragment enthielt, kotransfiziert. Für diese Negativkontrollen wurde keine YFP-Fluoreszenz beobachtet (Beispiel: leerer Vektor und *AtMPK6*, Abb. 3.5 C).

Für *AtERF104* und das prolinreiche Protein ließen sich die in FRET und Hefe-2-Hybrid gefundenen Interaktionen mit *AtMPK6* und 11 im *split-YFP* (Abb. 3.5 C) bestätigen. Alle resultierenden Komplexe waren überwiegend nukleär lokalisiert (Abb. 3.5 B für *AtERF104* mit *AtMPK6* bzw. *AtMPK11*). Für das VQ-Motiv enthaltende Protein konnte mit dieser Methode, wie zuvor im Hefe-2-Hybrid-Experiment beobachtet, eine Interaktion (44% YFP-Fluoreszenz) mit *AtMPK6* gefunden werden, was im FRET nicht der Fall war. Die für diese Interaktion beobachteten Komplexe waren hauptsächlich nukleär, aber auch in geringerem Maße cytoplasmatisch, lokalisiert.

Für das Protein aus der MADS-Box Familie konnte keine YFP-Fluoreszenz, d.h. keine Interaktion festgestellt werden (Abb. 3.5 C). Dies entspricht den Ergebnissen im FRET, was nahe legt, daß die Hefe-2-Hybrid-Analyse in diesem Fall ein falsch positives Ergebnis erbracht haben könnte.



**Abb. 3.5 Ergebnisse der BiFC-Analysen:** **A)** Das Prinzip von BiFC: Interagieren Proteine miteinander, welche mit der N- bzw. C-terminalen Hälfte von YFP fusioniert wurden, wird ein funktionstüchtiges YFP gefaltet und man kann nach Anregung mit 514nm YFP-Fluoreszenz detektieren. Interagieren die Proteine nicht, wird kein funktionstüchtiges YFP gebildet. Und es kann keine YFP-Fluoreszenz beobachtet werden. **B)** Beispielhafte mikroskopische Darstellung von BiFC für die Interaktion von *At*ERF104-„C-terminales YFP-Fragment“ und *At*MPK6-„N-terminales-YFP-Fragment“ bzw. „N-terminales-YFP-Fragment“-*At*MPK11. Der Maßstab entspricht 10µm. In beiden Fällen kann neben der Transfektionseffizienzkontrolle (freies CFP) auch YFP-Fluoreszenz im Zellkern beobachtet werden. Die YFP-Fluoreszenz ist indikativ für das Vorhandensein einer Interaktion zwischen *At*ERF104 und *At*MPK6 bzw. *At*MPK11. **C)** Das Diagramm zeigt den Anteil der YFP-Fluoreszenz (gelb) an der gemessenen CFP-Fluoreszenz (Kontrolle der Transfektionseffizienz, immer 100% gesetzt, blau) für verschiedene analysierte Interaktionen. Das Vorhandensein von YFP-Fluoreszenz ist indikativ für das Vorhandensein einer Interaktion der Zielproteine. Die Negativkontrolle (C-terminales Fragment von YFP allein) zeigt keine Interaktion mit *At*MPK6.

Weiterhin wurden im Hefe-2-Hybrid-Experiment auch bereits publizierte MAPK-Interaktoren wie *At*VIP1 als *At*MPK3-Interaktor (Djamei *et al.*, 2007) und *At*NDPK2 als *At*MPK6-Interaktor (Moon *et al.*, 2003) identifiziert. Das gibt einen zusätzlichen Hinweis darauf, daß die Hefe-2-Hybrid-Analyse „echte“ MAPK-Interaktoren, wie sie in

*Arabidopsis* tatsächlich auftreten, identifizieren konnte. Die genannten Interaktionen wurden mit dem *split*-YFP-System verifiziert. Dabei lag der Anteil YFP-fluoreszierender Protoplasten für *AtVIP1* und *AtMPK3* bei 11,8% für *AtNDPK2* und *AtMPK6* bei 33,3% (Abb. 3.5 C).

Für *AtERF104* konnte eine Interaktion mit *AtMPK11* und *AtMPK6* mit drei verschiedenen Methoden, Hefe-2-Hybrid, FRET und BiFC, gezeigt werden. Weiterhin handelt es sich bei *AtERF104* um einen putativen Transkriptionspartner der ERF-Genfamilie. Da MAPKen die Integration extrazellulärer Signale in zelluläre Antworten steuern, wird vermutet, daß Transkriptionsfaktoren bevorzugte Substrate von MAPKen darstellen. Die nachfolgenden Analysen wurden daher auf *AtERF104* fokussiert. Weil das BiFC-System nicht die Möglichkeit zur Analyse dynamischer Protein-Protein-Interaktion bietet, wurde für weitere Interaktionsstudien mit *AtERF104* FRET eingesetzt.

### **3.4 Charakterisierung der AtMPK6- bzw. AtMPK11-AtERF104-Interaktion**

#### **3.4.1 Die MAPK-AtERF104-Interaktion ist dynamisch**

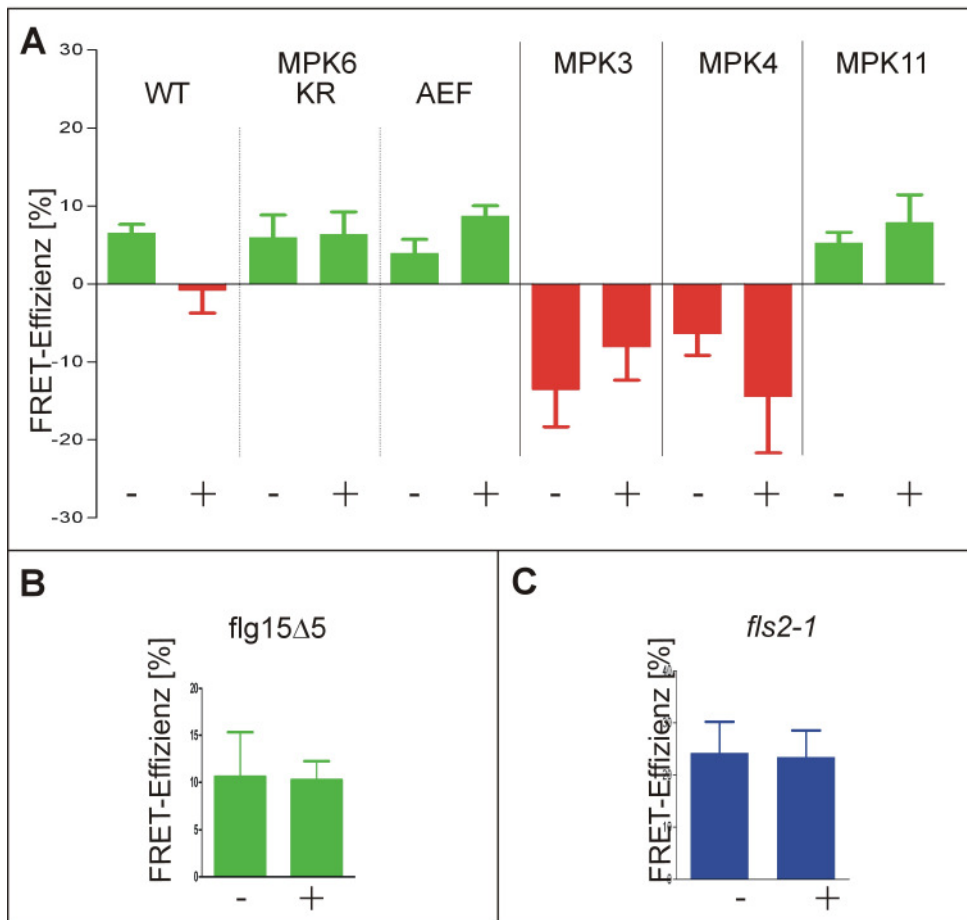
Für *AtERF104* konnte mittels FRET eine Interaktion mit *AtMPK6* und *AtMPK11* (Abb. 3.4 A und 3.6 A), nicht aber mit *AtMPK3* ( $-13,5 \pm 4,8\%$ ) bzw. *AtMPK4* ( $-9,7 \pm 2,8\%$ ) gezeigt werden (Abb. 3.6 A).

Da *AtMPK6* durch flg22-Behandlung aktiviert wird, sollte analysiert werden, ob flg22-Zugabe einen Effekt auf die *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion hat. In der Tat erfolgte nach flg22-Zugabe eine sehr schnelle Auflösung der Interaktion innerhalb von 5 bis 15 Minuten. In diesem Zeitraum sind MAPKen nach Elicitor-Behandlung durchschnittlich am stärksten aktiviert (Asai *et al.*, 2002; Kroj *et al.*, 2003). Die FRET-Effizienz betrug dann  $-0,8 \pm 2,9\%$  und unterschied sich nicht signifikant von den Negativkontrollen (Abb. 3.6 A). Weiterfolgende Untersuchungen sollten versuchen zu beleuchten, ob die *AtMPK6*-Aktivität direkt einen Einfluß auf die Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion hat. Daher wurden FRET-Messungen mit kinaseinaktiven Varianten von *AtMPK6*, *AtMPK6KR* (mutiert in der ATP-Bindestelle) und *AtMPK6AEF* (mutiert in der Aktivierungsstelle), durchgeführt. Beide kinaseinaktiven *AtMPK6*-Varianten



interagierten sowohl vor als auch nach flg22-Behandlung mit *At*ERF104 (MPK6KR:  $5,9 \pm 2,9\%$  unbehandelt,  $6,3 \pm 3,0\%$  nach flg22-Behandlung; MPK6AEF:  $3,9 \pm 1,8\%$  ohne flg22,  $8,7 \pm 1,4\%$  nach flg22-Behandlung; Abb. 3.6 A). Die *At*MPK6-Kinaseaktivität ist also entscheidend für die Auflösung der *At*ERF104-*At*MPK6-Interaktion.

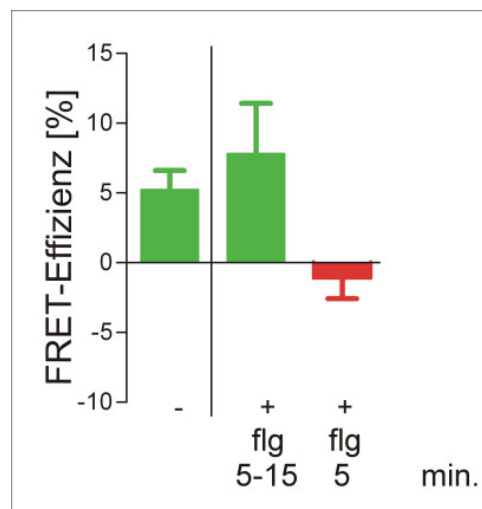
Weiterhin sollte getestet werden, ob tatsächlich flg22-abhängige Signaltransduktion und nicht Handhabung oder Nebenbestandteile der flg22-Synthese für diese Auflösung der *At*ERF104-*At*MPK6-Interaktion verantwortlich sind. Deshalb wurden die transfizierten Protoplasten mit flg15 $\Delta$ 5 vorbehandelt (welches den flg22-Rezeptor FLS2 blockiert; Felix *et al.*, 1999) und anschließend mit flg22 elicitiert. Dabei wurde eine mittlere FRET-Effizienz von  $10,6 \pm 4,3\%$  in nicht flg22-behandelten Protoplasten und eine FRET-Effizienz von  $10,2 \pm 2,4\%$  nach flg22-Behandlung gemessen (Abb. 3.6 B). Beide Werte unterscheiden sich nicht signifikant von der FRET-Effizienz, der als Maßstab für Interaktion genommenen, *At*MPK6-*At*MKK4-Interaktion, d.h. in flg15 $\Delta$ 5 vorbehandelten Protoplasten interagieren *At*MPK6 und *At*ERF104 unabhängig von flg22-Behandlung. Vergleichbare Ergebnisse wurden in aus *fls2*-Blattmaterial gewonnenen Protoplasten gefunden, dort lag die FRET-Effizienz in den unbehandelten Protoplasten bei  $24,2 \pm 5,1\%$ , nach flg22-Behandlung bei  $23,4 \pm 5,2\%$  (Abb. 3.6 C), d.h. vor und nach flg22-Behandlung findet eine Interaktion zwischen *At*MPK6 und *At*ERF104 statt. Die hohen Werte für FRET-Effizienzen in *fls2* unterschieden sich nicht signifikant von der Positivkontrolle. Wenn also der flg22-Rezeptor FLS2 blockiert oder nicht vorhanden ist, dann kann keine flg22-Signaltransduktion stattfinden, gleichzeitig wird die *At*MPK6-*At*ERF104-Interaktion nicht aufgelöst.



**Abb. 3.6 FRET-Analysen für AtERF104:** **A)** zeigt die Analyse der Interaktion von AtERF104-CFP mit AtMPK6(KR/AEF)-YFP, YFP-AtMPK3, YFP-AtMPK4 bzw. YFP-AtMPK11 in aus Zellkulturmaterial gewonnenen Protoplasten. Die Protoplasten wurden unbehandelt (-) oder 5-15 Minuten nach Behandlung mit 100nM flg22 (+) mikroskopiert. AtERF104 interagiert mit AtMPK6 und deren kinaseinaktiven Versionen AtMPK6KR bzw. AtMPK6AEF. Die Interaktion von AtERF104 mit der Wildtyp-AtMPK6-Variante läßt sich durch flg22-Behandlung auflösen. AtERF104 interagiert nicht mit AtMPK3 bzw. AtMPK4, jedoch mit AtMPK11. Die Interaktion mit AtMPK11 läßt sich nicht mit flg22 auflösen. **B)** Vorbehandlung mit inaktivem flg15Δ5 verhindert die flg22-abhängige (+) Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion. **C)** In fls2 erfolgt keine Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion durch flg22-Behandlung (+). Die Farben der Säulen entsprechen immer den entsprechenden Signifikanzklassen (Vgl. Abb. 3.2 A), wobei rot für keine Interaktion, grün für Interaktion und blau für Interaktion, die der Positivkontrolle entspricht, steht.

AtMPK11 und AtERF104 interagierten im FRET ebenfalls, daher wurde auch hier versucht die Interaktion durch flg22-Gabe aufzulösen. Dies war aber im gleichen Zeitfenster wie für AtMPK6 (5-15 Minuten) nicht möglich (Vgl. Abb. 3.6 A und 3.7). Da zu Beginn der Analysen keine Erkenntnisse über mögliche Stimuli, welche AtMPK11 aktivieren können vorlagen, erschien dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Damals war nur bekannt, daß die AtMPK11-Genexpression nach Kupfer-, NaCl-, Cadmium- (Veß, 2004) und flg22- Behandlung (Zipfel *et al.*, 2004) anstieg. Wichtig für die Funktion von MAPKs ist jedoch Aktivierung auf Proteinebene und nicht vordergründig

Transkriptakkumulation (Zhang und Klessig, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Gegen Ende der vorliegenden Arbeit ergaben sich jedoch Hinweise auf eine mögliche Aktivierung von *AtMPK11* durch PAMPs (Daten nicht gezeigt). Daher wurden die Analysen zur Auflösung der *AtMPK11-AtERF104*-Interaktion mittels flg22-Behandlung wiederholt. Tatsächlich konnte mit flg22-Behandlung innerhalb von 5 Minuten nach Behandlung eine Auflösung der Interaktion beobachtet werden (Abb. 3.7). Dies läßt vermuten, daß die Aktivierung von *AtMPK11* transienter ist, als die der anderen flg22-abhängig aktivierten MAPK, *AtMPK3*, *AtMPK4* und *AtMPK6*.

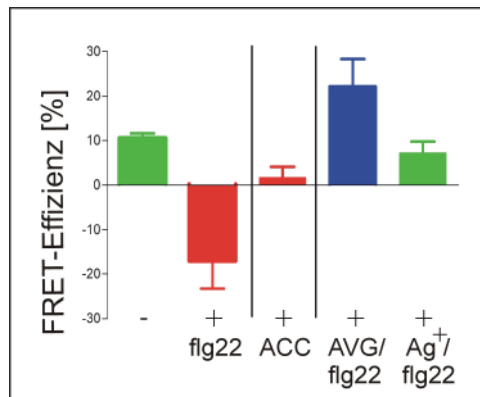


**Abb. 3.7 FRET-Messungen für die *AtERF104-AtMPK11*-Interaktion:** *AtMPK11* und *AtERF104* interagieren. Diese Interaktion läßt sich durch flg22-Behandlung (100nM) über einen Zeitraum von 5 bis 15 Minuten nicht auflösen. FRET-Messungen 5 Minuten nach flg22-Behandlung zeigen, daß die *AtERF104-AtMPK11*-Interaktion durch diese kürzere flg22-Behandlung aufgelöst werden kann. Die Farben der Säulen entsprechen den Signifikanzklassen aus Abb. 3.2 A.

### 3.4.2 Der Einfluß des Ethylensignalweges auf die *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion

Da *AtERF104* ein Mitglied der *Ethylen-Response-Factor*-Familie ist, war es interessant zu untersuchen, ob möglicherweise Ethylen und der Signalweg, der nach Ethylen-Behandlung initiiert wird, einen Einfluß auf die *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion haben könnten. Interessanterweise führte die Zugabe des Ethylenvorläufers ACC (1-Aminocyclopropan 1-Carboxylsäure), ebenso wie die bereits erwähnte flg22-Behandlung, innerhalb weniger (5 bis 15) Minuten zur Auflösung der *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion (FRET-Effizienz:  $1,7 \pm 2,4\%$  - Abb. 3.8). Weiterhin konnte gezeigt

werden, daß flg22-Signalgebung nach Vorbehandlung mit AVG (Aminoethoxyvinylglycin), einem Ethylenbiosynthese-Inhibitor, bzw. Silberionen, welche die Ethylenperzeption inhibieren, nicht mehr zur Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion führte (Abb. 3.8). Die Ethylensignalgebung hat also offensichtlich einen Einfluß auf die flg22-abhängige Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion.



**Abb. 3.8** Die Interaktion zwischen AtMPK6-YFP und AtERF104-CFP wird durch 1µM ACC aufgelöst und nach Vorbehandlung mit AVG (10µM) bzw. Silberionen (100µM) nicht mehr durch flg22 aufgelöst. Die Analyse erfolgte in Protoplasten die aus Col-0-Blättern gewonnen wurden. Die Farben der Säulen entsprechen immer den entsprechenden Signifikanzklassen (Vgl. Abb. 3.2 A), wobei rot für keine Interaktion, grün für Interaktion und blau für Interaktion, die der Positivkontrolle entspricht, steht.

Die in Abb. 3.8 gezeigten FRET-Analysen wurden in aus Col-0-Blättern gewonnenen Protoplasten durchgeführt um die Vergleichbarkeit mit anschließend durchgeführten FRET-Messungen in Mesophyllprotoplasten, aus Blattmaterial von Ethylensignalgebungs-Mutanten, zu gewährleisten. Die Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion sollte in *etr1* (*ethylene-resistant 1*)-3 -, *ein2* (*ethylene-insensitive 2*)-1-, *ein3-1*- und *ein3-1/eil1* (*ein3-like 1*)-1-Hintergrund untersucht werden.

In Protoplasten aus *etr1-3*-Pflanzen konnte durch flg22-Behandlung eine Reduktion der FRET-Effizienz von  $8,0 \pm 4,1\%$  auf  $-0,5 \pm 3,0\%$  beobachtet werden (Abb. 3.9 A). Die erhaltene FRET-Effizienz unterschied sich dabei nicht signifikant von der Negativkontrolle. Das bedeutet, daß die Ethylenperzeption scheinbar keine Rolle bei der Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion hat. Dieses Ergebnis wird aber durch die Tatsache, daß *etr1-3* eine schwache AtETR1-Mutante ist, abgeschwächt (Penninckx *et al.*, 1998).

Die AtERF104-AtMPK6-Interaktion konnte ebenfalls in der ethyleninsensitiven Mutante *ein3-1* durch flg22-Behandlung aufgelöst werden. Dabei sank die FRET-Effizienz von  $17,4 \pm 4,7\%$  vor auf  $1,8 \pm 6,6\%$  nach flg22-Gabe (Abb. 3.9 A). Aus der Literatur ist aber

bekannt, daß diese Mutante eine gewisse genetische Redundanz aufweist, da drei weitere EIN3-ähnliche Proteine, EIL1, EIL2 und EIL3, überlappende Subsets von ethylenabhängigen Antworten regulieren (Alonso *et al.*, 2003). Deshalb sollte anschließend die *ein3-1/eil1-1*-Doppelmutante verwendet werden, da für diese ein stärkerer Phänotyp beschrieben worden ist (Alonso *et al.*, 2003). In *ein3-1/eil1-1* kam es zwar nach flg22-Behandlung zu einer Reduktion der FRET-Effizienz von  $24,2 \pm 7,3\%$  auf  $14,0 \pm 4,5\%$ , jedoch ließ sich die Interaktion nicht auflösen (Abb. 3.9 A). Die erhaltene FRET-Effizienz unterscheidet sich ebenso wie vor flg22-Behandlung nicht signifikant von der der Positivkontrolle.

In der starken ethyleninsensitiven Mutante *ein2-1* konnte die *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion ebenfalls nicht durch flg22-Behandlung aufgelöst werden. Die FRET Effizienz stieg hierbei von  $16,8 \pm 3,9\%$  auf  $23,3 \pm 4,2\%$  an und unterschied sich weder vor noch nach flg22-Behandlung signifikant von der Positivkontrolle (Abb. 3.9 A). Ebenso konnte die Interaktion in diesen Zellen nicht durch ACC aufgelöst werden, was darauf hindeutet, daß keine toxischen Nebenprodukte der ACC-Metabolisierung für die ACC-abhängige Auflösung der Interaktion in Col-0 verantwortlich waren (Daten nicht gezeigt). Die gegenüber aus Col-0-Blattmaterial gewonnenen Protoplasten erhöhten FRET-Effizienzen in den Ethylensignaltransduktions-Mutanten deuten eventuell darauf hin, daß im Wildtyp-Hintergrund auf Grund der Protoplastierung etwas Ethylensignaltransduktion stattfindet, also möglicherweise die Stärke der Interaktion auch ohne zusätzliche Behandlung bereits durch diese protoplastierungsabhängige Ethylensignalgebung reduziert sein könnte.

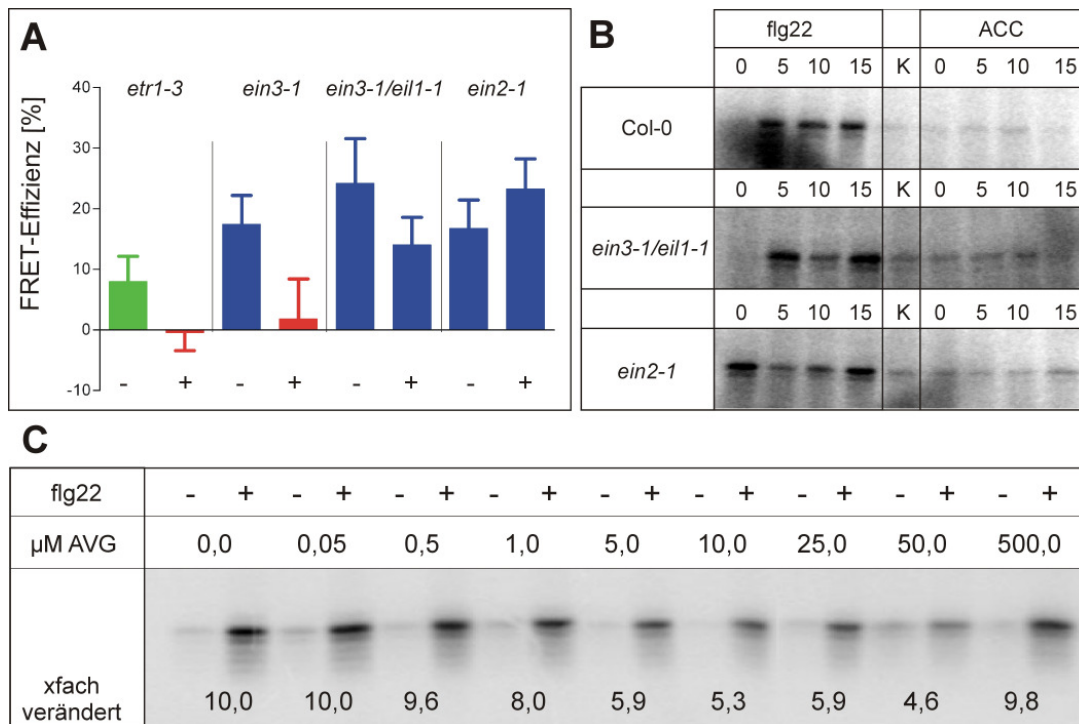
Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse auf eine sehr schnell stattfindende Ethylen-Signalgebung in der flg22-abhängigen Auflösung der *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion hin.

### **3.4.2.1 Die Position von *AtMPK6* im Ethylensignalweg**

Sowohl die Aktivität der MAPK *AtMPK6*, als auch die Ethylensignaltransduktion beeinflussen die Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion. Auch in der Literatur gibt es bereits verschiedene Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen MAPK-Kaskaden und Ethylen. (Liu und Zhang, 2004) konnten zeigen, daß schon zwei Stunden nach flg22-Behandlung in *Arabidopsis thaliana* Ethylenproduktion stattfand. Diese

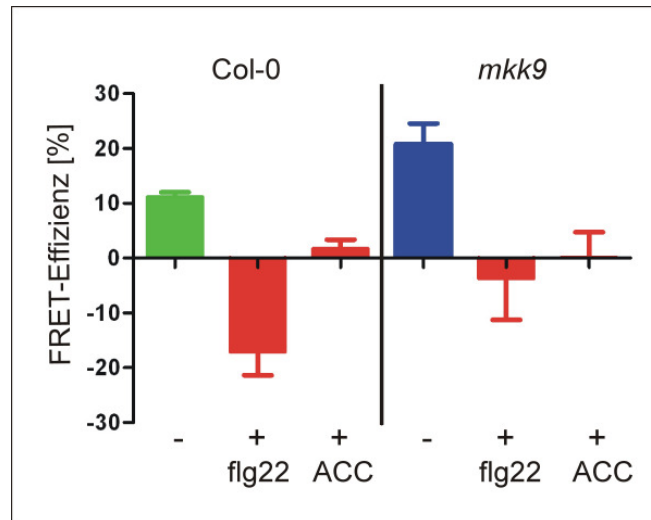
Ethylenproduktion war *AtMPK6*-abhängig, denn *AtMPK6* phosphoryliert *AtACS2* (*ACC Synthase 2*) und *AtACS6*. Die Phosphorylierung beeinflusst die Stabilität von *AtACS6* (Joo *et al.*, 2008) und führt dadurch zur Steigerung der Ethylenbiosyntheserate (Liu und Zhang, 2004). Von (Ouaked *et al.*, 2003) wurde jedoch gezeigt, daß *AtMPK6* und *AtMPK13* im Verlauf der Ethylensignalgebung *AtCTR1* (*constitutive triple response*)-abhängig aktiviert werden. Es wurde schon länger vermutet, daß unterhalb von *AtCTR1*, einer Schlüsselkomponente der Ethylensignaltransduktion, eine MAPK-Kaskade in der Ethylensignaltransduktion beteiligt ist. Dies wird auf Grund der Tatsache angenommen, daß es sich bei *AtCTR1* um eine Raf-ähnliche MAPKKK handelt. Neuere Publikationen bestätigen, daß *AtMPK6* sowohl für die Ethylenbiosynthese notwendig als auch im Signalweg unterhalb von *AtCTR1* beteiligt ist. Dabei wird eine *AtCTR1-AtMKK9-AtMPK3/6*-MAPK-Kaskade postuliert (Yoo *et al.*, 2008). Ouaked *et al.* (2003) und Yoo *et al.* (2008) konnten eine *AtMPK6*-Aktivierung nach ACC-Behandlung zeigen. Jedoch konnten Liu und Zhang (2004) keine *AtMPK6*-Aktivierung nach ACC-Behandlung nachweisen. Daher wurde in dieser Arbeit ebenfalls getestet, ob ACC *AtMPK6* aktivieren kann. Dies war innerhalb der ersten 15 Minuten in Keimlingen nicht der Fall (Abb. 3.9 B).

Falls Ethylen im Signalweg oberhalb von *AtMPK6* eine Rolle spielt, dann müßte die *flg22*-abhängige Aktivierung von *AtMPK6* durch die Zugabe des Ethylenbiosynthese-Inhibitors AVG blockiert werden können. Ebenso würde man erwarten, daß in den Ethylen-Signalweg-Mutanten keine *AtMPK6*-Aktivierung durch *flg22* stattfinden würde. Die AVG-Vorbehandlung hatte aber nur marginale Effekte auf die *AtMPK6*-Aktivierung nach *flg22*-Behandlung (Abb. 3.9 C). Ebenso war die *AtMPK6*-Aktivierung in den Ethylensignalweg-Mutanten nicht blockiert, sie variierte nur leicht von Experiment zu Experiment (Abb. 3.9 B). Bekanntermaßen zeigen einige der Ethylen-Mutanten genetische Redundanzen. Da aber auch die stärkste Ethylen-Mutante (Schaller und Kieber, 2002) *ein2-1* keine Reduktion in der *AtMPK6*-Aktivierung aufwies, ist es unwahrscheinlich, daß diese Ergebnisse auf Grund von Redundanzen zu erklären wären.



**Abb. 3.9 Position von AtMPK6 in der Ethylensignaltransduktion:** **A)** In Mutanten der Ethylensignaltransduktion erfolgt keine flg22-abhängige (+) Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion. Die Farben der Säulen entsprechen Signifikanzklassen nach Mann-Whitney-Analyse (s. Abb. 3.3. **A)** **B)** Immunkomplex-Kinase-Experimente mit zehn Tage alten Keimlingen ergaben, daß flg22 auch in Mutanten der Ethylensignaltransduktion AtMPK6 aktiviert und daß 1  $\mu\text{M}$  ACC nicht zur Aktivierung von AtMPK6 führt. **C)** Immunkomplex-Kinase-Experimente zeigten, daß eine Vorbehandlung von *Arabidopsis*-Zellkultur mit AVG nicht die flg22-abhängige Aktivierung von AtMPK6 verhindert.

Um zu analysieren, ob der Signalweg über *AtCTR1* und *AtMKK9* in unseren Analysen eine Rolle spielt, wurde untersucht, ob in Protoplasten aus *mkk9*-Blattgewebe eine Auflösung der *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion möglich ist. Die FRET-Effizienz in unbehandelten *mkk9*-Pflanzen lag dabei bei  $20,8 \pm 3,8\%$  und wurde nach flg22- auf  $-3,7 \pm 7,6\%$  bzw. nach ACC-Behandlung auf  $0,2 \pm 4,6\%$  reduziert (Abb. 3.10). Die FRET-Effizienz in *mkk9* unterschied sich nicht signifikant von der Positivkontrolle und nach flg22- bzw. ACC-Behandlung nicht signifikant von der Negativkontrolle. Das heißt sowohl die flg22- als auch die Ethylensignaltransduktion, die zur Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion führen sind unabhängig von der *AtCTR1*-gesteuerten *AtMKK9-AtMPK3/6*-MAPK-Kaskade.



**Abb. 3.10 Die Auflösung der *At*ERF104-*At*MPK6 ist unabhängig von *At*MKK9:** FRET-Messungen in Protoplasten aus Col-0- bzw. *mkk9*-Blättern zeigen, daß sich die *At*MPK6-*At*ERF104-Interaktion *At*MKK9-unabhängig durch flg22 und ACC auflösen läßt. Die Farben der Säulen entsprechen den Signifikanzklassen aus Abb. 3.2 A.

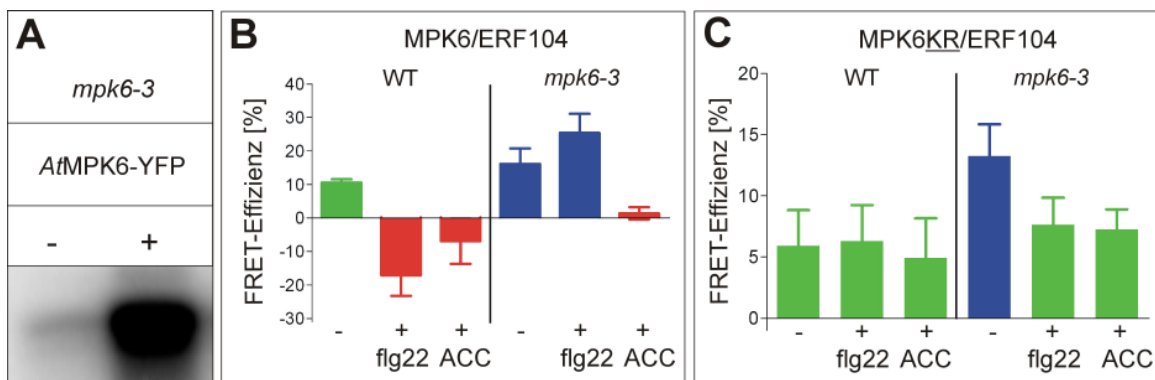
### 3.4.3 Die Rolle der endogenen *At*MPK6 in der Auflösung der *At*MPK6-*At*ERF104-Interaktion

Alle bisherigen Untersuchungen wurden in aus Col-0-Blattmaterial oder -Zellkultur hergestellten Protoplasten durchgeführt, welche neben der überexprimierten *At*MPK6-YFP auch endogene *At*MPK6 enthielten. Möglicherweise lassen sich die relativ geringen FRET-Effizienzen für die *At*MPK6-*At*ERF104-Interaktion in diesen Protoplasten darauf zurückführen, daß ein Teil der *At*ERF104-CFP-Fusionsproteine endogene *At*MPK6 an Stelle von *At*MPK6-YFP gebunden hat und daher die tatsächliche Interaktion in diesen Messungen unterschätzt worden ist. Daher wurden FRET-Analysen im *mpk6-3*-Hintergrund durchgeführt. Tatsächlich konnte in *mpk6-3* eine höhere mittlere FRET-Effizienz von  $16,2 \pm 4,6\%$  im Vergleich zu  $11,2 \pm 0,9\%$  im Col-0-Hintergrund gemessen werden. Diese unterschied sich nicht signifikant von der FRET-Effizienz der Positivkontrolle (Abb. 3.11 B).

Interessanterweise konnte die *At*MPK6-*At*ERF104-Interaktion in Protoplasten aus *mpk6-3*-Pflanzen jedoch nicht durch flg22 (FRET-Effizienz  $26,9 \pm 5,9\%$ ), wohl aber durch ACC (FRET-Effizienz  $2,3 \pm 1,5\%$ ) aufgelöst werden (Abb. 3.11 B). Dies scheint im Widerspruch dazu zu stehen, daß sich *At*MPK6-YFP im *mpk6-3*-Hintergrund durch flg22 aktivieren läßt (Abb. 3.11 A), also funktional ist. Das bedeutet, trotz Funktionalität von *At*MPK6-YFP in Bezug auf Aktivierbarkeit durch flg22, kann dieses Konstrukt nicht den



Verlust der endogenen *AtMPK6* in Bezug auf die Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion durch *flg22* komplementieren. Eine Erklärung für dieses Phänomen läßt sich eventuell in der Lokalisation von *AtMPK6-YFP* nach Kotransfektion mit *AtERF104-CFP* finden. Die endogene *AtMPK6* befindet sich vor Elicitierung hauptsächlich im Cytoplasma, geringe Mengen auch im Zellkern (Ahlfors *et al.*, 2004; Bethke, 2004). Die transgene *AtMPK6-YFP* hingegen befand sich in allen Experimenten nach Kotransfektion mit *AtERF104-CFP* nahezu ausschließlich im Zellkern (Abb. 3.4 B). Unter der Annahme, daß die endogene *AtMPK6* also auch nach Expression von *AtERF104-CFP* weiterhin hauptsächlich cytoplasmatisch vorliegen würde, da sie z.B. schon vor der Transfektion mit *AtERF104-CFP* in eventuell vorhandene Komplexe eingebunden war, läßt sich vermuten, daß der Unterschied in den Protoplasten aus *mpk6-3*-Blattmaterial dann allein in der Lokalisation von *AtMPK6* liegen könnte. Da die *AtMPK6*-abhängige *AtACS2/6*-Aktivierung (Liu und Zhang, 2004), welche zur Ethylenbiosynthese führt, im Cytoplasma stattfindet, kann Ethylenbiosynthese in *mpk6-3* vermutlich nicht ablaufen, wenn die transient exprimierte *AtMPK6-YFP* ausschließlich im Zellkern lokalisiert vorliegt. Auch die Auflösung der Interaktion nach ACC-Behandlung unterstützt diese These, denn in diesem Fall wird die cytoplasmatische Funktion von *AtMPK6*, Phosphorylierung von *AtACS6* und damit Initiierung der Ethylenbiosynthese, durch exogene Applikation des Ethylenvorläufers ACC überkommen.



**Abb. 3.11 FRET-Analysen in Col-0 und *mpk6-3*-Mutanten:** **A)** Ein Immunkomplex-Kinase-Experiment mit unbehandelten und für zehn Minuten mit 100nM *flg22*-behandelten (+) Protoplasten aus *mpk6-3*-Blattmaterial, die *AtMPK6-YFP* exprimieren, zeigt, *AtMPK6-YFP* läßt sich ohne das zusätzliche Vorhandensein endogener *AtMPK6* aktivieren. **B)** *Flg22* (100nM)- und ACC (1 $\mu$ M)-Behandlung führen in Protoplasten aus Col-0-Pflanzen zur Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion. In *mpk6-3* erfolgt die Auflösung dieser Interaktion nur noch durch ACC. **C)** Die Interaktion zwischen *AtMPK6KR* und *AtERF104* läßt sich weder in Wildtyp-Protoplasten noch in Protoplasten aus *mpk6-3*-Pflanzen durch *flg22* bzw. ACC auflösen. Die Farben der Säulen entsprechen den Signifikanzklassen aus Abb. 3.2 A.

### 3.4.4 Wirken die kinaseinaktiven AtMPK6-Varianten als „Substratfalle“?

Die beschriebenen Daten deuten auf eine Enzym-Substrat-Wechselwirkung zwischen AtMPK6 und AtERF104 hin. Trotzdem scheinen endogene AtMPK6 und/oder schnelle Ethylen-Signalgebung ebenfalls essentiell für die Auflösung der AtMPK6-AtERF104-Interaktion zu sein.

Dabei stellt sich die Frage, warum die Interaktion zwischen den kinaseinaktiven AtMPK6-Varianten und AtERF104 im Col-0-Hintergrund trotz Vorhandensein endogener AtMPK6 nicht aufgelöst werden konnte. Um auszuschließen, daß die Art der Protoplasten für diese Ergebnisse eine Rolle spielt, wurden die Experimente für AtMPK6KR in aus Col-0- bzw. *mpk6-3*-Blattgewebe gewonnenen Protoplasten wiederholt (Abb. 3.11 B). In keinem Fall wurde eine Auflösung der AtMPK6KR-AtERF104-Interaktion beobachtet. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen wäre, daß die inaktiven Kinasen möglicherweise in einer negativ dominanten Weise mit den aktiven endogenen AtMPK6-Molekülen bezüglich der ACS-Phosphorylierung und Ethylensignaltransduktion konkurrieren könnten. Wäre das der Fall, dann müßte sich die Interaktion im *mpk6-3*-Hintergrund jedoch durch ACC-Zugabe aufheben lassen. Dies war jedoch nicht möglich (Abb. 3.11 B). Daher wäre eine weitere Erklärung, daß die AtERF104-Bindfähigkeit der kinaseinaktiven AtMPK6-Moleküle im Vergleich zu den Wildtyp AtMPK6-Molekülen deutlich erhöht sein könnte. Die Hypothese, daß inaktive AtMPK6 als „Substratfalle“ (Berg *et al.*, 2007) wirken kann, ließ sich aber leider nicht überprüfen, da weder *Biacore*-Messungen noch *Pull-Down*-Experimente mit AtMPK6 und AtMPK6KR durchführbar waren, da AtMPK6 an die verschiedenen verwendeten Trägermaterialien unspezifisch gebunden hat.

Zusammenfassend kann man feststellen, daß sowohl die AtMPK6-Kinaseaktivität als auch schnelle Ethylensignaltransduktion entscheidend für die Auflösung der AtMPK6-AtERF104-Interaktion sind.

### 3.5 AtMPK6 phosphoryliert AtERF104

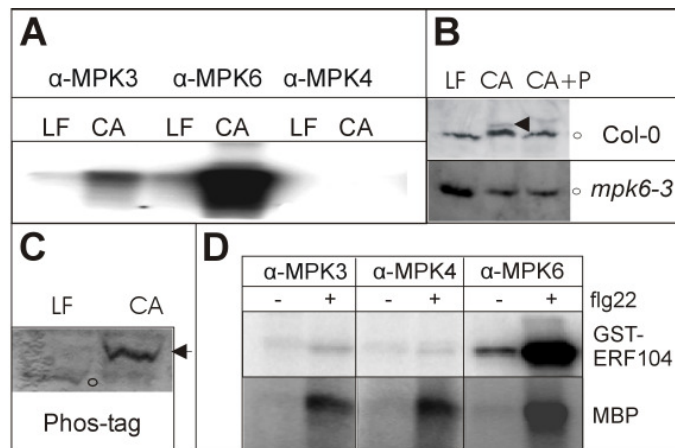
Die Notwendigkeit AtMPK6 für die Auflösung der AtERF104-AtMPK6-Interaktion zu aktivieren, ist ein Hinweis auf eine mögliche Enzym-Substrat-Beziehung zwischen AtMPK6 und AtERF104. Auch das Vorhandensein von mindestens drei potentiellen MAPK-Phosphorylierungsstellen (Gustin *et al.*, 1998) in AtERF104 (Nakano *et al.*, 2006) unterstützt die Hypothese einer Enzym-Substrat-Beziehung.

Um zu testen, ob AtERF104 in der Tat ein AtMPK6 Substrat ist, wurden in einem transienten Experiment AtERF104-HA mit dem Petersilien-Homologen von AtMKK4/5, PcMKK5, entweder als konstitutiv aktive (CA, *constitutive active*) oder inaktive Form (LF, *loss of function*) kotransfiziert. Die konstitutiv aktive Form von PcMKK5 kann in *Arabidopsis* spezifisch AtMPK3 und AtMPK6 nicht aber AtMPK4 aktivieren (Abb. 3.12 A). Nach Kotransfektion von AtERF104-HA und PcMKK5-CA war zusätzlich eine zweite AtERF104-Bande im SDS-Gel im Vergleich zur Koexpression mit der inaktiven Variante zu beobachten (Abb. 3.12 B). Diese Bande wies einen „Shift“ in den höher molekularen Bereich auf. Dieser war stärker, wenn in das SDS-Gel ein acrylamidkonjugierter *Phos-tag* einpolymerisiert wurde, welcher in der Lage ist, Phosphogruppen zu binden und so zu einer Retardierung phosphorylierter Proteine im SDS-Gel führt (Kinoshita *et al.*, 2005; Abb. 3.12 C).

Wurde zusätzlich zu AtERF104-HA und der konstitutiv aktiven PcMKK5 noch eine Phosphatase exprimiert (At2g40180, Andrea Gust), führte das dazu, daß die zweite AtERF104-Bande wieder verschwand und nur eine einzelne Bande auf gleicher Höhe wie nach Koexpression von AtERF104-HA mit der inaktiven MAPKK im SDS-Gel detektiert werden konnte (Abb. 3.12 B).

Im *mpk6-3*-Hintergrund ließ sich keine zusätzliche Bande nach Koexpression von AtERF104-HA und der konstitutiv aktiven PcMKK5 erkennen (Abb. 3.12 B).

Das bedeutet, daß AtERF104 in AtMPK6-abhängiger Weise *in vivo* phosphoryliert wird.



**Abb. 3.12 AtMPK6-abhängige Phosphorylierung von AtERF104:** **A)** Immunkomplex-Kinase-Experimente zeigten, daß die Expression einer konstitutiv aktiven MKK (*PcMKK5*) zur Aktivierung von AtMPK3 und AtMPK6, nicht jedoch AtMPK4 führt. **B)** Die Koexpression der konstitutiv aktiven *PcMKK5* und AtERF104-HA in Wildtyp-Protoplasten führt zum Auftauchen einer zweiten in Richtung höherem Molekulargewicht verschobenen AtERF104-HA Bande im *Western-Blot*. Diese Verschiebung läßt sich durch Phosphatase-Behandlung revertieren. Es erfolgt keine Verschiebung in Protoplasten aus *mpk6-3*-Blattmaterial. **C)** Die Verschiebung ist erhöht wenn *Phos-tag* in das SDS-Gel einpolymerisiert wurde. **D)** Immunkomplex-Kinase-Experimente zeigten, daß rekombinantes GST-AtERF104 nur von AtMPK6, nicht jedoch AtMPK3 bzw. AtMPK4 phosphoryliert wird. Zur Kontrolle der MAPK-Aktivität wurde das allgemeine MAPK-Substrat MBP (*myelin basic protein*) eingesetzt.

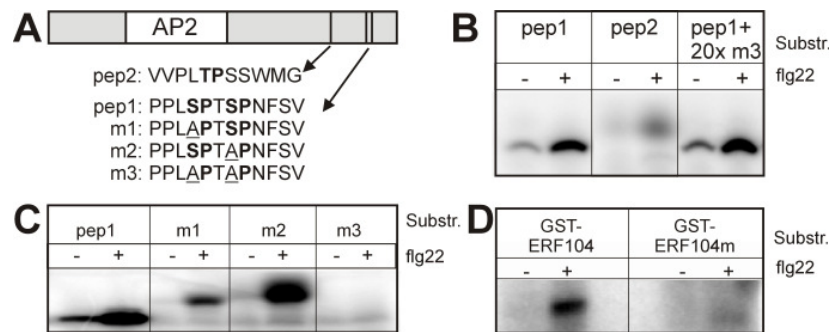
Weiterhin konnte AtMPK6, immuno-präzipitiert aus flg22-behandeltem Zellkulturmaterial, rekombinantes GST-AtERF104-Protein in einem Immunkomplex-Kinase-Experiment phosphorylieren. Die anderen flg22-aktivierten MAPKen, AtMPK3 bzw. AtMPK4 konnten das jedoch nicht (Abb. 3.12 D). Das bedeutet AtERF104 ist ein spezifisches Substrat von AtMPK6 nach Stimulierung mit flg22.

Um die Phosphorylierungsstelle(n) näher zu charakterisieren, wurden zwei synthetische AtERF104-Peptide als AtMPK6-Substrate getestet. Diese Peptide umspannten die Aminosäuren 202-212 (pep2) bzw. 226-237 (pep1) und enthielten eine bzw. zwei mögliche MAPK-Phosphorylierungsstellen (Gustin *et al.*, 1998) (Abb. 3.13 A). Im Immunkomplex-Kinase-Experiment konnte gezeigt werden, daß AtMPK6 pep1 stark, pep2 jedoch nur sehr schwach phosphoryliert (Abb. 3.13 B).

Tauscht man das erste Serin (S<sub>229</sub>) des konservierten (S/T)P-Motivs von pep1 gegen Alanin aus (entspricht Peptid m1), dann kann man erkennen, daß dieses Motiv die hauptsächliche Phosphorylierungsstelle darstellt. Das zweite Motiv, um Serin (S<sub>232</sub>), scheint hingegen nur in wesentlich geringerem Maße phosphoryliert zu werden (entspricht Peptid m2). Wurden beide Serine gegen Alanin ausgetauscht, dann wurde das resultierende m3-Peptid nicht mehr phosphoryliert (Abb. 3.13 C).

Wurden beide Serine, S<sub>229</sub> und S<sub>232</sub>, im Vollängenprotein gegen Alanin getauscht, so konnte dieses rekombinante GST-AtERF104m nicht durch MPK6 im Immunkomplex-

Kinase-Experiment phosphoryliert werden (Abb. 3.13 D). Beide in pep1 vorhandenen SP-Motive scheinen also *At*MPK6-Phosphorylierungsstellen darzustellen, die hauptsächliche Phosphorylierungsstelle ist dabei jedoch vermutlich das erste SP-Motiv in pep1.



**Abb. 3.13 *At*ERF104-Phosphorylierungsstellen:** **A)** zeigt eine schematische Darstellung von *At*ERF104 mit seinen drei möglichen Phosphorylierungsstellen (schwarze Striche) inklusive der analysierten Peptide. **B)** Pep1 korrespondierend zu den zwei C-terminalen Phosphorylierungsstellen wird im Immunkomplex-Kinase-Experiment deutlich durch *At*MPK6 phosphoryliert. Pep2 hingegen nur schwach. **C)** Um die Phosphorylierungsstellen in pep1 unterscheiden zu können, wurden zwei Peptide (m1 und m2) synthetisiert, welche jeweils eine funktionelle und eine mutierte Phosphorylierungsstelle enthielten. Beide Peptide wurden von *At*MPK6 phosphoryliert. Ein Peptid in dem alle Phosphorylierungsstellen mutiert waren (m3), wurde nicht mehr von *At*MPK6 phosphoryliert. **D)** Wurde das Vollängenprotein in den zu pep1 korrespondierenden Phosphorylierungsstellen mutiert (*At*ERF104m) so erfolgte keine Phosphorylierung durch *At*MPK6 im Immunkomplex-Kinase-Experiment.

## 3.6 Funktionelle Charakterisierung von *At*ERF104

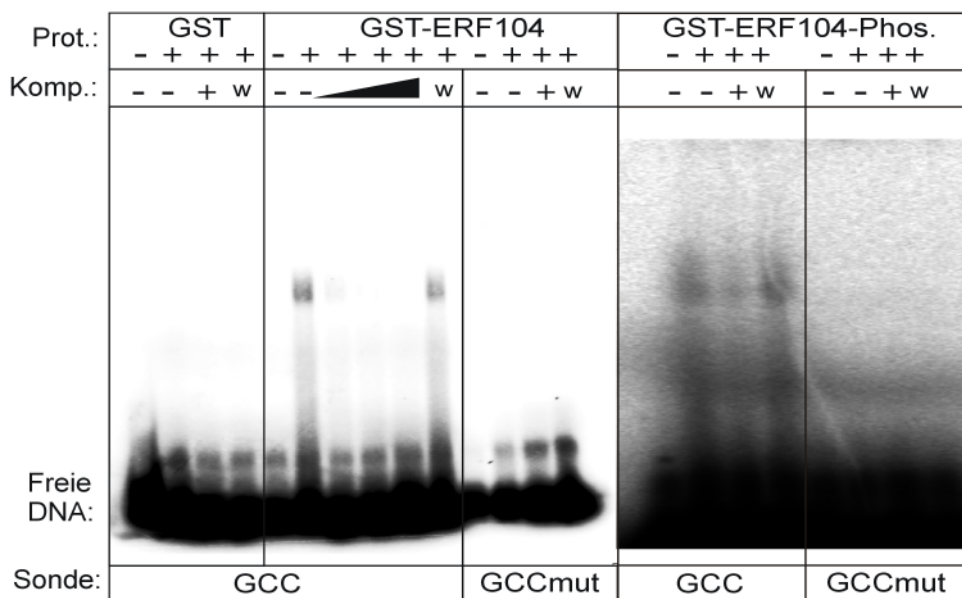
### 3.6.1 *At*ERF104 kann an ein synthetisches GCC-Element binden

Da *At*ERF104 ein Mitglied der ERF-Transkriptionsfaktor-Familie darstellt und wie in Abbildung 3.13. A schematisch dargestellt eine AP2-Domäne zwischen Aminosäure 87-145 enthält, sollte überprüft werden, ob dieses Protein Transkriptionsfaktor-Aktivität aufwies. Daher wurde zuerst getestet, ob *At*ERF104 an die für ERF-Transkriptionsfaktoren bekannten Promotorelemente wie die GCC-Box bzw. das DRE-Element binden konnte. Auch andere Promotorelemente, die in streßinduzierte Genen gefunden werden können, wie z.B. die G-Box, die S-Box und das WRKY-Element, sollten überprüft werden. Weiterhin erschien die Analyse des jasmonatresponsiven JERE-Elementes interessant.

Rekombinantes GST-*At*ERF104 konnte dabei in EMSA-Analysen eine GCC-Element-enthaltende Sonde binden (Abb. 3.14). Die Bindespezifität wurde überprüft indem getestet wurde, ob sich der Protein-DNA-Komplex aus GST-*At*ERF104 und der GCC-Element-enthaltenden Sonde mit einer unspezifischen Sonde (hier WRKY-Element) kompetieren ließ. Das war nicht der Fall. Nur eine, nicht radioaktiv markierte, GCC-Element-enthaltende Sonde konnte die Menge an radioaktiv markiertem *At*ERF104-DNA-Komplex reduzieren. Weiterhin konnte GST-*At*ERF104 nicht an ein mutiertes GCC-Element binden, was ebenfalls für die Spezifität der Interaktion mit dem GCC-Element spricht.

GST-*At*ERF104 band in weiteren EMSA-Analysen nicht an S-Box-, DRE-Element-, G-Box-, JERE- bzw. das WRKY-Motiv-enthaltende Sonden (Daten nicht gezeigt). Dabei differiert die S-Box nur um eine Nukleotid vom GCC-Element, was auf die hohe Spezifität der Interaktion von *At*ERF104 mit dem GCC-Element hindeutet.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten GST-*At*ERF104, durch immungefällte aktive *At*MPK6, keinen Einfluß auf die Binfähigkeit der GCC-Sonde hatte (Abb. 3.14).

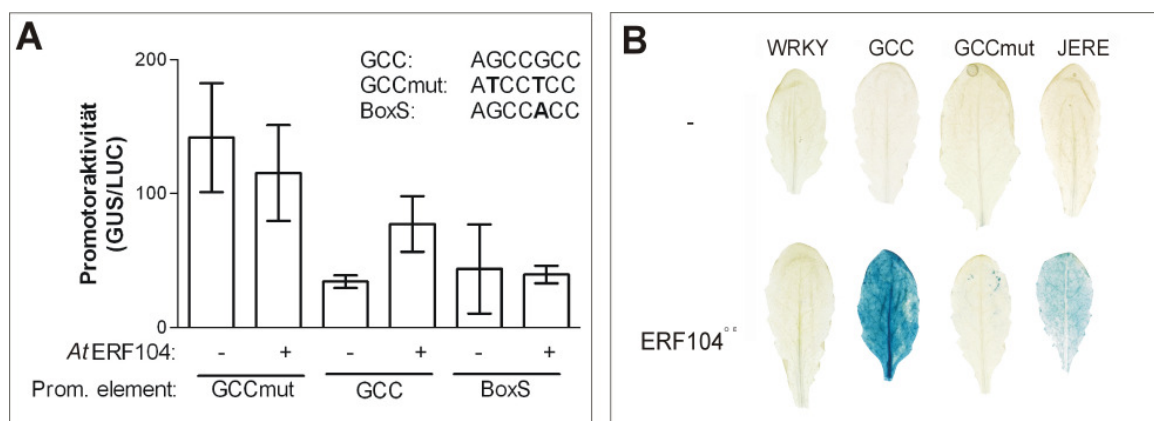


**Abb. 3.14 *At*ERF104 bindet in EMSA-Analysen (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) das GCC-Element:** Die Abbildung zeigt, daß GST-*At*ERF104 an das GCC-Element, nicht jedoch an eine mutierte Form desselben (GCCmut) binden kann. Der erhaltene DNA-Protein-Komplex kann durch einen Überschuß unmarkierter GCC-haltiger DNA aufgelöst werden (+ (80 facher Überschuß) bzw. Dreieck für steigende Menge unmarkierten Peptides (80facher, 160facher, 300facher Überschuß)). Die Interaktion wird nicht durch das unspezifische WRKY-Element (w) kompetiert. Wurde GST-*At*ERF104 in einem Immunkomplex-Kinase-Experiment durch MPK6 phosphoryliert (GST-*At*ERF104-Phos.), dann konnte keine Veränderung in der Bindung des GCC-Elementes beobachtet werden.

### 3.6.2 *At*ERF104 wirkt als Transkriptionsfaktor und kann Promotoren aktivieren, welche das GCC-Element enthalten

Wurde der *CaMV*-35S-Minimalpromotor durch die oben erwähnten Promotorelemente erweitert (Rushton *et al.*, 1996), konnte die Aktivierbarkeit dieser Elemente über die Expression eines fusionierten GUS-Reportergens verfolgt werden. Hierfür wurden Promotor-GUS-Konstrukte des GCC-Elementes, des mutierten GCC-Elementes und der S-Box mit *At*ERF104-HA koexprimiert. Bei unterschiedlicher basaler GUS-Expression konnte nur für den GCC-enthaltenden Promotor eine *At*ERF104-abhängige Erhöhung der GUS-Expression beobachtet werden (Abb. 3.15 A).

Dies war konsistent mit der Analyse verschiedener transgener Linien, in denen eine *At*ERF104-induzierte GUS-Expression in Pflanzen, die ein GCC::GUS-Reporterkonstrukt exprimierten, beobachtet werden konnte. Interessanterweise konnte auch eine schwache GUS-Expression in transgenen Pflanzen, die ein JERE::GUS-Reporterkonstrukt exprimierten, nachgewiesen werden (Abb. 3.15 B). Dies ist aber sehr wahrscheinlich ein sekundärer Effekt, da *At*ERF104 im EMSA nicht an das JERE Element binden konnte.



**Abb. 3.15 Transkriptionsfaktoraktivität von *At*ERF104:** **A)** Die Transiente Expression von *At*ERF104-HA gemeinsam mit einem GUS-Reporterkonstrukt unter der Kontrolle synthetischer Promotoren, welche BoxS bzw. GCC/GCCmut enthalten, führt zur Aktivierung des fusionierten GUS-Reporters in den GCC-haltigen Konstrukten. **B)** Eine *At*ERF104-Strep-Überexpression führt zur Aktivierung des GUS-Reporters unter Kontrolle eines GCC- bzw. eines JERE-haltigen Promotors in transgenen Linien. Nach Koexpression von *At*ERF104-Strep und dem GUS-Reporter unter Kontrolle eines WRKY- bzw. GCCmut-haltigen Promotors, erfolgt keine GUS-Expression.

### 3.6.3 Einfluß von Phosphorylierungen auf die *At*ERF104-Transkriptionsfaktoraktivität und -Proteinstabilität

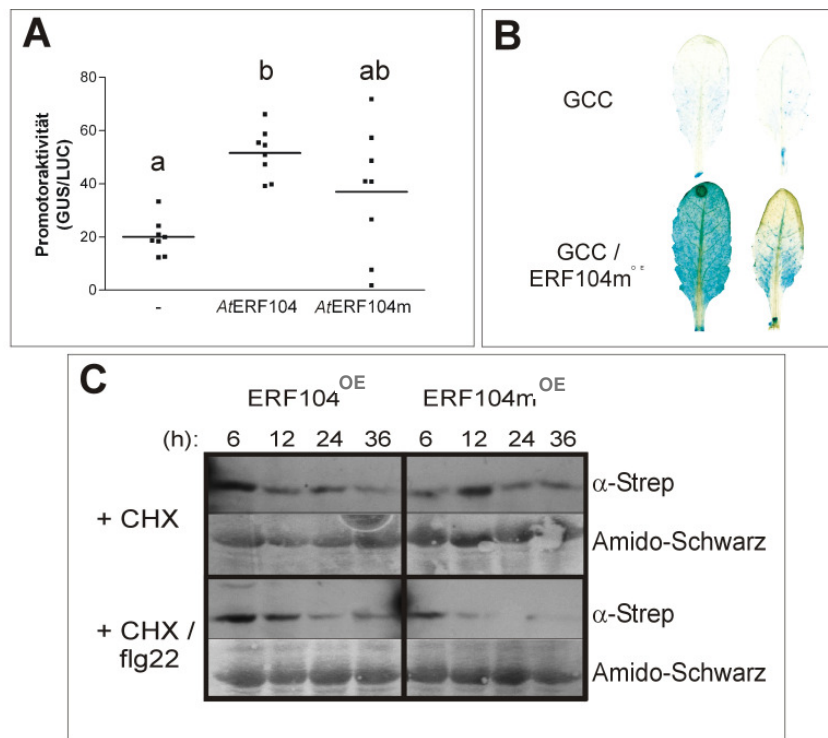
Wurde, das an beiden *pep1*-korrespondierenden MAPK-Phosphorylierungsstellen mutierte, *At*ERF104m-Vollängenprotein in Protoplasten mit dem GCC::*GUS*-Reporterkonstrukt koexprimiert, waren die Einzelmeßwerte für *GUS*-Expression sehr inkonsistent. Der Mittelwert unterschied sich dabei weder signifikant von dem bei der Koexpression von *At*ERF104-HA und dem GCC::*GUS*-Kostrukt, noch von der mittleren *GUS*-Expression, wenn nur GCC::*GUS* in Protoplasten aus Col-0-Blattmaterial exprimiert wurde (Abb. 3.16 A).

Transgene Linien, welche *At*ERF104m unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors überexprimierten, zeigten bei Vorhandensein des *GUS*-Reporterkonstruktes unter Kontrolle eines GCC-haltigen synthetischen Promotors eine Blaufärbung (Abb. 3.16 B). Auch diese variierte relativ stark von Blatt zu Blatt. Dies deutet darauf hin, daß die Transkriptionsfaktor-Aktivität von *At*ERF104 durch eine Mutation in den Phosphorylierungsstellen nicht beeinflußt wird.

Aus der Literatur ist bekannt, daß Phosphorylierungen einen Einfluß auf die Proteinstabilität haben können. Als Beispiel seien hier die Stabilisierung von *At*ACS6 durch *At*MPK6-abhängige Phosphorylierung (Joo *et al.*, 2008) bzw. die Stabilisierung bzw. Destabilisierung von *At*EIN3, abhängig von der Phosphorylierungsstelle, genannt (Yoo *et al.*, 2008). In der zuletzt genannten Publikation wurde gezeigt, daß die *At*MKK9-*At*MPK6-abhängige Phosphorylierung von *At*EIN3 einen positiven Effekt auf die *At*EIN3-Stabilität hat, während eine *At*CTR1-abhängige Phosphorylierung an einer anderen Phosphorylierungsstelle zur Destabilisierung von *At*EIN3 führt. Deshalb sollte auch für *At*ERF104 überprüft werden, ob Phosphorylierung einen Einfluß auf dessen Protein-Stabilität hat. Dazu wurden Linien generiert die entweder *At*ERF104 oder *At*ERF104m unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors überexprimierten (*At*ERF104<sup>OE</sup> bzw. *At*ERF104m<sup>OE</sup>, s. Abschnitt 3.8.). Dann wurden *At*ERF104<sup>OE</sup>- und *At*ERF104m<sup>OE</sup>-Blätter mit Cycloheximid zur Inhibierung der Protein-Neusynthese behandelt, um die Proteinstabilität von *At*ERF104 bzw. *At*ERF104m über einen bestimmten Zeitraum in beiden Linien vergleichen zu können. Dabei konnte festgestellt werden, daß *At*ERF104 nach Behandlung mit Cycloheximid weniger schnell abgebaut wurde als das mutierte *At*ERF104m, besonders wenn gleichzeitig mit *flg22* behandelt wurde (Abb. 3.16 C).



Dabei führte die flg22-Behandlung vermutlich zur Phosphorylierung von *AtERF104*, während *AtERF104m*, die Phosphorylierungsstellen-Mutante, nicht phosphoryliert werden konnte. Diese Erkenntnisse lassen den indirekten Schluß zu, daß die Phosphorylierung von *AtERF104* einen positiven Einfluß auf dessen Stabilität haben könnte.



**Abb. 3.16 Transkriptionsfaktoraktivität und Proteinstabilität von *AtERF104* und *AtERF104m*:** **A)** Wurde *AtERF104m*-HA zusammen mit dem GUS-Reporterkonstrukt unter Kontrolle des GCC-haltigen Promotors exprimiert, dann unterschied sich die resultierende GUS-Expression weder von der unbehandelten Kontrolle noch von der GUS-Expression nach *AtERF104*-HA-Überexpression. Buchstaben entsprechen Signifikanzklassen entsprechend t-Test. **B)** Stabile Linien, welche *AtERF104m*-Strep zusammen mit dem GUS-Reporter unter Kontrolle des GCC-haltigen Promotors exprimieren, zeigten eine deutliche GUS-Expression. **C)** α-Strep-Western-Blot-Analyse zeigt, daß *AtERF104m*-Strep nach Behandlung mit Cycloheximid (CHX) schneller abgebaut wurde als *AtERF104*-Strep. Dieser Effekt war besonders ausgeprägt bei gleichzeitiger flg22-Behandlung der Blätter.

## 3.7 Der Einfluß von AtERF104 auf die Expression von Abwehrgenen

### 3.7.1 Mikroarray-Analysen

Da *AtERF104* Transkriptionsfaktor-Aktivität aufwies, wurden Mikroarray-Analysen (in Kooperation mit Tino Unthan, IPB Halle, Deutschland) durchgeführt um mögliche Zielgene von *AtERF104* zu identifizieren. Hierbei wurde bei einem Vergleich der *AtERF104*-Überexpressionspflanzen (*AtERF104*<sup>OE</sup>) mit Col-0 festgestellt, daß in *AtERF104*<sup>OE</sup>, vermehrt das Transkript von Genen akkumulierte deren Promotoren GCC-Elemente enthielten. Als Beispiel für solche Gene sind *AtPDF1.2b* und *AtPDF1.2* zu nennen, deren Transkriptmengen in *AtERF104*<sup>OE</sup> im Vergleich zu Col-0 ca. 1100 bzw. 900fach erhöht waren (Tabelle 3.1).

**Tabelle 3.1 zeigt die zehn am stärksten in *AtERF104*<sup>OE</sup> (*ERF104*<sup>OE</sup>) exprimierten Gene** im Vergleich zu Col-0, entsprechend Mikroarray-Analysen. Die p-Werte sind einer einfaktoriellem Varianzanalyse entnommen.

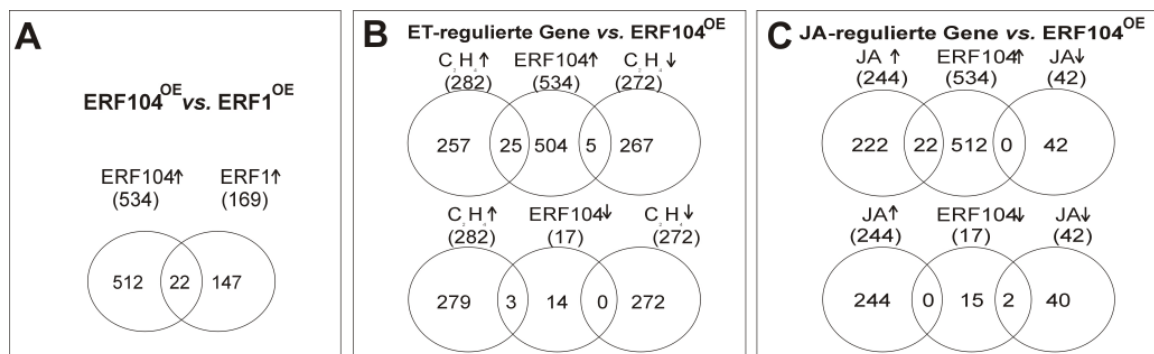
AGI-Code	xfache Erhöhung ERF104 <sup>OE</sup> /Col-0	p-Wert	TAIR-Beschreibung
At2g26020	1092	0.0084	PDF1.2b
At5g44420	869	0.0012	PDF1.2
At5g61600	269	0.0071	ERF104
At5g57220	111	0.0138	CYP81F2
At5g61160	43.3	0.0076	AACT1
At3g23550	41.2	0.0004	MATE efflux family protein
At1g18570	35.9	0.0004	MYB51
At2g26560	26.2	0.0001	PLP2
At3g49620	26.0	0.0022	DIN11
At4g21680	25.1	0.0078	POT family protein

Interessanterweise konnten bei den 344 in *AtERF104*<sup>OE</sup> differentiell exprimierten Genen auch Überlappungen mit bereits in den Datenbanken verfügbaren Mikroarray-Analysen gefunden werden, in denen die Überexpression des ersten EIN3-abhängig exprimierten ERFs, *AtERF1*, analysiert wurde. Dabei akkumulierten z.B. die Transkripte von 22 Genen (Abb. 3.17 A) sowohl in *AtERF1*<sup>OE</sup> als auch in *AtERF104*<sup>OE</sup>. Beispielhaft für solche Gene seien *AtRBOHD*, *AtMYB51*, *AtPR5* und eine putative Chitinase (*At2g43590*) genannt. Auch nach Behandlung mit Ethylen war die Expression von 25 Genen erhöht, welche auch in *AtERF104*<sup>OE</sup> verstärkt exprimiert wurden. Dazu zählen z.B. *AtPLP2*, eine putative Chitinase (*At2g43590*) und die *AtMPK6-MAPKK*, *AtMKK4*. Für fünf Gene

akkumulierten die Transkripte in *AtERF104*<sup>OE</sup>, während ihre Expression nach Ethylen-Behandlung reprimiert war. Dazu zählen z.B. *AtPLP6* und *AtEXPA5*.

Die brassinolidaktivierten Gene *AtBEE1* und *AtBEE3*, sowie ein *ERF*-Protein (*At5g25190*) wurden nach Ethylen-Behandlung verstärkt exprimiert, in *AtERF104*<sup>OE</sup> war die Expression jedoch reprimiert (Abb. 3.17 B).

Zusätzlich besteht eine Überlappung der Jasmonat-regulierten Gene mit den in *AtERF104* transkriptionell regulierten Genen. Zweiundzwanzig Gene zeigten sowohl in *AtERF104* als auch nach Jasmonat-Behandlung eine verstärkte Genexpression, darunter *AtMYC2*. Zwei Gene *AtBEE3* und *At1g67910* (kodiert für ein unbekanntes Protein), waren in beiden Fällen in der Genexpression reprimiert (Abb. 3.17 C). Das heißt es gibt nur eine geringe Überlappung in der Genexpression nach Überexpression von *AtERF104* im Vergleich mit der Überexpression von *AtERF1* und Ethylen- bzw. Jasmonat-Behandlung. *AtERF104* scheint daher spezifische Signalwege zu initiieren, die nur partiell mit den Signalwegen nach Ethylen- oder Jasmonat-Behandlung überlappen.



**Abb. 3.17 Vergleich von Mikroarray-Analysen** von *AtERF104*<sup>OE</sup> und **A)** *AtERF1*<sup>OE</sup>, **B)** nach Ethylen-Behandlung und **C)** nach Jasmonat-Behandlung.

Nach *flg22*-Behandlung wurden 330 in *AtERF104*<sup>OE</sup> differentiell exprimierte Gene gefunden. Zu den in *AtERF104*<sup>OE</sup> nach *flg22*-Behandlung verstärkt exprimierten Genen zählten die Transkripte von 37 in Signaltransduktionsprozessen notwendigen Proteinen, wie einem *AtPR5*-ähnlichem Protein und leucinreiche-Transmembran-Rezeptoren. Weiterhin wurden die Gene von verschiedenen Chitinasen, TIR-NBS-LRR-Proteinen und *AtMLO6*, die bei Streßantworten eine Rolle spielen, nur in *flg22*-behandelten *AtERF104*<sup>OE</sup> verstärkt exprimiert. Auch zwölf Gene, die für Proteine kodieren, welche an posttranslationaler Proteinmodifikation beteiligt sind, konnten als differentiell reguliert identifiziert werden. Darunter waren eine Protein-Phosphatase, *AtPP2C5*, welche eine putative MAPK-Bindestelle besitzt (Schweighofer *et al.*, 2004) (Tabelle 3.2) und

*AtMAPKKK 15*, deren Transkript nach Salz- und Trockenstreß akkumuliert (Menges *et al.*, 2008). Weiterhin wurden *AtPROPEP2* und *AtPROPEP3* verstärkt in *flg22*-behandelten *AtERF104<sup>OE</sup>* transkribiert (Tabelle 3.2). Diese Proteine sind Vorläufer von Peptiden, die die basale Resistenz verstärken (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker und Ryan, 2007). Auch eine ACC-Synthase, *AtACS7*, wurde verstärkt exprimiert und könnte möglicherweise eine Rolle in der Verstärkung der Ethylenbiosynthese spielen.

Zusammengenommen deuten die Mikroarray-Analysen mit *flg22*-behandelten *AtERF104<sup>OE</sup>* darauf hin, daß die Überexpression von *AtERF104* zu einer Steigerung der Pathogenresistenz führen könnte.

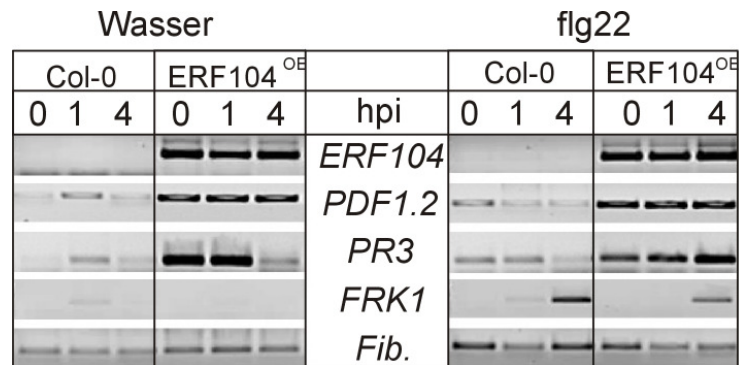
**Tabelle 3.2 Zeigt die am stärksten in *AtERF104<sup>OE</sup>* jedoch nicht in Col-0 nach *flg22*-Behandlung regulierten Gene.** Die p-Werte wurden mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse berechnet.

AGI-Code	Col-0+flg/ Col-0		AtERF104 <sup>OE</sup> +flg/ AtERF104 <sup>OE</sup>		TAIR-Beschreibung
	xfach	p-Wert	xfach	p-Wert	
AT2G29100	1,7	0,63	69,48	0,01	ATGLR2.9 (Arabidopsis thaliana glutamate receptor 2.9)
AT5G64890	7,6	0,06	42,72	<0,01	PROPEP2 (Elicitor peptide 2 precursor)
AT5G64905	7,9	0,14	34,28	0,01	PROPEP3 (Elicitor peptide 3 precursor)
AT4G20000	9,5	0,20	23,38	0,04	VQ motif-containing protein
AT2G40180	3,1	0,14	21,3	0,02	ATHPP2C5; protein serine/threonine phosphatase
AT4G31970	3,9	0,20	17,48	0,02	CYP82C2 (cytochrome P450, family 82, subfamily C, polypeptide 2)
AT5G59070	2,9	0,25	15,53	0,04	glycosyl transferase family 1 protein
AT4G18430	3,8	0,46	15,09	<0,01	AtRABA1e (Arabidopsis Rab GTPase homolog A1e)
AT5G25260;AT5G25250	7,7	0,07	14,86	<0,01	unknown protein
AT4G26200	3,2	0,52	14,06	<0,01	ACS7 (1-Amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase 7)

### 3.7.2 Analyse von Markergenen mittels semiquantitativer RT-PCR

Einige der im Mikroarray gefundenen Gene wurden mit semi-quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 3.18). Dabei konnte eine starke, *flg22*-unabhängige Akkumulation von *AtPDF1.2*-Transkript in *AtERF104<sup>OE</sup>* verifiziert werden. Für dieses Gen ist eine ethylenabhängige Steigerung der Expression bekannt (Thomma *et al.*, 1999). Auch das Transkript von *AtPR3* akkumulierte in *AtERF104<sup>OE</sup>* *flg22*-unabhängig. Für *AtPR5* sowie das jasmonatabhängig regulierte *AtMYC2* wurden in Realtime-Messungen (Daten nicht gezeigt) keine Veränderungen im Expressionsmuster festgestellt, obwohl die Expression dieser Gene in den Mikroarray-Analysen von *AtERF104<sup>OE</sup>* verändert war. Weiterhin

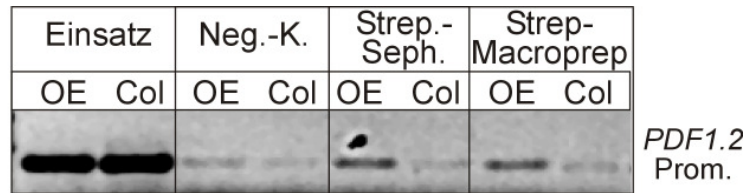
wurde verifiziert, daß *AtFRK1*, ein flg22-abhängig reguliertes Gen, in Col-0 und *AtERF104<sup>OE</sup>* keine Unterschiede in der Expression nach flg22-Behandlung aufwies. Das konstitutiv exprimierte Gen *AtFIBRILLARIN* diente als Kontrolle.



**Abb. 3.18 Bestätigung einiger Mikroarray-Ergebnisse:** Die semiquantitative RT-PCR zeigt, daß *AtERF104* (*ERF104*) und *AtPDF1.2* (*PDF1.2*) in *AtERF104<sup>OE</sup>* starke Transkriptakkumulation aufweisen. *AtPR3* (*PR3*)-Transkript akkumuliert 4h nach flg22-Behandlung in *AtERF104<sup>OE</sup>*. Die flg22-abhängig induzierte Expression von *AtFRK1* (*FRK1*) ist in *AtERF104<sup>OE</sup>* im Vergleich zu Col-0 unverändert. *AtFIBRILLARIN* (*Fib.*) diente als konstitutiv exprimiertes Kontrollgen.

### 3.7.3 *AtPDF1.2* – ein direktes *AtERF104* Zielgen

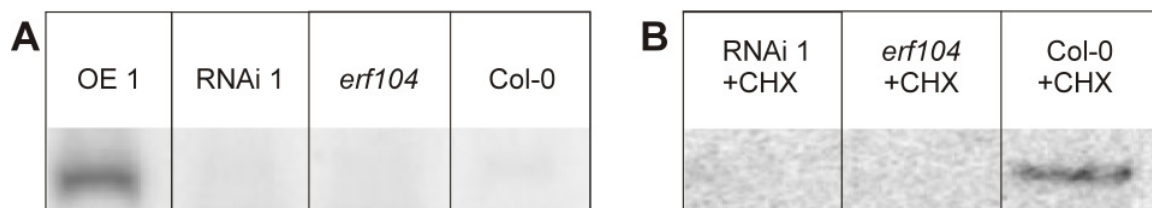
Wie bereits in Abschnitt 3.7.1 erwähnt, akkumulieren in *AtERF104<sup>OE</sup>* die Transkripte von Genen, deren Promotoren GCC-Elemente besitzen, darunter *AtPDF1.2*. In Abschnitt 3.7.2 konnte gezeigt werden, daß auch das Transkript von *AtPR3* in *AtERF104<sup>OE</sup>* akkumuliert. Um zu analysieren, ob eines dieser Gene möglicherweise ein direktes Zielgen von *AtERF104* darstellt, wurden Chromatin-Immunpräzipitations (ChIP)-Analysen durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, daß *AtERF104*-Strep an den Promotor von *AtPDF1.2* gebunden vorlag (Abb. 3.19). Dies konnte für *AtPR3* nicht gezeigt werden. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die Bindung des *AtPDF1.2*-Promotors durch *AtERF104* relativ spezifisch ist und daher *AtPDF1.2* ein direktes Zielgen von *AtERF104* sein könnte, während *AtPR3* möglicherweise nur indirekt durch *AtERF104* gesteuert wird.



**Abb. 3.19 *AtPDF1.2* ist ein direktes *AtERF104*-Zielgen:** Eine Chromatin-Immunpräzipitations-Analyse zeigt die Bindung von *AtERF104*-Strep an den *AtPDF1.2*-Promotor (*PDF1.2* Prom.). *AtPDF1.2*-Promotor-Sequenzen konnten nur nach Immunfällung von *AtERF104*-Strep mit  $\alpha$ -Strep-Sepharose (Strep.-Seph.) bzw.  $\alpha$ -Strep-Macroprep aus *AtERF104*<sup>OE</sup>(OE) amplifiziert werden. Es erfolgte keine unspezifische Anreicherung von *AtPDF1.2*-Promotor-Fragmenten in Col-0-Extrakten bzw. nach Immun-Fällung mit ProteinG-Sepharose aus *AtERF104*<sup>OE</sup>-Extrakten (Neg.-K., Negativkontrolle).

### 3.8 *AtERF104* Überexpressions- / Knockout- und RNAi-Linien – Eine phänotypische Analyse

Zusätzlich zu den bereits gezeigten Überexpressionslinien (s. Abschnitt 3.6.2 bis 3.7.3) wurde auch eine *AtERF104*-RNAi-Linie generiert und eine T-DNA-Insertionslinie (*erf104*) von der Salk-T-DNA-Insertions-Sammlung (N557720) verwendet. *AtERF104*-Transkript konnte in unbehandelten Blättern nur in *AtERF104*<sup>OE</sup> nicht aber in Col-0, den RNAi- oder den *Knockout*-Linien mittels Northern-Blot-Analyse detektiert werden (Abb. 3.20 A). Erst nach Behandlung mit Cycloheximid konnte in Col-0 *AtERF104*-Transkript nachgewiesen werden, nicht jedoch in *erf104* und der *AtERF104*-RNAi-Linie (Abb. 3.20 B).



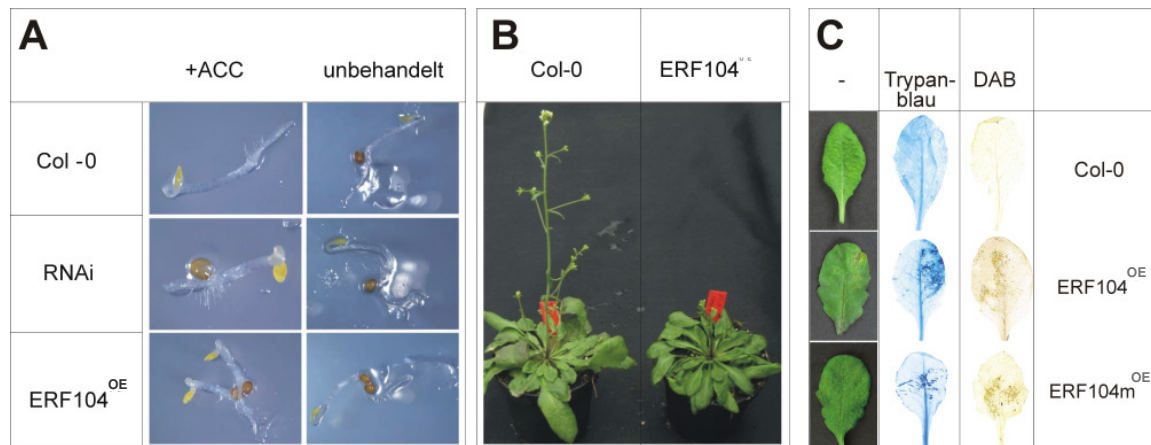
**Abb. 3.20 Transkriptakkumulation von *AtERF104* in transgenen Linien:** Mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse wurde *AtERF104*-Transkript nachgewiesen. **A)** In unbehandelten Blättern kann das *AtERF104*-Transkript nur in *AtERF104*<sup>OE</sup> (OE1) nicht jedoch in der *AtERF104*-RNAi-Linie (RNAi 1), *erf104* oder Col-0 nachgewiesen werden. **B)** Nach Behandlung mit Cycloheximid (CHX; 100 $\mu$ M für 3 h) ist das *AtERF104*-Transkript in Col-0 nicht aber in der *AtERF104*-RNAi-Linie oder in *erf104* nachweisbar.

### 3.8.1 Wachstum und Entwicklung

Knockout und RNAi-Linien zeigten makroskopisch keinen sichtbaren Phänotyp. In den RNAi-Pflanzen ließen sich keine Veränderungen in der *triple response* beobachten (Abb. 3.21 A). Dieser ethylenabhängige Phänotyp wurde als Marker für eine veränderte endogene ethylenabhängige Signaltransduktion verwendet. Die *triple response* umfaßt folgende phänotypische Merkmale, die nach Ethylenexposition in Col-0-Keimlingen beobachtet werden können. Hypokotyl und Wurzel sind verkürzt, das Hypokotyl verdickt und der Hypokotylhaken verstärkt ausgeprägt. Die meisten Mutanten in der Ethylensignalgebung wurden identifiziert, weil sie Veränderungen in dieser Reaktion aufwiesen (Guzman und Ecker, 1990).

Auch in den Überexpressionslinien konnte keine Beeinflussung der *triple response* beobachtet werden (Abb. 3.21 A). Dies deutet darauf hin, daß *AtERF104* keinen Einfluß auf diese ethylenabhängige Reaktion hat, die *triple response* also über einen alternativen Signalweg gesteuert werden könnte. Die *AtERF104*-Überexpressionspflanzen zeigten bei 50% der Linien eine leichte Inhibierung des Wachstum und eine etwas verzögerte Initiation der Blühphase (Abb. 3.21 B). Weiterhin zeigten alle Überexpressions-Linien nekrotische Punkte, welche sich mit DAB bzw. Trypan-Blau, indikativ für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bzw. totes Blattgewebe, anfärben ließen (Abb. 3.21 C).

Auch die Linien, welche die Phosphorylierungsstellen-Mutante *AtERF104m* überexprimierten, zeigten nekrotische Flecke, diese traten jedoch weniger häufig auf. Dies könnte sich eventuell auf die reduzierte Stabilität von *AtERF104m* zurückführen lassen (s. Abschnitt 3.6.3).



**Abb. 3.21 Phänotypische Analyse von *AtERF104*<sup>OE</sup>- bzw. *AtERF104*-RNAi-Pflanzen:** **A)** Weder *AtERF104*-RNAi (RNAi) noch *AtERF104*<sup>OE</sup> (*ERF104*<sup>OE</sup>) zeigten eine Veränderung bezüglich der *triple response*, weder vor noch nach ACC-Behandlung (1µM). **B)** Zwei von vier *AtERF104*<sup>OE</sup>-Linien zeigten ein etwas verzögertes Wachstum und ein späteres Einsetzen der Blütenbildung im Vergleich zu Col-0, nachdem sie vier Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen wurden. **C)** Ältere Blätter von *AtERF104*<sup>OE</sup> und auch von *AtERF104m*<sup>OE</sup> (*ERF104m*<sup>OE</sup>) zeigten nekrotische Punkte, welche sich mit Trypan-Blau und Diaminobenzidin (DAB) anfärben ließen. Dabei war die Häufigkeit der Punkte und der Blätter, die Punkte aufwiesen, in *AtERF104m*<sup>OE</sup> im Vergleich zu *AtERF104*<sup>OE</sup> stark reduziert.

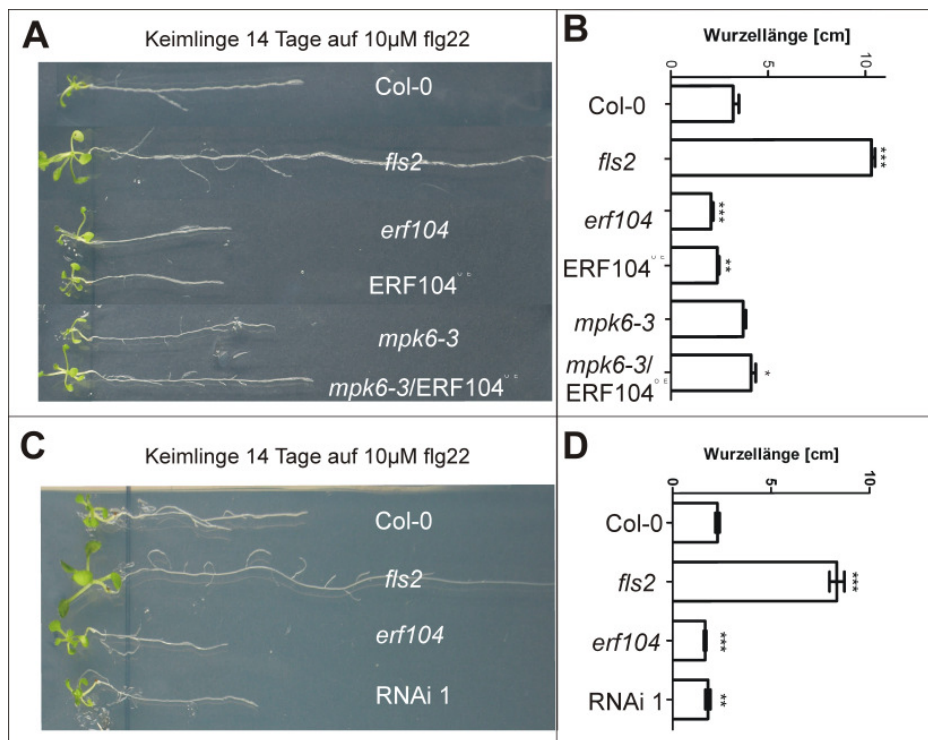
### 3.8.2 flg22-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums

Untersuchungen zur flg22-induzierten Wurzelwachstums-Inhibierung wurden durchgeführt, um eine Beteiligung von *AtERF104* in der flg22-Signaltransduktion zu überprüfen. Als Kontrolle für diese Analysen diente die *fls2*-Mutante. Diese Mutante des flg22-Rezeptors zeigt nur eine minimale Inhibierung des Wurzelwachstums auf flg22-enthaltenden Agarplatten von ca. 10% (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Sowohl die *AtERF104*-Überexpressions-Linien, als auch die Knockout-Linie *erf104* zeigten eine verstärkte Inhibierung des Wurzelwachstums auf flg22-enthaltenden Agarplatten im Vergleich zu Col-0 (Abb. 3.22 A+B). In *mpk6-3*-Keimlingen konnte keine Veränderung der Inhibierung des Wurzelwachstums im Vergleich mit Col-0 beobachtet werden. Dies war auch der Fall für Linien in denen *AtERF104* im *mpk6-3*-Hintergrund überexprimiert wurde (Abb. 3.22 A+B).

In einem weiteren Experiment wurde festgestellt, daß die *AtERF104*-RNAi-Linie eine mit *erf104* vergleichbare Inhibierung des Wurzelwachstums aufwies (Abb. 3.21 C+D).

Das bedeutet, daß das Fehlen und die Überexpression von *AtERF104* gleichermaßen die Inhibierung des Wurzelwachstums durch flg22 verstärken.





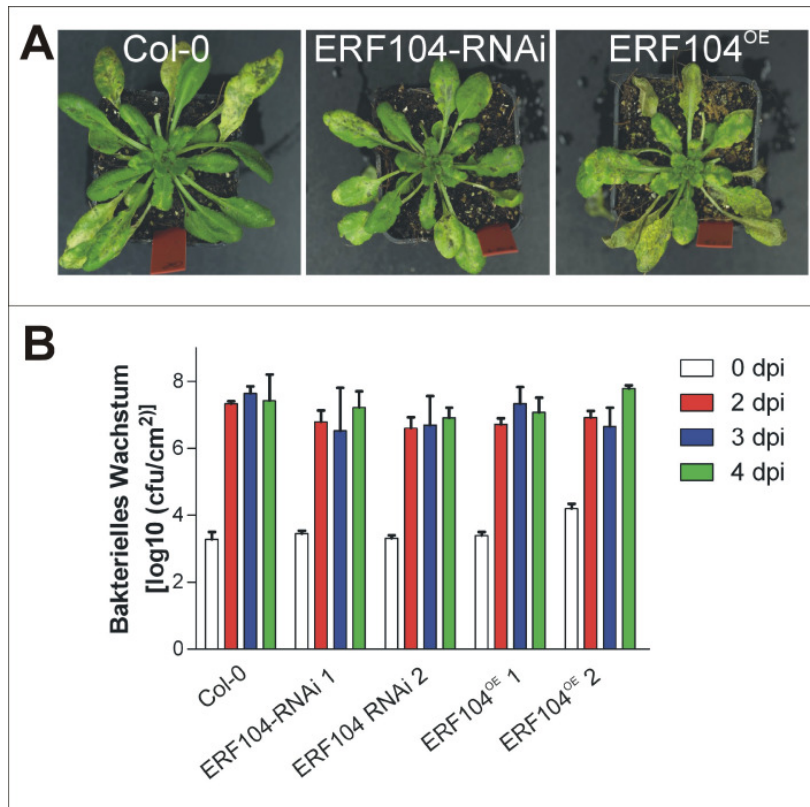
**Abb. 3.22 Flg22-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums: A) und B)** Das Wurzelwachstum von Col-0 ist bei Anzucht auf Agarplatten mit 10µM flg22 im Vergleich zu *fls2* stark reduziert. Auch für *erf104*, *AtERF104<sup>OE</sup>* (ERF104<sup>OE</sup>), *mpk6-3* und *mpk6-3/AtERF104<sup>OE</sup>* ist das Wurzelwachstum im Vergleich zu *fls2* stark reduziert. Die Inhibierung des Wurzelwachstums in *erf104* und *AtERF104<sup>OE</sup>* ist noch stärker als die in Col-0. Die Inhibierung in *mpk6-3* und *mpk6-3/AtERF104<sup>OE</sup>* unterscheidet sich nicht signifikant von der in Col-0. **C) und D)** Die mittlere Wurzellänge einer *AtERF104*-RNAi-Linie (RNAi 1) unterscheidet sich nach Anzucht auf flg22-haltigen Agarplatten, ebenso wie die mittlere Wurzellänge von *erf104*, signifikant von der durchschnittlichen Wurzellänge von Col-0. Die Signifikanzanalyse erfolgte mittels t-Test (\*= $p \leq 0,05$ ; \*\* =  $p \leq 0,01$ ; \*\*\* =  $p \leq 0,001$ ).

### 3.8.3 Pathogenbehandlungen

#### 3.8.3.1 Biotrophes Pathogen: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000

Da *AtERF104* als Interaktor, der durch biotischen Streß aktivierten MAPK *AtMPK6* gefunden wurde, wurde nun getestet, ob das biotrophe Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ein verändertes Wachstum auf *AtERF104<sup>OE</sup>* bzw. *AtERF104*-RNAi-Pflanzen zeigt. Dabei konnte zwar eine deutlich stärkere Ausprägung der Symptome in den

*At*ERF104<sup>OE</sup>-Linien beobachtet werden (Abb. 3.23 A), nicht jedoch eine Veränderung im bakteriellen Wachstum (Abb. 3.23 B). Die beobachteten Symptome umfassen Chlorosen und wäßrige Läsionen. Die RNAi-Pflanzen wiesen keine Veränderungen bei der Symptomausprägung bzw. dem Wachstum der Bakterien auf. Aus der Literatur ist bekannt, daß Ethylen einen Einfluß auf die Symptomausbildung nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* haben kann (Lund *et al.*, 1998). Deshalb wurde untersucht, ob eventuell *At*ERF104<sup>OE</sup> einen erhöhten Ethylengehalt haben könnten. Bei den *laser photoacoustic spectroscopy*-Analysen zeigte sich keine signifikante Veränderung des Ethylengehaltes in unbehandelten *At*ERF104<sup>OE</sup>-Pflanzen (Experiment durchgeführt in Kooperation mit Ivy Widjaja, IPB Halle, Deutschland, Daten nicht gezeigt).



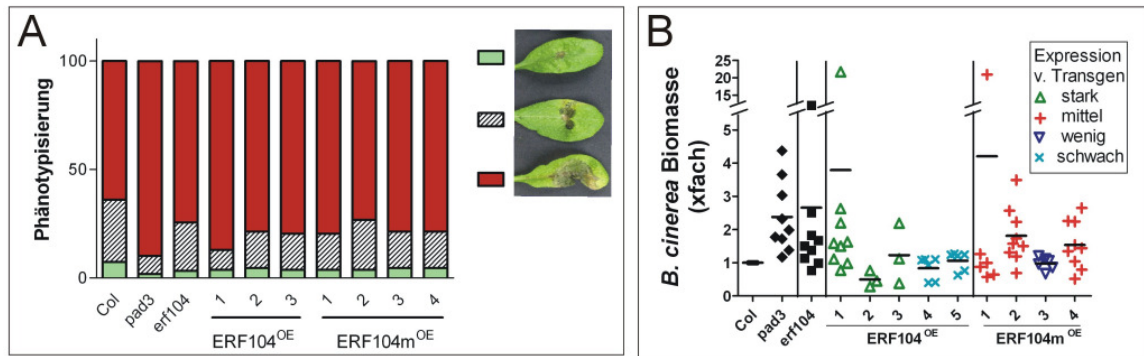
**Abb. 3.23 Der Einfluß von *At*ERF104 auf das Wachstum von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A) *At*ERF104<sup>OE</sup> (*ERF104*<sup>OE</sup>) zeigten 5 Tage nach Sprühen mit  $1 \times 10^8$  cfu/ml *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in 0,05% Silwet L-77, 10mM MgCl<sub>2</sub> deutlicher ausgeprägte Chlorosen und ein gehäufteres Auftreten von wäßrigen Läsionen als Col-0- bzw. *At*ERF104-RNAi-Pflanzen (*ERF104* RNAi 1 bzw. *ERF104* RNAi 2) B) Das bakterielle Wachstum war jedoch in allen untersuchten *At*ERF104-RNAi bzw. *At*ERF104<sup>OE</sup> vergleichbar mit dem Wachstum von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 in Col-0.**

### 3.8.3.2 Nekrotrophes Pathogen: *Botrytis cinerea*

In den Mikroarray-Analysen (s. Abschnitt 3.7.1) konnte gezeigt werden, daß die *AtPDF1.2*-Expression in *AtERF104*<sup>OE</sup> deutlich erhöht ist. Dies war auch nach Überexpression von *AtERF1* beobachtet worden und stand in diesen Analysen in Zusammenhang mit einer erhöhten Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene, u.a. *Botrytis cinerea* (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Daher wurde eine Analyse der Symptomausprägung und der Zunahme der pilzlichen Biomasse vier Tage nach Behandlung der Überexpressions- und *Knockout*-Pflanzen mit *Botrytis cinerea* durchgeführt.

Dabei ergaben sich keine Anzeichen für eine verstärkte Resistenz, sondern im Gegenteil Hinweise darauf, daß *AtERF104*<sup>OE</sup> eine Tendenz zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber *Botrytis* aufwies (Abb. 3.24 A). Die pilzliche Biomasse war in fünf verschiedenen Linien im Vergleich zu Col-0 von 0,5 – 3,8-fach verändert. Meist korrelierte eine Zunahme der pilzlichen Biomasse mit dem Expressionsniveau von *AtERF104*. Eine Ausnahme bildet Line *AtERF104*<sup>OE</sup> 2 (Abb. 3.24 B). Auch für vier verschiedene *AtERF104m*<sup>OE</sup>-Linien wurde eine leichte Tendenz hinsichtlich einer erhöhten Suszeptibilität gegen *Botrytis* beobachtet (Abb.3.24 A). Hier war die pilzliche Biomasse um das 1,0- bis 4,2-fache im Vergleich zu Col-0 erhöht (Abb. 3.24 B). Das bedeutet die Phosphorylierung von *AtERF104* hat keinen Einfluß auf die Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*.

Für *pad3* ist bekannt, daß diese *AtCYP71B15*-Mutante, bei der der letzte Schritt der Camalexin-Biosynthese nicht mehr stattfindet (Schuhegger *et al.*, 2006), eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea* zeigt (Ferrari *et al.*, 2003). Für diese Mutante konnte eine Erhöhung der *Botrytis*-Biomasse auf das 2,4-fache von Col-0 ermittelt werden. Auch in *erf104* (Abb. 3.24 A) und der *AtERF104*-RNAi-Linie (Daten nicht abgebildet) zeigte sich eine leicht erhöhte Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea*. Die Biomasse des Pilzes war dabei in *erf104* im Vergleich zum Wildtyp um das 2,6-fache bzw. in der RNAi-Linie um das 2,2-fache erhöht (Abb. 3.24 B).

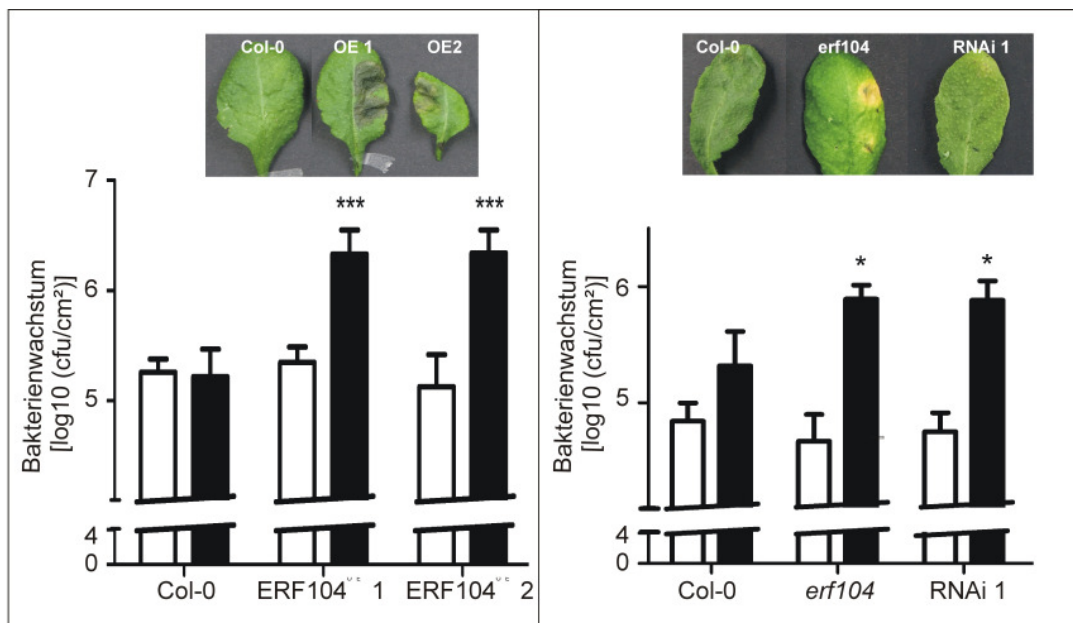


**Abb. 3.24 *Botrytis cinerea*-Wachstum** 4 Tage nach Tropfeninokulation mit  $2 \times 10^3$  Sporen in  $10 \mu\text{l}$ : **A)** Phänotypisch zeigt sich für *erf104* und *AtERF104*<sup>OE</sup> (*ERF104*<sup>OE</sup>) bzw. *AtERF104m*<sup>OE</sup> (*ERF104m*<sup>OE</sup>) eine Tendenz zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea*. Grün entspricht kaum Symptomen, schraffiert Gewebemazeration im Bereich der Inokulationsstelle, rot starker Mazeration der Inokulationsstelle und des umliegenden Gewebes. **B)** Auch die *Botrytis*-Biomasse erscheint in einigen der Überexpressionslinien und *erf104* gegenüber Col-0 erhöht. Die Zunahme der pilzlichen Biomasse korreliert meist mit der Stärke der Expression des Transgens, eine Ausnahme bildet die *AtERF104*<sup>OE</sup>-Linie 2. Die *AtERF104*<sup>OE</sup>-Linien 4 und 5 wurden nicht phänotypisch analysiert.

### 3.8.3.3 Nichtadaptiertes Pathogen: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Da *AtMPK6* im Verlauf der basalen Resistenz aktiviert wird und eventuell ihr Interaktor *AtERF104* eine Rolle in der basalen Resistenz spielen könnte, wurde anschließend getestet, ob das nicht adaptierte Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ein verändertes Wachstum auf *AtERF104*<sup>OE</sup> bzw. *erf104* aufwies. Die *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*-Inokulationsstelle zeigte nach sechs Tagen bei *erf104* und der *AtERF104*-RNAi-Linie einen chlorotischen Phänotyp, während bei Col-0 keine phänotypische Veränderung an der Inokulationsstelle beobachtet werden konnte (Abb. 3.25 B). Weiterhin wiesen mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* infizierte *AtERF104*<sup>OE</sup>-Pflanzen Inokulationsbereiche auf, welche phänotypisch den wäßrigen Läsionen glichen, wie sie nach *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000-Behandlung in Col-0-Pflanzen beobachtet werden konnten (Abb. 3.25 A).

Das bakterielle Wachstum sechs Tage nach Inokulation war in *AtERF104*<sup>OE</sup> im Vergleich zum Wildtyp um eine Zehnerpotenz von 5,6 auf  $6,3 \log_{10}$  (cfu/cm<sup>2</sup>) erhöht (Abb. 3.25 A). In *erf104* und der *AtERF104*-RNAi-Linie zeigte sich nach sechs Tagen eine Erhöhung des bakteriellen Wachstums um eine halbe Zehnerpotenz von 5,3 auf  $5,9 \log_{10}$  (cfu/cm<sup>2</sup>) (Abb. 3.25 B). Dies weist auf einen Einfluß von *AtERF104* in der basalen Resistenz hin.



**Abb.: 3.25** Das Wachstum von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* war, sechs Tage nach Inokulation mit  $2 \times 10^8$  cfu/ml, in *erf104*, der *AtERF104*-RNAi-Linie (RNAi 1) und *AtERF104*<sup>OE</sup> (*ERF104*<sup>OE</sup>) im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht. Die inokulierten Blätter zeigten nach sechs Tagen bei Col-0-Pflanzen keine Symptome. In *erf104* und weniger ausgeprägt in der *AtERF104*-RNAi-Linie (RNAi 1) ließen sich chlorotische Bereiche beobachten, während in *AtERF104*<sup>OE</sup> (OE1 bzw. OE2) Symptome, die wäßrigen Läsionen ähnelten, beobachtet werden konnten.

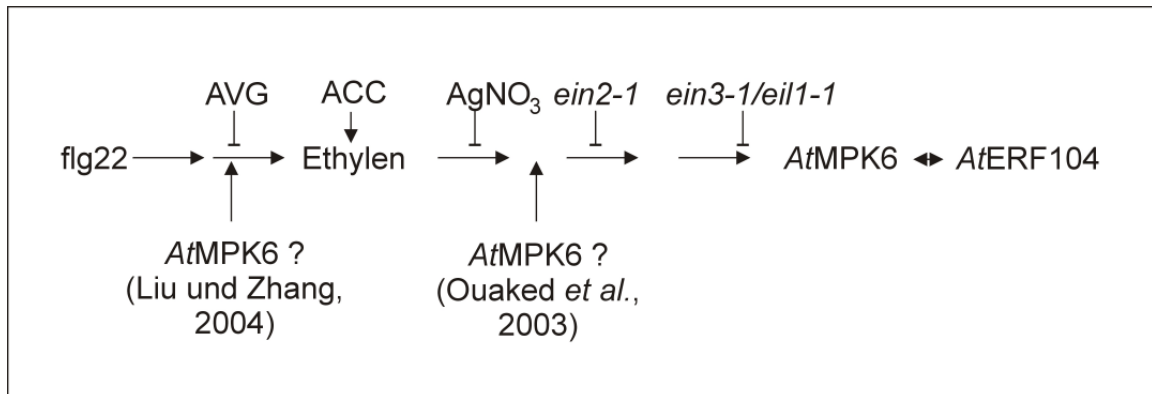
## 4 Diskussion

MAPK-Kaskaden haben eine wichtige Funktion in verschiedensten eukaryotischen Signaltransduktionsprozessen. In Pflanzen wirken sie unter anderem in der Signaltransduktion nach biotischem und abiotischem Streß und in Entwicklungsprozessen. Erst in den letzten Jahren konnten in Pflanzen erste MAPK-Substrate identifiziert werden. Dazu zählen beispielsweise *NtWRKY1*, *NbPPS3* und *NtWIF* (Katou *et al.*, 2005; Menke *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2006) sowie die *Arabidopsis* MAPK-Substrate *AtVIP1*, *AtMKS1*, *AtWRKY33*, *AtWRKY25*, *AtPHOS32* und *AtACS6* die in Reaktion auf biotischen Streß phosphoryliert werden (Liu und Zhang, 2004; Andreasson *et al.*, 2005; Djamei *et al.*, 2007; Merkouropoulos *et al.*, 2008). Diese Arbeit beschäftigt sich mit *AtERF104*, neben *AtACS6* und *AtEIN3* dem dritten in *Arabidopsis* gefundenen *AtMPK6*-Substrat (Liu und Zhang, 2004; Yoo *et al.*, 2008), das eine Rolle in der Ethylenbiosynthese und -signaltransduktion spielt. Für keinen anderen Prozeß wurde in Pflanzen bislang eine derartige Fülle von MAPK-Substraten identifiziert. Besonders bemerkenswert ist jedoch, daß alle drei Substrate von einer einzigen MAPK, *AtMPK6*, die im Signalweg sowohl oberhalb als auch unterhalb der Ethylenbiosynthese wirkt (Liu und Zhang, 2004; Yoo *et al.*, 2008), phosphoryliert werden.

### 4.1 Die Interaktion von *AtMPK6* und *AtERF104* ist auflösbar

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion dynamisch ist, d.h. sie läßt sich durch flg22-Behandlung auflösen (Abb. 4.1 und 3.6 A). Aus der Literatur war vor Beginn der Arbeiten bekannt, daß ca. 2h nach flg22-Behandlung Ethylen vermehrt gebildet wird. Weiterhin bestand eine Kontroverse an welcher Position im Ethylensignalweg *AtMPK6* eine Rolle spielt (Ouaked *et al.*, 2003; Liu und Zhang, 2004). Da es sich bei *AtERF104* um ein Mitglied der ERF-Genfamilie handelte, wurde nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft, ob sich die Interaktion durch den Ethylenvorläufer ACC auflösen läßt. Das war der Fall (Abb. 4.1 und 3.8). Weiterhin ließ sich die flg22-abhängige Auflösung durch einen Ethylenbiosynthese-Inhibitor (AVG) sowie durch einen Inhibitor der Ethylenprezeption

(AgNO<sub>3</sub>) blockieren (Vgl. Abb. 4.1 und Abb. 3.8). In den wenig redundanten Ethylensignaltransduktionsmutanten *ein2-1* und *ein3-1/eil1-1* konnte die *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion durch flg22-Zugabe nicht mehr aufgelöst werden (Vgl. Abb. 4.1 und 3.9 A). Diese Ergebnisse zusammen zeigen, daß Ethylen eine Rolle in der Auflösung der *AtERF104-AtMPK6*-Interaktion spielt. Es stellt sich die Frage an welcher Stelle im Ethylensignalweg *AtMPK6* dabei aktiviert wird.



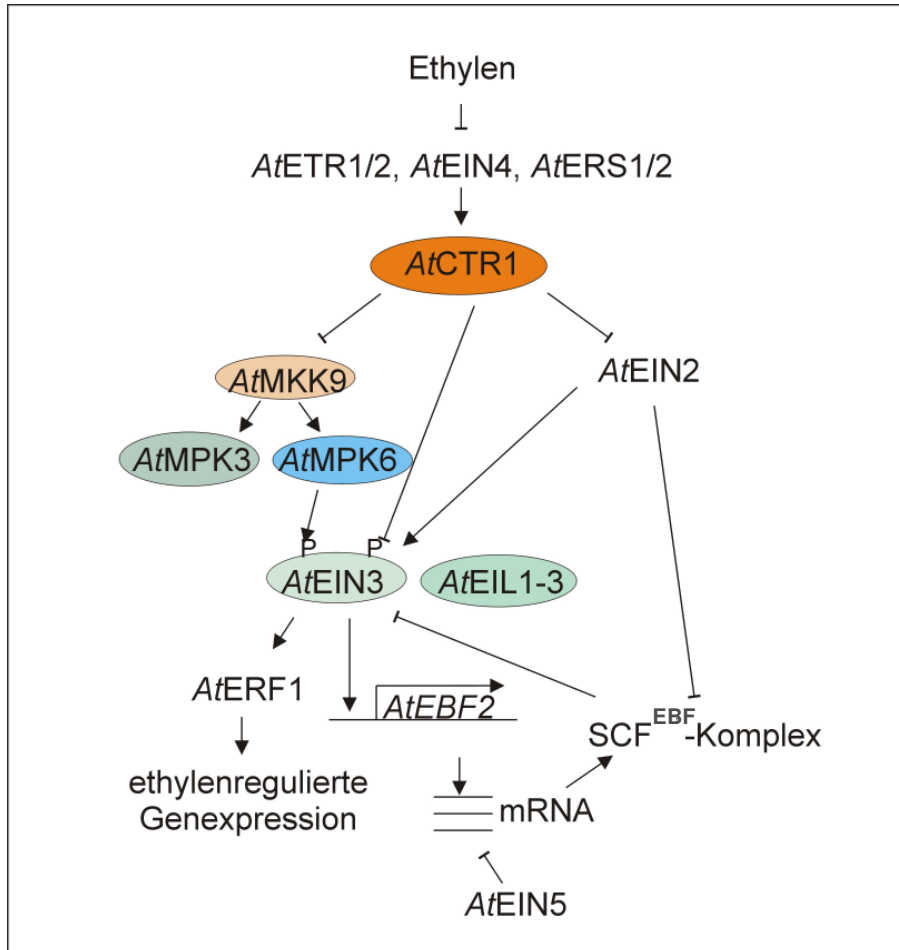
**Abb. 4.1 Signaltransduktion nach flg22-Perzeption:** Die Interaktion zwischen *AtMPK6* und *AtERF104* läßt sich durch flg22-Behandlung auflösen. Inhibitorstudien zeigten, daß die Auflösung abhängig von Ethylenbiosynthese und -perzeption ist. Auch der Ethylenvorläufer ACC kann diese Interaktion auflösen. Die Auflösung der Interaktion liegt im Signalweg unterhalb von *AtEIN2* und *AtEIN3* sowie *AtEIL1*. Über die Frage, ob die Aktivierung von *AtMPK6* im Signalweg oberhalb oder unterhalb der Ethylenbiosynthese liegt, differieren die Meinungen (Liu und Zhang, 2004; Ouaked *et al.*, 2003).

## 4.2 Die Position von *AtMPK6* im Ethylensignalweg

In der Literatur ist die Rolle von MAPKen, vor allem von *AtMPK6*, in der Ethylensignaltransduktion bislang umstritten. Liu und Zhang (2004) konnten zeigen, daß schon zwei Stunden nach flg22-Behandlung in *Arabidopsis thaliana* *AtMPK6*-abhängige Ethylenproduktion stattfand. Diese Gruppe konnte weiterhin zeigen, daß *AtMPK6* in der Lage ist, die Biosynthese von Ethylen zu beeinflussen. Sie zeigten, daß *AtMPK6* *AtACS2* und *AtACS6* phosphoryliert und daß diese Phosphorylierung die Stabilität von *AtACS6* (Joo *et al.*, 2008) und damit die Ethylenbiosynthese positiv beeinflusst (Abb. 4.1).

In einer weiteren Veröffentlichung von Ouaked *et al.* (2003) wurde gezeigt, daß *AtMPK6* und *AtMPK13* im Verlauf der Ethylensignalgebung *AtCTR1* (*constitutive triple response*)-abhängig aktiviert werden. Es wurde schon länger vermutet, daß in der Signalweiterleitung unterhalb von *AtCTR1*, einer Schlüsselkomponente der Ethylensignaltransduktion, eine MAPK-Kaskade beteiligt ist. Diese Annahme ergibt sich

hauptsächlich aus der Tatsache, daß es sich bei *AtCTR1* um eine Raf-ähnliche MAP3K handeln könnte. Bislang wurde für *AtCTR1* jedoch keine MAP3K-Aktivität gezeigt (Huang *et al.*, 2003).



**Abbildung 4.2** Der Ethylensignaltransduktionsweg nach Olmedo *et al.* (2006), Konishi und Yanagisawa (2008) und Yoo *et al.* (2008): Bindet Ethylen an die Ethylenrezeptoren (*AtETR1*, *AtERT2*, *AtEIN4*, *AtERS1* und *AtERS2*) dann wird *AtCTR1* inhibiert. *AtCTR1* kann dann *AtEIN2* und die *AtMKK9*-*AtMPK3/6*-Kaskade, die zur Phosphorylierung und Stabilisierung von *AtEIN3* führt, nicht mehr negativ regulieren. Über eine andere MAPK-Kaskade wird *AtEIN3* durch Phosphorylierung an einer zweiten Phosphorylierungsstelle destabilisiert. *AtEIN3* und die *AtEIN3*-Homologen *AtEIL1-3* initiieren dann die Expression von ethylenregulierten Genen über *AtERF1*. *AtEIN3* bindet weiterhin an den *AtEBF2*-Promotor und aktiviert die *AtEBF2*-Transkription. *AtEBF2* spielt eine Rolle in einem *SCF<sup>EBF</sup>*-Komplex, der zur 26S-Proteasom vermittelten Degradation von *AtEIN3* führt. Dieser Komplex wird negativ von dem Nrfp-ähnlichen Protein *AtEIN2* reguliert. Die *AtEBF2*-mRNA wird durch die 5'-3' Exoribonuclease-Aktivität von *AtEIN5* degradiert.

Neuere Publikationen bestätigen, daß *AtMPK6* und zusätzlich auch *AtMPK3* im Signalweg unterhalb von *AtCTR1* beteiligt sind. Die entsprechende MAP2K für diese *AtCTR1*-*AtMPK3/AtMPK6*-Kaskade ist *AtMKK9* (Yoo *et al.*, 2008). *AtCTR1* soll dabei eine negativ regulatorische Funktion ausüben und die Aktivierung von *AtMKK9* und *AtMPK3* bzw. *AtMPK6* inhibieren (Abb. 4.2 und Abbildungslegende). Bislang wurden



allerdings keine direkten *in planta*-Interaktionsstudien für *AtCTR1* und *AtMKK9* durchgeführt und es wurde noch nicht gezeigt, ob *AtCTR1* *AtMKK9* in der Tat phosphorylieren kann. Es könnte sich bei der negativen Regulation der *AtMKK9*-Kaskade durch *AtCTR1* also durchaus um einen sekundären Effekt handeln. Xu *et al.* (2008) beschrieben kürzlich eine Rolle von *AtMKK9* in der Ethylenbiosynthese und vermuteten, daß die Rolle der *AtMKK9-AtMPK3/AtMPK6*-Kaskade auf die Ethylensignaltransduktion durch verstärkte Ethylenbindung an die Ethylenrezeptoren zu Stande kommen könnte (Xu *et al.*, 2008). Die genaue Position von *AtMKK9* im Ethylensignalweg ist also weiterhin nicht geklärt und erfordert weiterführende Untersuchungen (Hahn und Harter, 2008) möglicherweise über direkte Analysen von *AtMKK9*-Interaktionspartnern.

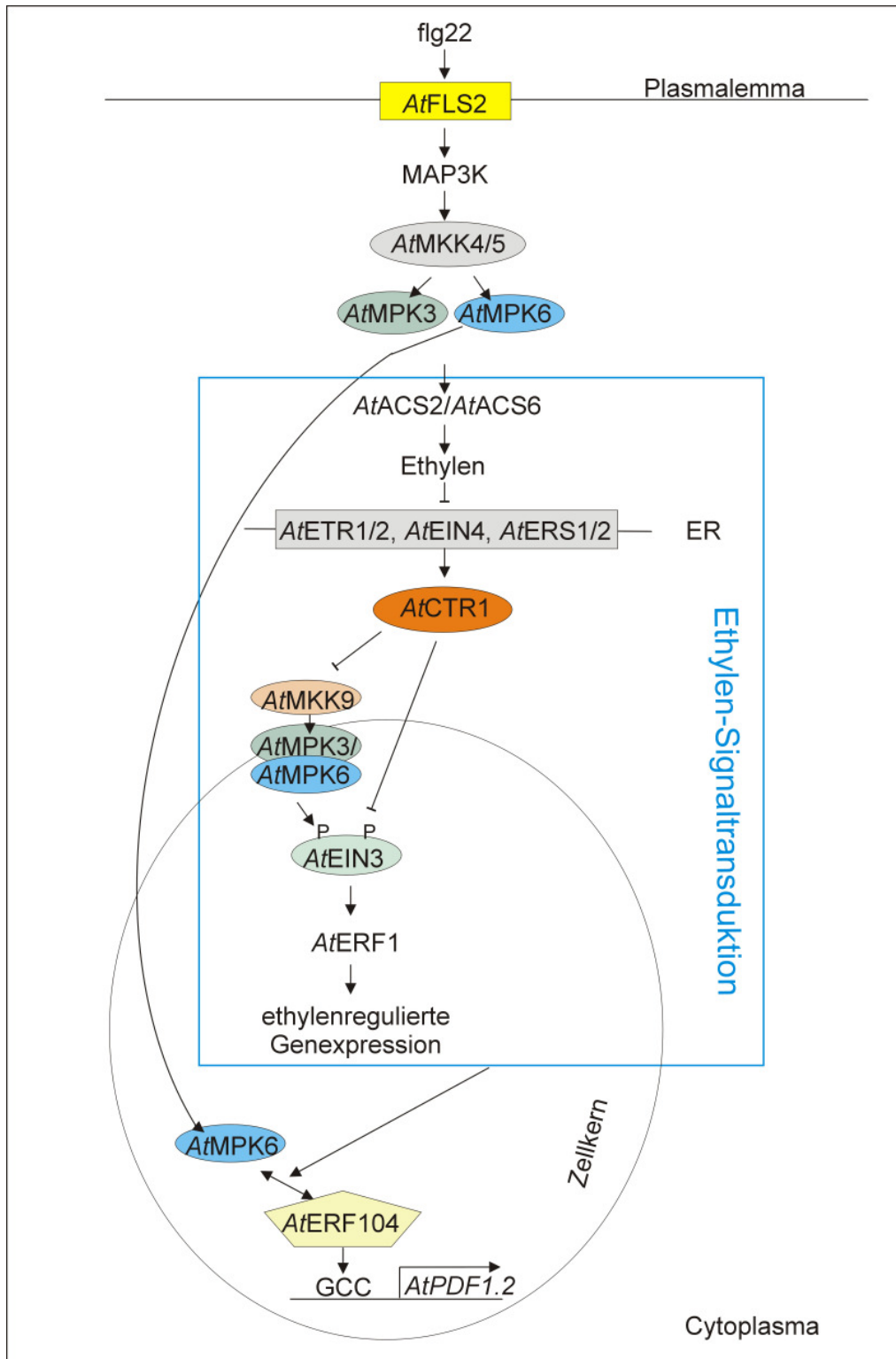
In der Publikation von Yoo *et al.* (2008) wurde weiterhin gezeigt, daß die *AtMKK9*-abhängige positive Regulation der Ethylensignaltransduktion hauptsächlich durch die Phosphorylierung von *AtEIN3* und eine damit verbundene Stabilisierung des *AtEIN3*-Proteins, bedingt wird (Abb. 4.2). Die Menge an *AtEIN3*-Protein wird auch über weitere Komponenten des Ethylensignalweges vor allem über eine 26S-Proteasom-abhängige Degradation, gesteuert über einen SCF<sup>EBF</sup>-Komplex, negativ reguliert (Abb. 4.2 und Abbildungslegende).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß *AtMPK6* innerhalb der ersten 15 Minuten nicht durch Behandlung mit 1µM ACC aktiviert werden kann (s. Abb. 3.9 B). Dies steht in Widerspruch zu der Publikation von Ouaked *et al.* (2003), in der mit höheren ACC-Konzentrationen (1mM) bereits nach zehn Minuten eine *AtMPK6*-Aktivierung in *Col-0*, *ein3-1* und *ein2* nicht aber in *etr1-1* und eine konstitutive *AtMPK6*-Aktivierung in *ctr1* beobachtet wurde. Daher postulierten Ouaked *et al.* (2003) eine Funktion von *AtMPK6* im Signalweg unterhalb von *AtETR1* und *AtCTR1*, aber oberhalb von *AtEIN2* und *AtEIN3*. Die Publikation von Liu und Zhang (2004), kam allerdings zu den gleichen Ergebnissen wie sie in der hier vorliegenden Arbeit erzielt wurden. Die Autoren nutzten, ebenso wie hier beschrieben, die physiologische ACC-Konzentration von 1µM ACC und konnten weder nach zehn noch nach 30 Minuten *AtMPK6*-Aktivierung beobachten. Auch Yoo *et al.* (2008) analysierten ACC-abhängige *AtMPK6*-Aktivierung und konnten nach Behandlung mit 200µM ACC *AtMPK6*-Aktivierung nach 30 bzw. stärker nach 60 Minuten beobachten. Allerdings wurden hier keine Keimlinge, wie in den anderen Fällen verwendet, sondern die Fütterung erfolgte über die Petiolen. Eine solch späte *AtMPK6*-

Aktivierung wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da sie nicht für die Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion, die innerhalb weniger Minuten erfolgt, verantwortlich sein kann. Die *AtMPK6*-Kinaseaktivität, die eine Rolle in der Auflösung dieser Interaktion spielt, liegt höchst wahrscheinlich oberhalb des Ethylensignalweges. Dies wurde auch in Untersuchungen mit Ethylensignaltransduktions-Mutanten bestätigt (s. Abb. 3.9 A). Auch hier konnte gezeigt werden, daß die *flg22*-abhängige Auflösung des *AtMPK6-AtERF104*-Komplexes abhängig von der Ethylensignaltransduktion ist, die hierzu notwendige *AtMPK6*-Aktivierung also der Ethylensignalweiterleitung vorangestellt sein muß (Vgl. Modell Abb. 4.3).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit festgestellt, daß die Auflösung dieser *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion unabhängig von *AtMKK9* (s. Abb. 3.10) verläuft. Es sich bei den hier analysierten Prozessen also höchstwahrscheinlich um einen weiteren parallelen Weg im Ethylensignalweg handelt. Solche parallelen Signalwege wirken einerseits als Backup-System zur Aktivierung verschiedener Signalwege in Antwort auf einen einzigen Stimulus, andererseits ermöglichen sie die Feinsteuerung der Reaktionen, da jeder Weg verschiedene Mengen teilweise überlappender Reaktionen aktiviert (Broekaert *et al.*, 2006). Eine Hypothese über den Ablauf der *AtERF104*-Signaltransduktion ist in Abbildung 4.3 als Modell dargestellt.

Es stellt sich die Frage wie eine einzelne MAPK in mehreren Einzelschritten eines bestimmten Signalweges differentiell reguliert werden kann. Eventuell läßt sich das durch Komplexbildung mit Hilfe von regulatorischen Domänen der Kinasen selbst oder durch Gerüst-Proteine erklären, wie sie für Säugetiere und Hefen beschrieben wurden (Gustin *et al.*, 1998). *AtMPK6* wird zur Initiation der Ethylenbiosynthese *AtMKK4*- und *AtMKK5*-abhängig phosphoryliert, wohingegen sie im Ethylensignalweg unterhalb von *AtCTR1 AtMKK9*-abhängig phosphoryliert wird. Außerdem spielt eventuell die Lokalisation der MAPK-Kaskade-Komponenten eine Rolle. Konstitutiv aktive *AtMKK4* wurde hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert gefunden, kann also durch *AtMPK6*-Phosphorylierung die Ethylenbiosynthese im Cytoplasma aktivieren, während konstitutiv aktive *AtMKK9* nukleär lokalisiert vorlag und dort die Ethylensignalgebung durch die Stabilisierung von *AtEIN3* positiv beeinflussen (Yoo *et al.*, 2008). In weiterführenden Analysen könnte die Lokalisation der Wildtyp-MAP2Ken mittels Immunlokalisationsstudien nach Elicitierung mit *flg22* untersucht werden.



**Abb. 4.3 Modell für den Einfluß von Ethylenbiosynthese und -signaltransduktion auf die Auflösung der AtMPK6-AtERF104-Interaktion:** Die Perzeption von flg22 durch AtFLS2 führt zur Aktivierung einer MAPK-Kaskade, die AtMKK4 und AtMKK5 sowie AtMPK3 und AtMPK6 enthält. Aktivierte AtMPK6 phosphoryliert AtACS2 und AtACS6, was zur Stabilisierung von AtACS6 beiträgt und die Ethylenbiosyntheserate erhöht. Wird Ethylen nun von den Ethylenrezeptoren gebunden, dann wird AtCTR1 nicht mehr aktiviert. Eine zweite MAPK-Kaskade, mit AtMKK9, AtMPK3 und AtMPK6 führt zur Stabilisierung von AtEIN3. Die Ethylen-Signaltransduktion läuft ungehindert ab. Der AtMPK6-AtERF104-Komplex wird durch das Stattfinden der Ethylen-Signaltransduktion und AtMPK6-Aktivität aufgelöst. AtERF104 ist daher möglicherweise frei und kann an GCC-Elemente enthaltende Promotoren binden und beispielweise die

Expression von *AtPDF1.2* anschalten. Die durch *AtERF104* initiierten Signalwege führen wahrscheinlich zu einer Steigerung der basalen Resistenz. (Asai *et al.*, 2002; Liu und Zhang, 2004; Olmedo *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Hahn und Harter, 2008; Joo *et al.*, 2008; Konishi und Yanagisawa, 2008; Yoo *et al.*, 2008)

### 4.3 *AtERF104* ist ein *in vivo*-Substrat von *AtMPK6*

Die Interaktion von *AtERF104* und *AtMPK6* ist dynamisch, d.h. sie wird durch flg22- und ACC-Behandlung innerhalb weniger Minuten aufgelöst. Für die Auflösung der Interaktion sind sowohl die Kinaseaktivität (und Lokalisation) von *AtMPK6*, als auch die die Ethylensignaltransduktion notwendig. Die Ethylenproduktion und -signalweiterleitung muß also, anders als früher beschrieben, nicht innerhalb von ein bis zwei Stunden sondern schon innerhalb weniger Minuten stattfinden (Liu und Zhang, 2004). Die Unterschiede lassen sich möglicherweise damit erklären, daß die FRET-Messung der *AtERF104*-*AtMPK6*-Interaktion deutlich sensitiver sein könnte als die Methode, die Liu und Zhang (2004) anwendeten. Dort wurde Ethylen in einem Gefäß gesammelt und dann mit einem Gaschromatographen die Ethylenkonzentration bestimmt.

#### 4.3.1 Transkriptionsfaktor-Freigabe im Zellkern

Das *AtMPK4*-Substrat *AtMKS1* interagiert im Zellkern mit *AtWRKY33* und *AtMPK4*. Nach Aktivierung von *AtMPK4* phosphoryliert diese *AtMKS1*, wodurch der *AtMKS1*-*AtWRKY33*-Komplex freigesetzt wird und *AtWRKY33* die Camalexin Biosynthese anschalten kann (Qiu *et al.*, 2008). Auch in den hier beschriebenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß eine MAPK, *AtMPK6*, mit einem Transkriptionsfaktor, *AtERF104*, im Zellkern interagiert. Nach Aktivierung der MAPK wird der Transkriptionsfaktor möglicherweise freigesetzt und kann dann an die Promotoren von Zielgenen binden und deren Transkription initiieren. Dabei ist die Freigabe des Transkriptionsfaktors sowohl von der *AtMPK6*-Aktivität als auch von der Ethylensignaltransduktion abhängig. Über die Frage, warum *AtMPK6* *AtERF104* vor flg22-Behandlung bindet und nach Elicitierung freigibt, läßt sich nur spekulieren. Wir wissen bisher, daß *AtMPK6*-YFP einzeln in Protoplasten transfiziert sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden kann. Nach Kotransfektion mit *AtERF104*-CFP konnten beide

Fusionsproteine nahezu ausschließlich im Zellkern lokalisiert werden. *AtERF104* besitzt zwei putative NLS (*nuclear localisation signal*)-Sequenzen, zieht also bei der Koexpression unter dem *CaMV-35S*-Promotor *AtMPK6* vermutlich in den Kern nach. Durch die Komplex-Bildung könnte *AtERF104* an der Bindung GCC-Element-enthaltender Promotoren und der damit verbundenen Aktivierung von Zielgenen gehindert werden. Nach der Freigabe im Zellkern kann *AtERF104* möglicherweise die Expression von Zielgenen, z.B. *AtPDF1.2*, initiieren (Abb. 4.3).

Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen eine Funktion von Phytohormonsignaltransduktion in der Kontrolle der Dynamik von Protein-Komplexen.

In der vorliegenden Arbeit wurde *AtERF104* als *in vivo*-Substrat von *AtMPK6* identifiziert. Die *in vivo*-Interaktion wurde mittels FRET und BiFC-Analysen gezeigt (Vgl. Abb. 3.4 A und 3.5 C). Weiterhin wurde die *in vivo*-Phosphorylierung in einer Western-Blot-Analyse festgestellt (s. Abb. 3.12 B). Die Spezifität der Enzym-Substrat-Beziehung zwischen *AtERF104* und *AtMPK6* wurde in *in vitro*-Immunkomplex-Kinase-Experimenten gezeigt. Dort konnte nur *AtMPK6* nicht jedoch *AtMPK3* und *AtMPK4* *AtERF104* phosphorylieren (Abb. 3.12 D).

#### 4.3.2 Regulation der *AtERF104*-Proteinstabilität durch *AtMPK6*

*AtERF104* wurde ursprünglich in einer Analyse über instabile Transkripte von Gutierrez *et al.* (2002) beschrieben. In den hier dargestellten Analysen konnte gezeigt werden, daß auch die *AtERF104*-Proteinstabilität reguliert wird. Für *AtACS6* und für *AtEIN3* wurde eine Erhöhung der Stabilität nach Phosphorylierung durch *AtMPK6* beschrieben (Joo *et al.*, 2008; Yoo *et al.*, 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß eine Mutation der beiden *AtMPK6*-Phosphorylierungsstellen in *AtERF104* zu einem schnelleren flg22-abhängigen Abbau dieses mutierten *AtERF104m*-Proteines im Vergleich zum Wildtyp *AtERF104*-Protein führt (Vgl. Abb. 3.16). Daraus kann man indirekt schließen, daß auch eine Phosphorylierung von *AtERF104* durch *AtMPK6* mit einer Stabilisierung des *AtMPK6*-Substrates *AtERF104* einhergeht. Das heißt, dieser für die Signalverstärkung bedeutende Regulationsmechanismus scheint, zumindest für den Ethylensignalweg, konserviert zu sein.

Bei der Analyse von *AtEIN3* wurde festgestellt, daß dessen *AtMPK3*- /*AtMPK6*-abhängige Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T<sub>174</sub> zur Stabilisierung von *AtEIN3* führt. Andererseits führte Phosphorylierung an der Phosphorylierungsstelle T<sub>592</sub> zu einer Destabilisierung des *AtEIN3*-Proteins. *AtERF104* weist drei verschiedene Phosphorylierungsstellen auf (T<sub>206</sub>, S<sub>229</sub> und S<sub>232</sub>) auf, von denen nur zwei (S<sub>229</sub> und S<sub>232</sub>) *AtMPK6*-abhängig phosphoryliert werden (s. Abb. 3.13 A-C). Eventuell würde eine Phosphorylierung an T<sub>206</sub> zu einer Destabilisierung von *AtERF104* führen. Diese Hypothese könnte überprüft werden, indem man in weiterführenden Analysen die *flg22*-abhängige Degradation eines stabil in Col-0 überexprimierten *AtERF104*(T<sub>206</sub>A)-Proteins, in dem das Threonin<sub>206</sub> gegen Alanin ausgetauscht wäre, untersuchen würde. Würde in einem solchen Experiment *AtERF104*(T<sub>206</sub>A) weniger schnell abgebaut werden als Wildtyp-*AtERF104*, dann könnte man davon ausgehen, daß die T<sub>206</sub>-Phosphorylierungsstelle ebenfalls *flg22*-abhängig phosphoryliert wird und diese Phosphorylierung zur Destabilisierung von *AtERF104* führt. Eine mögliche MAPK, die eine solche Phosphorylierung durchführen könnte ist *AtMPK11*. Diese MAPK bindet ebenfalls *AtERF104* und auch diese Interaktion ist durch *flg22*-Behandlung auflösbar (Vgl. Abb. 3.7). Weiterhin ist *AtMPK11* zusammen mit *AtMPK4* in der Gruppe B der MAPKen eingeordnet (Ichimura *et al.*, 2002). Beide Proteine sind sehr ähnlich und könnten auch eine ähnliche Funktion in der negativen Regulation des Jasmonat- und Ethylensignalweges spielen. Eventuell ist also *AtMPK11* ein negativer Regulator der Ethylensignaltransduktion und steuert diese über eine Destabilisierung von *AtERF104*. Um diese Spekulation zu überprüfen, könnte man ein Immunkomplex-Kinase-Experiment mit aktiver *AtMPK11* und *pep2* (s. Abb. 3.13 A), welches T<sub>206</sub> enthält, durchführen.

Die strenge Regulation der *AtERF104*-mRNA-Stabilität und -Proteinstabilität deutet darauf hin, daß *AtERF104* ein wichtiger Faktor in der Signaltransduktion nach *flg22*-Perzeption sein könnte.

### 4.3.3 Mikroarray-Analysen zeigen eine Aktivierung der Pathogenabwehr in *AtERF104*<sup>OE</sup>

Die *Mikroarray*-Experimente in Abschnitt 3.7.1 zeigten, daß die Transkripte einiger abwehrrelevanter Gene unter anderem *AtPDF1.2*, *AtPR5*, *AtRBOHD*, Chitinasen und *AtPLP2* in *AtERF104*<sup>OE</sup> verstärkt akkumulierten. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Überexpression von *AtPLP2*, einem Patatin-ähnlichen Protein, zur einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *Botrytis cinerea* führt (La Camera *et al.*, 2005). Auch in *AtERF104*<sup>OE</sup> konnte trotz konstitutiver *AtPDF1.2*-Expression keine erhöhte Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea* beobachtet werden, vielmehr wiesen diese Pflanzen eine Tendenz in Richtung erhöhter Suszeptibilität auf. Mittels semi-quantitativer RT-PCR konnte die erhöhte *AtPLP2*-Expression in *AtERF104*<sup>OE</sup> jedoch nicht reproduziert werden. Möglicherweise ist diese Methode aber nicht sensitiv genug um die Erhöhung der *AtPLP2*-Expression zu analysieren und die nur schwache Tendenz von *AtERF104*<sup>OE</sup> zu erhöhter Suszeptibilität gegen *Botrytis* läßt sich vielleicht darauf zurückführen, daß *AtPLP2* in *AtERF104*<sup>OE</sup> nur etwas stärker exprimiert wird als in Col-0.

Es wurden in diesen Analysen jedoch wenig Gene gefunden, die auch in *AtERF1*<sup>OE</sup> oder nach Ethylen- oder Jasmonat-Behandlung differentiell reguliert waren. Dies deutet darauf hin, daß in *AtERF104*<sup>OE</sup> sehr spezifische Signalwege initiiert werden. Eine genauere Analyse der ausschließlich in *AtERF104*<sup>OE</sup> verstärkt exprimierten Gene könnte Aufschluß über Prozesse geben, die möglicherweise die basale Resistenz *AtERF104*-abhängig beeinflussen, denn die basale Resistenz war bei Infektionen mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* sowohl in *AtERF104*<sup>OE</sup> als auch in *erf104* verringert (s. Abb. 3.25).

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß in *AtERF104*<sup>OE</sup> nach Behandlung mit flg22 Gene differentiell exprimiert waren, deren Expression flg22-Behandlung in Col-0 nicht verstärken konnte. Das spricht dafür, daß die Überexpression von *AtERF104* die Initiation von Abwehrprozessen verstärkt. Zu den verstärkt exprimierten Genen zählen z.B. die Elicitorpeptid-Vorläufer *AtPROPEP2* und *AtPROPEP3*. Aus der Literatur ist bekannt, daß diese beiden Peptide nach Pathogen- und Elicitor-Behandlung verstärkt exprimiert werden und zur Signalverstärkung innerhalb der basalen Resistenz führen können. In Pflanzen die *AtPROPEP2* unter Kontrolle des *CaMV*-35S-Promotors überexprimieren, konnte eine verstärkte Expression von *AtPDF1.2* und *AtPRI* gefunden

werden (Huffaker *et al.*, 2006; Huffaker und Ryan, 2007). Die starke Transkriptakkumulation dieser Proteine spiegelt sich jedoch nicht im *AtERF104<sup>OE</sup>*-Phänotyp, Reduktion der basalen Resistenz, wieder.

Auch eine Phosphatase des PP2C-Typs wurde in *flg22*-behandelten *AtERF104<sup>OE</sup>* verstärkt exprimiert. Diese Phosphatase, kodiert durch *At2g40180* (auch als *AtPP2C5* bezeichnet), wurde auch in den hier beschriebenen Analysen zur *in vivo*-Phosphorylierung von *AtERF104* durch *AtMPK6* verwendet und konnte dort die *AtMPK6*-abhängige Phosphorylierung von *AtERF104* unterbinden (s. Abb. 3.12 B). Weiterhin wies diese PP2C-Phosphatase eine putative MAPK-Bindedomäne auf (Schweighofer *et al.*, 2004). Es stellt sich nun die Frage, ob die durch *At2g40180* kodierte Phosphatase *AtMPK6* oder *AtERF104* dephosphorylieren kann. In FRET-Analysen konnte keine direkte Bindung von *AtMPK6* an das durch *At2g40180* kodierte Protein gezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis kam aber womöglich durch den experimentellen Ansatz zustande. Weiterführende Analysen sollten die *in vivo*-Bindung von *AtMPK6* bzw. *AtERF104* an das durch *At2g40180* kodierte Protein genauer, möglicherweise mittels weiterführender FRET- oder Ko-Immunpräzipitations-Experimente, thematisieren.

Auch eine ACC-Synthase *AtACS7* wurde nach *flg22*-Behandlung in *AtERF104<sup>OE</sup>* stärker exprimiert als in *Col-0*. Über diese ACC-Synthase sind bislang kaum Informationen vorhanden. Möglicherweise trägt sie zu einer verstärkten Ethylen-Biosynthese in *AtERF104<sup>OE</sup>* bei und verstärkt dabei die ethylenabhängigen Antworten durch einen positiven *Feedback*-Mechanismus in *flg22*-behandelten *AtERF104<sup>OE</sup>*. Um diese Annahme zu überprüfen, könnte in weiterführenden Analysen der Ethylengehalt in *flg22*-behandelten *AtERF104<sup>OE</sup>* untersucht werden.

#### 4.4 Die Rolle von *AtERF104* in der basalen Resistenz

Das Phytohormon Ethylen spielt in der Reaktion auf biotischen und abiotischen Streß, bei der Pflanzenentwicklung, der Fruchtreife und auch der Seneszenz eine wichtige Rolle und wirkt zusammen mit Jasmonat in der Initiierung der Abwehr gegen nekrotrophe Pathogene. Pflanzen, die *AtERF1* überexprimieren, zeigten z.B. eine konstitutive Expression von *AtPDF1.2* und eine damit verbundene Resistenz gegen verschiedene nekrotrophe Pathogene, u.a. *Botrytis cinerea* und *Plectosphaerella cucumerina*



(Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Auch *AtERF104*-Überexpression führte zu einer konstitutiven Expression von *AtPDF1.2* (s. Tabelle 3.1 und Abb. 3.18), damit war aber keine erhöhte Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *Botrytis cinerea* verbunden (Abb. 3.24). Die Expression von *AtPDF1.2* ist ein recht früher Marker für die Initiierung des Ethylensignalweges, der u.a. zur Resistenz gegen einige nekrotrophe Pathogene führt.

Auch gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 konnte keine Veränderung in der Anfälligkeit beobachtet werden (s. Abb. 3.23). Dies ist konsistent mit der Literatur, die *AtERF1*-Überexpressoren zeigten ebenfalls keine Veränderung in der Reaktion auf *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002). Vermutlich besitzt *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 genügend Virulenzfaktoren, um die basale Resistenz in *Arabidopsis thaliana* zu unterdrücken. Daher kann die Rolle von *AtERF104* in der basalen Resistenz wahrscheinlich nur mit Hilfe eines schwach pathogenen Stamms oder einem *Pseudomonas*-Stamm, der die entsprechenden Virulenzfaktoren nicht besitzt, untersucht werden.

Interessanterweise zeigten *AtERF104* und *erf104* eine erhöhte Suszeptibilität gegen das nichtadaptierte Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (s. Abb. 3.25). Vielleicht spielt *AtERF104* daher keine Rolle in der positiven Regulation des Jasmonat- und / oder Ethylen-Abwehrweges gegen nekrotrophe Pathogene sondern eher, verbunden durch seine Interaktion mit der sehr schnell PAMP-induzierten MAPK, *AtMPK6*, in der Regulation der sehr frühen Reaktionen auf Pathogene, der basalen Resistenz. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß sowohl *erf104* und *AtERF104*-RNAi als auch *AtERF104*<sup>OE</sup> eine verringerte Resistenz gegen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* aufwiesen. Auch die gegenüber dem Wildtyp verstärkte Inhibierung des Wurzelwachstums nach flg22-Behandlung konnte sowohl für *erf104*, *AtERF104*-RNAi und *AtERF104*<sup>OE</sup> beobachtet werden. Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, es wurde aber schon früher gezeigt, daß für Signaltransduktionskomponenten die Feinsteuerung sehr wichtig ist und eine Veränderung in der Homöostase solcher Komponenten durch Deletion oder Überexpression gleiche Reaktionen auslösen kann (Sineshchekov und Fankhauser, 2004).

Eventuell kommt es in *AtERF104*<sup>OE</sup>, wie auch nach transienter Expression von *AtERF104*-CFP in Protoplasten zu beobachten war (s. Abb. 3.4 B), zu einer Kolokalisation von *AtMPK6* und *AtERF104* im Zellkern. Es wäre weiterhin möglich, daß

auch andere, bislang unbekannte Komponenten, durch *AtERF104*-Überexpression mit in den Kern gezogen werden und das Fehlen dieser Komponenten in ihrer „Wildtyp-Position“ einen Verlust der ethylenabhängigen Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene, wie *Botrytis cinerea*, zur Folge hat. Daher wäre es interessant in weiterführenden Analysen zu überprüfen wie *AtMPK6* in *AtERF104<sup>OE</sup>*-Pflanzen lokalisiert ist. Dies könnte z.B. über Immunmarkierungs-Experimente erfolgen. Weiterhin wäre es möglich aus Kernextrakten von *AtERF104<sup>OE</sup>*-Material weitere *AtERF104*-Interaktoren aufzureinigen und diese dann hinsichtlich ihrer Funktion in der Pathogenresistenz zu analysieren.

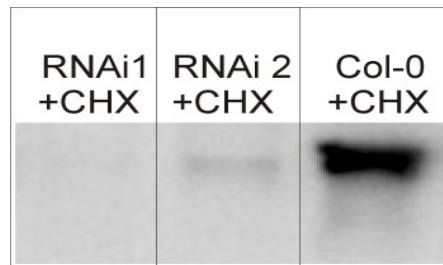
Da sowohl die *erf104*-Mutante als auch die *AtERF104*-Überexpressions-Linien ähnliche Reaktionen zeigten, wäre es möglich, daß ein Vergleich der in *erf104* und *AtERF104<sup>OE</sup>* koregulierten Gene Aufschluß über die Beeinflussung der basalen Resistenz in beiden Linien geben könnte. Diejenigen Gene, die sowohl in *erf104* als auch in *AtERF104<sup>OE</sup>* jedoch nicht in Col-0 differentiell reguliert waren, zeigt Tabelle. 4.1. Zwar wurde für einige dieser Gene eine Rolle in der Resistenz gegen Pathogene beschrieben, man kann aber keine Regulatoren, die speziell die basale Resistenz beeinflussen, in dieser Genliste finden.

**Tabelle 4.1** In Microarray-Experimenten mit *erf104* und *AtERF104<sup>OE</sup>* wurden folgende Gene im Vergleich zu Col-0 differentiell exprimiert:

AGI-Code	<i>AtERF104<sup>OE</sup></i> /Col-0		<i>erf104</i> /Col-0		TAIR-Beschreibung
	X-fach	p-Wert	X-fach	p-Wert	
At2g26560	26,2	0,008	10,8	0,026	PLP2 ( <i>PHOSPHOLIPASE 2A</i> )
At1g21120	21,6	0,029	4,8	0,038	putative O-methyltransferase
At1g15100	16,9	0,049	22,5	0,047	RHA2A ( <i>RING-H2 finger A2A</i> )
At1g14870;At1g14880	14,2	0,013	7,2	0,026	uncharacterized Protein
At1g19960	12,7	0,038	9,8	0,039	similar to transmembrane receptor
At4g22620	11,9	0,024	10,5	0,027	auxin-responsive protein
At1g75040	10,7	0,036	11,7	0,030	PR5 ( <i>PATHOGENESIS-RELATED GENE 5</i> )
At1g61340	10,5	0,042	10,6	0,047	F-box family protein
At5g26220	9,1	0,046	11,9	0,043	ChaC-like protein
At1g06000	9,1	0,038	4,1	0,027	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family

Die *flg22*-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums und die Analyse des Wachstums von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* wurden mit einer *erf104*-T-DNA-Insertionslinie und einer *AtERF104*-RNAi Linie untersucht. Eine weitere *AtERF104*-RNAi-Linie (Abb. 4.4) zeigte eine Reduktion der Menge des *AtERF104*-Transkriptes, aber keinen vollständigen RNAi-Effekt. Für diese Linie konnte keine Veränderung in der

Resistenz gegenüber dem nichtadaptierten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* oder in der *flg22*-abhängigen Inhibition des Wurzelwachstums gegenüber Col-0 beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte als zusätzlicher Hinweis darauf dienen, daß tatsächlich das Fehlen des *AtERF104*-Transkriptes verantwortlich für die erhaltenen Ergebnisse ist.



**Abb. 4.4 Vergleichende Darstellung zweier *AtERF104*-RNAi-Linien:** Die Northern-Blot-Analyse zeigt die *AtERF104*-Transkriptakkumulation nach Behandlung mit 100µM Cycloheximid (CHX) für 3 Stunden. Man kann einerseits die im Ergebnisteil dargestellte *AtERF104*-RNAi-Linie 1 (RNAi1) sehen, in der auch nach Cycloheximid-Behandlung kein *AtERF104*-Transkript akkumuliert. Eine weitere RNAi-Linie (RNAi 2) zeigt jedoch nach Cycloheximid-Behandlung *AtERF104*-Transkriptakkumulation, die allerdings im Vergleich zu Col-0 stark reduziert ist.

#### 4.5 Die Rolle von *AtMPK11* in der PAMP-induzierten Signaltransduktion

Für *AtMPK11* konnte gezeigt werden, daß auch diese MAPK *AtERF104* binden kann (s. Abb. 3.4 A und 3.5). In weiterführenden Analysen könnte die Aktivierbarkeit von *AtMPK11* genauer untersucht werden. Es sollte getestet werden, ob es sich bei *AtERF104* um ein direktes *AtMPK11* Substrat handelt. Von den 20 in *Arabidopsis* bekannten MAPKen sind bislang nur *AtMPK3*, *AtMPK4* und *AtMPK6* sehr gut untersucht. Es fehlen jedoch funktionelle Analysen für andere MAPKen. Für *AtMPK11* war vor den vorliegenden Untersuchungen nur bekannt, daß eine *flg22*-, kupfer- und salzabhängige Akkumulation von *AtMPK11*-Transkript erfolgte (Veß, 2004; Zipfel *et al.*, 2004).

*AtMPK4* und *AtMPK11* sind auf Proteinebene zu 90% identisch und weisen nahezu das gleiche Molekulargewicht von ca. 43kDa und identisches Laufverhalten im SDS-Gel auf. Das bedeutet *AtMPK4* hat *AtMPK11* eventuell in *in gel*-Analysen und Western-Analysen mit einem Antikörper gegen aktivierte MAPKen maskiert. All diese Faktoren haben vermutlich dazu geführt, daß die *flg22*-abhängige Aktivierung von *AtMPK11* bislang noch nicht festgestellt wurde. Die hier vorliegenden Untersuchungen geben einen ersten

Hinweis darauf, daß auch *AtMPK11* durch PAMPs (*flg22*) aktiviert werden kann. Diese Aktivierung erfolgt aber nur sehr transient. Möglicherweise gehören die Substrate von *AtMPK11* einem sehr früh nach Pathogenbefall induzierten Set an Proteinen an, die sehr schnell aber auch transient aktiviert werden. Solche Proteine könnten eine Rolle bei den sehr frühen Signaltransduktionsprozessen in der Pathogenabwehr spielen. Der Klärung dieser spannenden Frage könnte man z.B. mit der Suche nach *AtMPK11*-Interaktoren, eventuell durch Proteinaufreinigungen, Proteinarray-Analysen (Feilner *et al.*, 2005) oder weiteren Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen näher kommen. Auch eine Analyse der Veränderungen des Transkriptoms durch *AtMPK11*-Verlust oder -Überexpression mit Hilfe von *Microarray*-Experimenten wäre denkbar.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Identifikation des Transkriptionsfaktors *AtERF104* als neues *in vivo*-Substrat von *AtMPK6*. Die Phosphorylierung durch *AtMPK6* erhöht dabei die Proteinstabilität von *AtERF104*.

*AtMPK6* und *AtERF104* bilden einen Komplex im Zellkern, der nach Elicitierung mit dem PAMP flg22 aufgelöst wird. Für die Auflösung der Interaktion von *AtERF104* und *AtMPK6* sind die Kinaseaktivität von *AtMPK6* und die Phosphorylierbarkeit von *AtERF104* entscheidend. Dabei liegt die Aktivierung von *AtMPK6* im Signalweg oberhalb der Ethylenbiosynthese.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß obwohl die biochemische Aktivierung von *AtMPK6* unabhängig von der Ethylensignaltransduktion ist, für die Auflösung der *AtMPK6-AtERF104*-Interaktion eine funktionierende Ethylensignalkaskade entscheidend ist. *AtERF104* kann spezifisch GCC-Element-enthaltende Promotoren binden und die Genexpression nachgestellter Gene induzieren. Als direktes Zielgen von *AtERF104* wurde *AtPDF1.2* identifiziert.

Trotz der hohen *AtPDF1.2*-Expression in *AtERF104*<sup>OE</sup> konnte keine Erhöhung der Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *Botrytis cinerea* beobachtet werden. Im Gegenteil konnte sowohl für *AtERF104*<sup>OE</sup> als auch für *erf104* eine Tendenz zu erhöhter Suszeptibilität gegen dieses Pathogen gefunden werden.

Für *AtERF104*<sup>OE</sup> und für *erf104* konnte keine Veränderung in der Resistenz gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 beobachtet werden. Die Resistenz gegen das nichtadaptierte Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* war jedoch in beiden Linien reduziert. *AtERF104* spielt also eine Rolle in der basalen Resistenz. Auch die verstärkte flg22-abhängige Inhibierung des Wurzelwachstums in *AtERF104*<sup>OE</sup> und *erf104* unterstreicht die Bedeutung von *AtERF104* in den Signalwegen nach PAMP-Erkennung.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahlfors, R., Macioszek, V.K., Rudd, J.J., Brosche, M., Schlichting, R., Scheel, D. und Kangasjärvi, J.** (2004). Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *The Plant Journal* **40**, 512-522.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Solano, R., Wisman, E., Ferrari, S., Ausubel, F.M. und 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.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. und Ecker, J.R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.
- Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., Newman, M.A., Bjorn Nielsen, H., Hirt, H., Somssich, I., Mattsson, O. und Mundy, J.** (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *Embo J* **24**, 2579-2589.
- Anstätt, C. und Tenhaken, R.** (2003). A mitogen-activated-protein kinase from soybean is activated by a pathogen and novel functional analogs of salicylic acid. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 929-934.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. und Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. und Stryer, L.** (2007). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag **6**.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A. und Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *Plant J* **29**, 23-32.
- Bethke, G.** (2004). Diplomarbeit: Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Komponenten aus *Arabidopsis* MAP-Kinase-Kaskaden. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Brader, G., Djamei, A., Teige, M., Palva, E.T. und Hirt, H.** (2007). The MAP kinase kinase MKK2 affects disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 589-596.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Brodersen, P., Petersen, M., Bjorn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J. und Mundy, J.** (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant J* **47**, 532-546.

- Broekaert, W.F., Delaure, S.L., De Bolle, M.F. und Cammue, B.P.** (2006). The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol* **44**, 393-416.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. und Nürnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J* **21**, 6681-6688.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. und Collmer, A.** (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 10181-10186.
- Champion, A., Picaud, A. und Henry, Y.** (2004). Reassessing the MAP3K and MAP4K relationships. *Trends Plant Sci* **9**, 123-129.
- Cheong, Y.H., Moon, B.C., Kim, J.K., Kim, C.Y., Kim, M.C., Kim, I.H., Park, C.Y., Kim, J.C., Park, B.O., Koo, S.C., Yoon, H.W., Chung, W.S., Lim, C.O., Lee, S.Y. und Cho, M.J.** (2003). BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiol* **132**, 1961-1972.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. und Felix, G.** (2006). The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. und Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. und Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**, 803-814.
- Colcombet, J. und Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* **413**, 217-226.
- Dangl, J.L., Hauffe, K.D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1987). Parsley protoplasts retain differential responsiveness to u.v. light and fungal elicitor. *Embo J* **6**, 2551-2556.
- Desikan, R., Hancock, J.T., Ichimura, K., Shinozaki, K. und Neill, S.J.** (2001). Harpin induces activation of the Arabidopsis mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiol* **126**, 1579-1587.
- Djamei, A., Pitzschke, A., Nakagami, H., Rajh, I. und Hirt, H.** (2007). Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**, 453-456.
- Doczi, R., Brader, G., Pettko-Szandtner, A., Rajh, I., Djamei, A., Pitzschke, A., Teige, M. und Hirt, H.** (2007). The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *Plant Cell* **19**, 3266-3279.
- Ecker, J.R.** (2004). Reentry of the Ethylene MPK6 Module. *Plant Cell* **16**, 3169-3173.

- Eschen-Lippold, L., Rothe, G., Stumpe, M., Göbel, C., Feussner, I. und Rosahl, S.** (2007). Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry* **68**, 797-801.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q. und Alfano, J.R.** (2003). The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol* **49**, 377-387.
- Feilner, T., Hultschig, C., Lee, J., Meyer, S., Immink, R.G., Koenig, A., Possling, A., Seitz, H., Beveridge, A., Scheel, D., Cahill, D.J., Lehrach, H., Kreutzberger, J. und Kersten, B.** (2005). High throughput identification of potential *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1558-1568.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. und Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**, 265-276.
- Ferrari, S., Plotnikova, J.M., De Lorenzo, G. und 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.
- Gachon, C. und Saindrenan, P.** (2004). Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol Biochem* **42**, 367-371.
- Gadella, T.W., Jr., van der Krogt, G.N. und Bisseling, T.** (1999). GFP-based FRET microscopy in living plant cells. *Trends Plant Sci* **4**, 287-291.
- Gao, M., Liu, J., Bi, D., Zhang, Z., Cheng, F., Chen, S. und Zhang, Y.** (2008). MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res* **18**, 1190-1198.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 205-227.
- Gomez-Gomez, L. und 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. und Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**, 251-256.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**, 277-284.
- Gong, W., Shen, Y.P., Ma, L.G., Pan, Y., Du, Y.L., Wang, D.H., Yang, J.Y., Hu, L.D., Liu, X.F., Dong, C.X., Ma, L., Chen, Y.H., Yang, X.Y., Gao, Y., Zhu, D., Tan, X., Mu, J.Y., Zhang, D.B., Liu, Y.L., Dinesh-Kumar, S.P., Li, Y., Wang, X.P., Gu, H.Y., Qu, L.J., Bai, S.N., Lu, Y.T., Li, J.Y., Zhao, J.D., Zuo, J., Huang, H., Deng, X.W. und Zhu, Y.X.** (2004). Genome-wide ORFeome cloning and analysis of *Arabidopsis* transcription factor genes. *Plant Physiol* **135**, 773-782.
- Gudesblat, G.E., Iusem, N.D. und Morris, P.C.** (2007). Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol* **173**, 713-721.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. und Nürnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**, 32338-32348.



- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M.und Davenport, K.** (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1264-1300.
- Gutierrez, R.A., Ewing, R.M., Cherry, J.M.und Green, P.J.** (2002). Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11513-11518.
- Guzman, P.und Ecker, J.R.** (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513-523.
- Hahn, A.und Harter, K.** (2008). MAP kinase cascades and ethylene - signaling, biosynthesis or both? *Plant Physiol*.
- Halim, V.A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D.und Rosahl, S.** (2007). Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1346-1352.
- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y.und Mackey, D.** (2007). Layered basal defenses underlie non-host resistance of *Arabidopsis* to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant J* **51**, 604-616.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T.und Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**, 563-575.
- Hu, C.D., Chinenov, Y.und Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798.
- Huang, Y., Li, H., Hutchison, C.E., Laskey, J.und Kieber, J.J.** (2003). Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J* **33**, 221-233.
- Huffaker, A.und Ryan, C.A.** (2007). Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 10732-10736.
- Huffaker, A., Pearce, G.und Ryan, C.A.** (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10098-10103.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K.und 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.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S.Q., Hirt, H., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Ellis, B.E., Morris, P.C., Innes, R.W., Ecker, J.R., Scheel, D., Klessig, D.F., Machida, Y., Mundy, J., Ohashi, Y.und Walker, J.C.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ingle, R.A., Carstens, M.und Denby, K.J.** (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* **28**, 880-889.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P.und Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* **19**, 4004-4014.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H.,**

- Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A.und Buell, C.R.** (2005). Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol* **187**, 6488-6498.
- Jones, J.D.und Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Joo, S., Liu, Y., Lueth, A.und Zhang, S.** (2008). MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* **54**, 129-140.
- Kamoun, S., Huitema, E.und Vleeshouwers, V.G.** (1999). Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response? *Trends Plant Sci* **4**, 196-200.
- Kanaoka, M.M., Pillitteri, L.J., Fujii, H., Yoshida, Y., Bogenschutz, N.L., Takabayashi, J., Zhu, J.K.und Torii, K.U.** (2008). SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to arabidopsis stomatal differentiation. *Plant Cell* **20**, 1775-1785.
- Karpova, T.und McNally, J.G.** (2006). Detecting protein-protein interactions with CFP-YFP FRET by acceptor photobleaching. *Curr Protoc Cytom Chapter 12*, Unit12 17.
- Karpova, T.S., Baumann, C.T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G.L.und McNally, J.G.** (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* **209**, 56-70.
- Katagiri, F., Thilmony, R.und He, S.Y.** (2002). The *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists.
- Katou, S., Yoshioka, H., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J.D., Mori, H.und Doke, N.** (2005). Involvement of PPS3 phosphorylated by elicitor-responsive mitogen-activated protein kinases in the regulation of plant cell death. *Plant Physiol* **139**, 1914-1926.
- Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A.und Ecker, J.R.** (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**, 427-441.
- Kim, C.Y., Liu, Y., Thorne, E.T., Yang, H., Fukushige, H., Gassmann, W., Hildebrand, D., Sharp, R.E.und Zhang, S.** (2003). Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* **15**, 2707-2718.
- Kinoshita, E., Yamada, A., Takeda, H., Kinoshita-Kikuta, E.und Koike, T.** (2005). Novel immobilized zinc(II) affinity chromatography for phosphopeptides and phosphorylated proteins. *J Sep Sci* **28**, 155-162.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B.und Fritig, B.** (2000). Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol* **124**, 1027-1038.
- Koch, E.und Slusarenko, A.** (1990). Arabidopsis is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell* **2**, 437-445.
- Konishi, M.und Yanagisawa, S.** (2008). Ethylene signaling in Arabidopsis involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3. *Plant J* **55**, 821-831.

- Kovtun, Y., Chiu, W.L., Tena, G.und Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2940-2945.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J.und 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.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T.und Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.
- La Camera, S., Geoffroy, P., Samaha, H., Ndiaye, A., Rahim, G., Legrand, M.und Heitz, T.** (2005). A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. *Plant J* **44**, 810-825.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lampard, G.R., Macalister, C.A.und Bergmann, D.C.** (2008). Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* **322**, 1113-1116.
- Lee, J., Rudd, J.J., Macioszek, V.K.und Scheel, D.** (2004). Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem* **279**, 22440-22448.
- Lee, S., Wang, S., Sritubtim, S., Chen, J.und Ellis, B.** (2008). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *The Plant Journal* **Accepted Article**.
- Lipka, U., Fuchs, R.und Lipka, V.** (2008). Arabidopsis non-host resistance to powdery mildews. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 404-411.
- Liu, Y.und 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.
- Logemann, E., Birkenbihl, R.P., Ulker, B.und Somssich, I.E.** (2006). An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* **2**, 16.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sanchez-Serrano, J.J.und Solano, R.** (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* **15**, 165-178.
- Lund, S.T., Stall, R.E.und Klee, H.J.** (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**, 371-382.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A.und Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-754.
- Martin, T., Wöhner, R.V., Hummel, S., Willmitzer, L.und Frommer, W.B.** (1992). The GUS reporter System as a tool to study plant gene expression. *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a reporter of Gene Expression*.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K.und He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**, 969-980.
- Menges, M., Doczi, R., Okresz, L., Morandini, P., Mizzi, L., Soloviev, M., Murray, J.A.und Bogre, L.** (2008). Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *New Phytol* **179**, 643-662.

- Menke, F.L., Kang, H.G., Chen, Z., Park, J.M., Kumar, D.und Klessig, D.F.** (2005). Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 1027-1034.
- Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Marechal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V., Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernandez, E., Fukuzawa, H., Gonzalez-Ballester, D., Gonzalez-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riano-Pachon, D.M., Riekhof, W., Rymarquis, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martinez, D., Ngau, W.C., Ollilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szajkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S.und Grossman, A.R.** (2007). The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* **318**, 245-250.
- Merkouropoulos, G., Andreasson, E., Hess, D., Boller, T.und Peck, S.C.** (2008). An Arabidopsis protein phosphorylated in response to microbial elicitation, AtPHOS32, is a substrate of MAP kinases 3 and 6. *J Biol Chem* **283**, 10493-10499.
- Meszaros, T., Helfer, A., Hatzimasoura, E., Magyar, Z., Serazetdinova, L., Rios, G., Bardocz, V., Teige, M., Koncz, C., Peck, S.und Bögre, L.** (2006). The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J* **48**, 485-498.
- Meyer, A., Puhler, A.und 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.
- Monroe-Augustus, M., Zolman, B.K.und Bartel, B.** (2003). IBR5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 2979-2991.
- Moon, H., Lee, B., Choi, G., Shin, D., Prasad, D.T., Lee, O., Kwak, S.S., Kim, D.H., Nam, J., Bahk, J., Hong, J.C., Lee, S.Y., Cho, M.J., Lim, C.O.und Yun, D.J.** (2003). NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 358-363.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T.und Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng* **104**, 34-41.

- Nakano, T., Suzuki, K., Fujimura, T. und Shinshi, H.** (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in Arabidopsis and rice. *Plant Physiol* **140**, 411-432.
- Nürnberger, T. und Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 318-324.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**, 249-266.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Olmedo, G., Guo, H., Gregory, B.D., Nourizadeh, S.D., Aguilar-Henonin, L., Li, H., An, F., Guzman, P. und Ecker, J.R.** (2006). ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13286-13293.
- Onate-Sanchez, L. und Singh, K.B.** (2002). Identification of Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors with distinct induction kinetics after pathogen infection. *Plant Physiol* **128**, 1313-1322.
- Onate-Sanchez, L., Anderson, J.P., Young, J. und Singh, K.B.** (2007). AtERF14, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense. *Plant Physiol* **143**, 400-409.
- Ortiz-Masia, D., Perez-Amador, M.A., Carbonell, J. und Marcote, M.J.** (2007). Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Lett* **581**, 1834-1840.
- Ouaked, F., Rozhon, W., Lecourieux, D. und Hirt, H.** (2003). A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Embo J* **22**, 1282-1288.
- Penninckx, I.A., Thomma, B.P., Buchala, A., Metraux, J.P. und 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. und 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. und Mundy, J.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Pre, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M. und Memelink, J.** (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiol* **147**, 1347-1357.
- Qiu, J.L., Zhou, L., Yun, B.W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J. und Morris, P.C.** (2008). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol* **148**, 212-222.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. und**

- Petersen, M.** (2008). Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *Embo J* **27**, 2214-2221.
- 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.und Nürnberger, T.** (2006). Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell* **18**, 3721-3744.
- Ren, D., Liu, Y., Yang, K.Y., Han, L., Mao, G., Glazebrook, J.und Zhang, S.** (2008). A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5638-5643.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K.und 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.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F.und Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press **2nd edition**.
- Schägger, H.und von Jagow, G.** (1987). Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of Proteins in the Range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Schaller, G.E.und Kieber, J.J.** (2002). Ethylene. *The Arabidopsis Book*, American Society of Plant Biologists.
- Schuhegger, R., Nafisi, M., Mansourova, M., Petersen, B.L., Olsen, C.E., Svatos, A., Halkier, B.A.und Glawischnig, E.** (2006). CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**, 1248-1254.
- Schweighofer, A., Hirt, H.und Meskiene, I.** (2004). Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends Plant Sci* **9**, 236-243.
- Schweighofer, A., Kazanaviciute, V., Scheikl, E., Teige, M., Doczi, R., Hirt, H., Schwanninger, M., Kant, M., Schuurink, R., Mauch, F., Buchala, A., Cardinale, F.und Meskiene, I.** (2007). The PP2C-type phosphatase AP2C1, which negatively regulates MPK4 and MPK6, modulates innate immunity, jasmonic acid, and ethylene levels in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2213-2224.
- Schwessinger, B.und Zipfel, C.** (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol* **11**, 389-395.
- Seki, M., Narusaka, M., Kamiya, A., Ishida, J., Satou, M., Sakurai, T., Nakajima, M., Enju, A., Akiyama, K., Oono, Y., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Kawai, J., Carninci, P., Itoh, M., Ishii, Y., Arakawa, T., Shibata, K., Shinagawa, A.und Shinozaki, K.** (2002). Functional annotation of a full-length Arabidopsis cDNA collection. *Science* **296**, 141-145.
- Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H.und Ohashi, Y.** (1995). Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* **270**, 1988-1992.
- Shan, L., He, P.und Sheen, J.** (2007). Intercepting host MAPK signaling cascades by bacterial type III effectors. *Cell Host Microbe* **1**, 167-174.
- Simonich, M.T.und Innes, R.W.** (1995). A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for the avrPph3 gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 637-640.
- Sineshchekov, V.und Fankhauser, C.** (2004). PKS1 and PKS2 affect the phyA state in etiolated Arabidopsis seedlings. *Photochem Photobiol Sci* **3**, 608-611.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F.und Krysan, P.J.** (2007). MEKK1 is required for

- flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol* **143**, 661-669.
- Takahashi, F., Yoshida, R., Ichimura, K., Mizoguchi, T., Seo, S., Yonezawa, M., Maruyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. und 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.
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J.L. und Hirt, H.** (2004). The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Mol Cell* **15**, 141-152.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F. und Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of Arabidopsis to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**, 1093-1102.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P. und 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.
- Valentin, G., Verheggen, C., Piolot, T., Neel, H., Coppey-Moisan, M. und Bertrand, E.** (2005). Photoconversion of YFP into a CFP-like species during acceptor photobleaching FRET experiments. *Nat Methods* **2**, 801.
- Veß, C.** (2004). Dissertation: Identifizierung und Charakterisierung schwermetallregulierter Gene im Metallophyten *Arabidopsis halleri* (L.) und in *Arabidopsis thaliana* (L.). Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Walker-Simmons, M., Hadwiger, L. und Ryan, C.A.** (1983). Chitosans and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea pods and antinutrient proteinase inhibitors in tomato leaves. *Biochem Biophys Res Commun* **110**, 194-199.
- Waller, F., Muller, A., Chung, K.M., Yap, Y.K., Nakamura, K., Weiler, E. und Sano, H.** (2006). Expression of a WIPK-activated transcription factor results in increase of endogenous salicylic acid and pathogen resistance in tobacco plants. *Plant Cell Physiol* **47**, 1169-1174.
- Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. und Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**, 428-438.
- Wan, J., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G. und Stacey, G.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **20**, 471-481.
- Wang, G., Ellendorff, U., Kemp, B., Mansfield, J.W., Forsyth, A., Mitchell, K., Bastas, K., Liu, C.M., Woods-Tor, A., Zipfel, C., de Wit, P.J., Jones, J.D., Tor, M. und Thomma, B.P.** (2008). A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* **147**, 503-517.
- Wang, H., Ngwenyama, N., Liu, Y., Walker, J.C. und Zhang, S.** (2007). Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Weigel, D. und Glazebrook, J.** (2002). *Arabidopsis: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P.,**

- Gleave, A.P., Green, A.G.und Waterhouse, P.M.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J* **27**, 581-590.
- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F.und Staskawicz, B.J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell* **3**, 49-59.
- Witte, C.P., Noel, L.D., Gielbert, J., Parker, J.E.und Romeis, T.** (2004). Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol Biol* **55**, 135-147.
- Xu, J., Li, Y., Wang, Y., Liu, H., Lei, L., Yang, H., Liu, G.und Ren, D.** (2008). Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *J Biol Chem* **283**, 26996-27006.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., Tena, G., Xiong, Y.und Sheen, J.** (2008). Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* **451**, 789-795.
- Zhang, S.und Klessig, D.F.** (1998). Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7433-7438.
- Zhang, S.und Klessig, D.F.** (2000). Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. *Results Probl Cell Differ* **27**, 65-84.
- Zhang, S., Liu, Y.und Klessig, D.F.** (2000). Multiple levels of tobacco WIPK activation during the induction of cell death by fungal elicitors. *Plant J* **23**, 339-347.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G.und 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.und Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.



## 7 Anhang

### *Eidesstattliche Erklärung*

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt habe. Andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel habe ich nicht benutzt. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle, den 15.01.2008

---

Gerit Bethke

## Lebenslauf

### **Persönliche Informationen:**

Name: Gerit Bethke  
Geb.: 18. August 1980 in Ilmenau  
Familienstand: ledig  
Geschlecht: weiblich  
Nationalität: deutsch  
Anschrift: August-Bebel-Str.52, 06108 Halle

### **Werdegang:**

09/1987-05/1999 Schulausbildung (Grundschule und Gymnasium)

09/1995-05/1999 Besuch der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Spezialklasse am Goethegymnasium Ilmenau

05/1999 Abitur am Goethegymnasium Ilmenau

10/1999-03/2000 Biologiestudium an der Justus-Liebig-Universität Gießen

04/2000-12/2004 Fortsetzung des Biologiestudiums an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

01/2004-12/2004 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe Zelluläre Signaltransduktion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle unter der Anleitung von Prof. Dr. D. Scheel und Dr. J. Lee  
Thema der Diplomarbeit: „Analyse der Protein-Protein-Interaktionen zwischen Komponenten aus *Arabidopsis* MAP-Kinase-Kaskaden“

01/2005-01/2009      Promotion in der Arbeitsgruppe Zelluläre Signaltransduktion am  
Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle unter der Anleitung  
von Prof. Dr. D. Scheel und Dr. J. Lee

**Publikationen:**

Bethke, G.; Unthan, T.; Uhrig, J.; Pöschl, Y.; Gust, A.; Scheel, D.; Lee, J. (2009). Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Manuskript in Vorbereitung*

Widjaja, I.; Bethke, G.; Lassowskat, I.; Naumann, K.; Dangl, J.; Scheel, D., Lee, J. (2009). A protein Phosphatase 2C, specifically induced by avrRpm1, regulates defence responses in *Arabidopsis*. *Manuskript in Vorbereitung*

Halle, den 15.01.2009

---

Gerit Bethke

## *Danksagung*

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel und Dr. Justin Lee für die Überlassung dieses spannenden, mitunter kniffligen Themas, die wirklich exzellente Betreuung, die vielen guten Ideen und die stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Gutachtern für die Übernahme der Gutachten bedanken.

Ein Dank auch an alle externen und internen Kooperationspartner, die uns z.T. unveröffentlichte Pflanzenlinien und Vektoren zur Verfügung gestellt haben und so die Bearbeitung des Themas wesentlich beschleunigten.

Weiterhin möchte ich mich bei der ganzen Abteilung „Streß- und Entwicklungsbiologie“ am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle für die gute Zusammenarbeit und die nette, entspannte Arbeitsatmosphäre bedanken (besonders die Kaffeepausen haben mich immer motiviert).

Danke an Tino für die Hilfe bei den Mikroarrays, an Ivy für die Unterstützung bei den Ethylenmessungen, an Annegret, Bettina, Steffi, Desy, Kai, Lennart, Lore, Simone und alle die ich vergessen habe für methodische Hilfestellungen, ständige Diskussionsbereitschaft und Beratungen aller Art.

Danke für die technische Unterstützung durch Frau Christel Rülke, Frau Jutta Elster und Frau Sylvia Krüger.

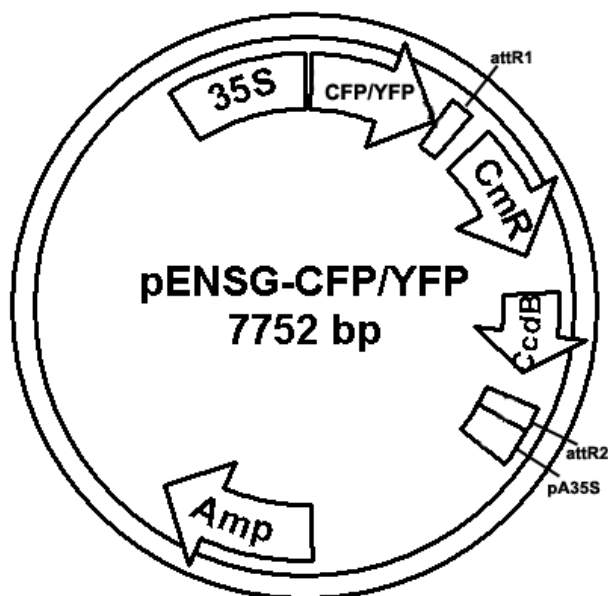
Ein besonderer Dank auch an die technischen Mitarbeiter des IPB, die Gärtner, unsere Handwerker und unseren Systemadministrator Herrn Bartz, die viele Experimente retteten indem sie alle kaputtgegangenen Geräte und Computer/Dateien äußerst kurzfristig reparierten.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freuden dafür danken, daß sie immer Verständnis hatten, wenn ich mal wieder länger im Labor gebraucht habe.....

**-DANKE EUCH ALLEN-**

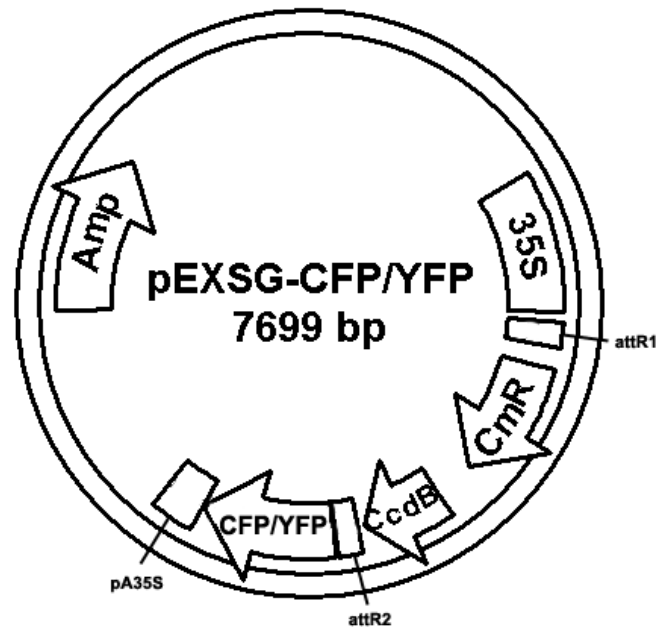
## Vektorkarten

## 7.1 pENSG-CFP/YFP



	<u>Position im Vektor</u>
Amp (Ampicillinresistenzgen)	3841bp – 4701bp
35S (35S-Promotor vom Blumenkohlmosaikvirus)	7055bp – 1bp
CFP/YFP	31bp – 747bp
attR1	760bp – 884bp
CmR (Chloramphenicolresistenzgen)	993bp – 1652bp
CcdB –Gen	1867bp – 2299bp
attR2	2447bp – 2571bp
pA35S (35S-Terminationssequenz)	2542bp – 2759bp

## 7.2 pEXSG-CFP/YFP



	<u>Position im Vektor</u>
Amp (Ampicillinresistenzgen)	5745bp – 6605bp
35S (35S-Promotor vom Blumenkohlmosaikvirus)	1260bp – 1958bp
attR1	2010bp – 2027bp
CmR (Chloramphenicolresistenzgen)	2243bp – 2902bp
CcdB –Gen	3117bp – 3549bp
attR2	3590bp – 3714bp
CFP/YFP	3722bp – 4441bp
pA35S (35S-Terminationssequenz)	4446bp – 4663bp

### 7.3 Primerliste

<b>Genspezifische Primer für die Klonierung in pDONR201</b>	
<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz Primer in 5'-3'-Richtung</b>
<b>Allgemeine Gateway-Adapter-Primer</b>	
attB1	ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg ct
attB2	ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gt
<b>Genspezifische Primer für die Klonierung in pDONR221</b>	
MPK6-STOP-rev	aga aag ctg ggt ctt gct gat att ctg g
MKK4-fwd	aaa aag cag gct tca tga gac cga ttc aat c
MKK4-STOP-rev	aga aag ctg ggt ctg tgg ttg gag aag ac
Prolinr. Prot-fwd	aa aaa gca ggc ttc atg tcg acg acg atg aag aga
Prolinr. Prot-rev	a gaa agc tgg gtc cta aac cgg aac aaa cgg tgg
VQ-Protein-fwd	aa aaa gca ggc ttc atg gag aat tca ccg aga tac
VQ-Protei-rev	a gaa agc tgg gtc tca aga agt aga agc tga tga
MADS-Box Prot.-fwd	aa aaa gca ggc ttc atg agg ggg aag atg aag tta
MADS-Box Prot.-rev	a gaa agc tgg gtc cta gag atc att gat gat gtt ag
VIP1-fwd	aa aaa gca ggc ttc atg gaa gga gga aga gga
VIP1-rev	a gaa agc tgg gtc tca gcc tct ctt ggt gaa atc
NDPK-fwd	aa aaa gca ggc ttc atg gtg gga gcg act gta gtt agt
NDPK-rev	a gaa agc tgg gtc tca ctc cct tag cca tgt agc tag
<b>Primer für die Klonierung von ERF104 in pGEX-5X-3</b>	
Sall-ERF104-fwd	aa gtc gac atg gca act aaa caa gaa
NotI-ERF104-rev	aag cgg ccg ctt aag tga cgg aga taa cgg
<b>Primer für die sequenzspezifische Mutagenese</b>	
MPK6KR-fwd	cta acg aga gcg ttg cga tta gga aaa ttg cta acg ctt ttg ac
MPK6KR-rev	gtc aaa agc gtt agc aat ttt cct aat cgc aac gct ctc gtt ag
MPK6AEF-fwd	gag agt gat ttc atg gct gaa ttt gtt gtc acg aga tgg
MPK6AEF-rev	cca tct cgt gac aac aaa ttc agc cat gaa atc act ctc
ERF104m-fwd	gt att cct ccg tta gct ccg acg gct ccc aac ttt tcc g
ERF104m-rev	c gga aaa gtt ggg agc cgt cgg agc taa cgg agg aat ac