

Hydroxyzimtsäureamide als Abwehrstoffe gegen *Phytophthora infestans*
in *Arabidopsis thaliana* und *Solanum tuberosum*

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

vorgelegt von

Frau Diplom-Biochemikerin

Melanie Dobritsch

geboren am 04.02.1983 in Leisnig

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Ingo Heilmann (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Felix Mauch (Universität Fribourg; Schweiz)

Datum der Verteidigung: 24.05.2016

i. Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| i. Inhaltsverzeichnis..... | i |
| ii. Abkürzungsverzeichnis..... | vi |
| 1. Einleitung..... | 1 |
| 1.1. <i>Solanum tuberosum</i> | 1 |
| 1.2. <i>Phytophthora infestans</i> | 2 |
| 1.3. Pflanzliche Immunantwort..... | 4 |
| 1.3.1. Nichtwirts-Resistenz..... | 8 |
| 1.4. Immunabwehr an der Zellperipherie in Pflanzen..... | 11 |
| 1.4.1. Chemische Abwehr in <i>S. tuberosum</i> gegen <i>P. infestans</i> | 16 |
| 1.4.2. Hydroxyzimtsäureamide..... | 17 |
| 1.5. Acyltransferasen..... | 23 |
| 1.5.1. BAHD-Acyltransferasen..... | 23 |
| 1.5.2. GCN5-Acyltransferasen..... | 24 |
| 1.6. Zielstellung der Arbeit..... | 26 |
| 2.1.1. Pflanzen..... | 27 |
| 2.1.2. Pathogen..... | 27 |
| 2.1.3. Bakterien..... | 28 |
| 2.1.4. Chemikalien..... | 28 |
| 2.1.5. Medien..... | 28 |
| 2.2.1. Nukleinsäuren-Isolierungen..... | 30 |
| 2.2.2. Southern-Blot für Southernhybridisierung..... | 31 |
| 2.2.3. Northern-Blot für Northernhybridisierung..... | 32 |
| 2.2.4. Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Hybridisierung..... | 32 |
| 2.2.5. Waschen der Nylonmembran und Storage Phospho-Screen – Analyse..... | 32 |
| 2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)..... | 32 |
| 2.2.7. Restriktionsverdau..... | 34 |
| 2.2.8. Kreuzung der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten <i>pen2</i> und <i>mate1</i> | 34 |
| 2.2.9. Genotypisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten..... | 35 |
| 2.2.10. Klonierungen..... | 35 |
| 2.2.11. Transformation von kompetenten <i>A. tumefaciens</i> AGL-0-Zellen..... | 39 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.2.12. | Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>A. tumefaciens</i> | 39 |
| 2.2.13. | Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mit <i>A. tumefaciens</i> | 40 |
| 2.2.14. | Transiente Transformation von Tabakpflanzen mit <i>A. tumefaciens</i> | 41 |
| 2.2.15. | Transformation von Arabidopsis-Protoplasten..... | 41 |
| 2.2.16. | Konfokale Laserscan-Mikroskopie..... | 41 |
| 2.2.17. | Zoosporengewinnung von <i>P. infestans</i> | 41 |
| 2.2.18. | Gewinnung von <i>P.-infestans</i> -Sporangien..... | 42 |
| 2.2.19. | Kulturführung der Kartoffel-Meristem-Sterilkultur | 42 |
| 2.2.20. | Probennahme für LC/MS/MS-Messungen von <i>A. thaliana</i> | 42 |
| 2.2.21. | Probennahme für LC/MS/MS-Messungen von <i>S. tuberosum</i> | 43 |
| 2.2.22. | LC/MS/MS-Messungen | 43 |
| 2.2.23. | Identifizierung von Metaboliten | 45 |
| 2.2.24. | Relative Quantifizierung von <i>P.-infestans</i> -Biomasse..... | 47 |
| 2.2.25. | <i>In vitro</i> -Inhibierungsassay von <i>p-Cumaroylagmatin</i> auf <i>P.-infestans</i> - Myzelwachstum...47 | |
| 2.2.26. | <i>P.-infestans</i> -Zoosporen Inhibierungs-Assay..... | 48 |
| 2.3. | Statistische Signifikanzberechnungen von Messwerten..... | 48 |
| 3. | Ergebnisse | 50 |
| 3.1. | Expression von <i>AtACT1</i> und <i>AtMATE</i> in <i>A. thaliana</i> | 50 |
| 3.2. | Subzelluläre Lokalisation von <i>AtACT1</i> in <i>A. thaliana</i> | 51 |
| 3.2.1. | Transiente <i>AtACT1</i> -YFP Expression in <i>Nicotiana benthamiana</i> | 51 |
| 3.2.2. | Transiente <i>AtACT1</i> -YFP Expression in Zellkulturprotoplasten | 52 |
| 3.3. | Charakterisierung von <i>AtACT1</i> - und <i>AtMATE</i> - <i>knock out</i> -Linien | 53 |
| 3.3.1. | <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in Blättern von <i>A.-thaliana-knock-out</i> -Linien..... | 54 |
| 3.3.2. | <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in Tropfen von <i>A.-thaliana-knock-out</i> -Linien | 56 |
| 3.4. | Die Rolle von <i>p</i> -Cumaroylagmatin in der Abwehr gegen <i>P. infestans</i> | 60 |
| 3.4.1. | <i>In-vitro</i> -Inhibierungstest von <i>p</i> -Cumaroylagmatin auf das Myzelwachstum von <i>P. infestans</i> 60 | |
| 3.4.2. | <i>In-vitro</i> -Inhibierungstest von <i>p</i> -Cumaroylagmatin auf die Zoosporenkeimung von <i>P. infestans</i> 61 | |
| 3.4.3. | <i>In-vitro</i> -Inhibierungstest von Inokulierungstropfen auf das Myzelwachstum von <i>P. infestans</i> 62 | |
| 3.4.4. | <i>In-vitro</i> -Inhibierungstest von Inokulierungstropfen auf die Zoosporenkeimung von <i>P. infestans</i> | 64 |

| | | |
|---------|--|----|
| 3.5. | Vergleich <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in <i>S. tuberosum</i> (Wildtyp) und <i>A. thaliana</i> (Wildtyp) | 65 |
| 3.6. | Transgene Expression von <i>AtACT1</i> in Kartoffel..... | 66 |
| 3.6.1. | Überprüfung auf T-DNA-Einbau von <i>AtACT1</i> exprimierenden transgenen Kartoffellinien..... | 66 |
| 3.6.2. | Nachweis der Expression von <i>AtACT1</i> -Transkript in transgenen Kartoffellinien. | 67 |
| 3.6.3. | Nachweis von <i>AtACT1</i> in transgenen Kartoffellinien per qRT-PCR..... | 68 |
| 3.7. | Veränderte HCAA-Gehalte in transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien ... | 69 |
| 3.8. | Gehalt an sezerniertem <i>p</i> -Cumaroylagmatin in transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 72 |
| 3.8.1. | <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Blättern von transgenen <i>AtACT1</i> -exprimierenden Kartoffellinien..... | 72 |
| 3.8.2. | <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Tropfen auf transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 73 |
| 3.9. | Transgene Expression von <i>AtACT1-AtMATE</i> in Kartoffel..... | 75 |
| 3.9.1. | Expression von <i>AtACT1-AtMATE</i> in transgenen Kartoffellinien..... | 76 |
| 3.10. | Morphologischer Phänotyp der transgenen p35S- <i>AtACT1</i> -p35S- <i>AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 78 |
| 3.11. | Gehalt an <i>p</i> -Cumaroylagmatin in transgenen <i>AtACT1-AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 79 |
| 3.11.1. | <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Blattscheiben transgener <i>AtACT1-AtMATE</i> -exprimierenden Kartoffellinien..... | 79 |
| 3.11.2. | Extrazelluläre <i>p</i> -Cumaroylagmatin transgener <i>AtACT1-AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 81 |
| 3.12. | Relative Quantifizierung von <i>P. infestans</i> -Biomasse in transgenen Kartoffelpflanzen..... | 82 |
| 3.13. | <i>In-vitro</i> -Inhibierungstest von <i>p</i> -Cumaroylagmatin auf die Zoosporenkeimung von <i>P. infestans</i> | 84 |
| 4. | Diskussion..... | 86 |
| 4.1. | Expression von <i>AtACT1</i> und <i>AtMATE</i> in <i>A. thaliana</i> unter Stress..... | 86 |
| 4.2. | Subzelluläre Lokalisation von <i>AtACT1</i> und <i>AtMATE</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i> | 88 |
| 4.3. | Funktionelle Analyse von <i>AtACT1</i> und <i>AtMATE</i> in <i>A. thaliana</i> | 89 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.4. | Die Rolle von <i>AtACT1</i> und <i>AtMATE</i> in der Abwehr gegen <i>P. infestans</i> | 91 |
| 4.5. | Vergleich der <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in <i>S. tuberosum</i> (Wildtyp) und <i>A. thaliana</i> (Wildtyp) | 93 |
| 4.6. | Veränderte HCAA-Gehalte in transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 94 |
| 4.7. | Sezernierte <i>p</i> -Cumaroylagmatin-Gehalte in transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 97 |
| 4.8. | Transgene Expression von <i>AtMATE</i> in Kartoffel..... | 98 |
| 4.9. | Morphologischer Phänotyp der transgenen <i>AtACT1-AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien unter Kontrolle des 35S-Promotor | 98 |
| 4.10. | <i>p</i> -Cumaroylagmatin-Gehalte in transgenen <i>AtACT1-AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 99 |
| 4.11. | Untersuchungen zur Resistenz gegen <i>P. infestans</i> der transgenen Kartoffelpflanzen | 101 |
| 5. | Zusammenfassung | 105 |
| 6. | Literaturverzeichnis | 107 |
| 7. | Anhang..... | 132 |
| 7.1. | Gensequenzen | 132 |
| 7.1.1. | <i>AtACT1</i> – <i>At5g61160</i> cDNA | 132 |
| 7.1.2. | <i>AtMATE</i> – <i>At3g23550</i> cDNA | 132 |
| 7.1.3. | <i>AtMATE</i> genomisch – <i>At3g23550</i> genomische DNA | 133 |
| 7.1.4. | <i>AtMATE</i> intron – <i>At3g23550</i> cDNA mit erstem Intron..... | 134 |
| 7.2. | Vektorkarten | 136 |
| 7.3. | Primer..... | 138 |
| 7.4. | Sonden für <i>real time</i> -PCR | 141 |
| 7.5. | Sonden für Northernblot- und Southernblot Analysen | 143 |
| 7.6. | Ergebnisse | 149 |
| 7.6.1. | EIC und MS ² -Spektrum von <i>p</i> -Cumaroylagmatin | 149 |
| 7.6.2. | <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in Blättern von <i>A. thaliana knock out</i> -Linien..... | 150 |
| 7.6.3. | <i>p</i> -Cumaroylagmatingehalte in Tropfen von <i>A. thaliana knock out</i> -Linien | 151 |
| 7.6.4. | <i>p</i> -Cumaroylputreszin-Gehalte 3 dpi <i>P. infestans</i> in <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffelpflanzen..... | 152 |

| | |
|---|-----|
| 7.6.5. <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Tropfen auf transgenen <i>AtACT1</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 156 |
| 7.6.6. Nachweis der Expression von <i>AtMATE</i> -Transkript in transgenen Kartoffellinien 156 | |
| 7.6.7. <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Tropfen auf transgenen <i>AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 157 |
| 7.6.8. <i>p</i> -Cumaroylagmatin in Blättern von transgenen <i>AtMATE</i> exprimierenden Kartoffellinien..... | 158 |
| 7.6.9. <i>P. infestans</i> -Biomasse in transgenen <i>AtMATE</i> exprimierenden Kartoffelpflanzen | 158 |
| 8. Danksagung..... | 160 |
| 9. Erklärung..... | 162 |
| 10. Lebenslauf..... | 163 |
| 10.1. Persönliche Daten..... | 163 |
| 10.2. Ausbildung und beruflicher Werdegang..... | 163 |
| 10.3. Studium und Schulausbildung..... | 164 |
| 11. Publikationen und Vorträge..... | 165 |

ii. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|--|
| Ω | 5'-untranslatierte Sequenz (Omega-Sequenz) |
| (p)35S (t) | (Promoter) engl. <i>Cauliflower Mosaic Virus</i> - 35S-(Terminator) |
| ACT | Agmatin-Cumaroyltransferase |
| AS | Aminosäure(n) |
| BAHD | engl. <u>B</u> EAT, <i>benzylalcohol acetyltransferase</i> ; <u>A</u> HCT, <i>anthocyanin-O-hydroxycinnamoyl-acetyltransferase</i> ; <u>H</u> CBT, <i>hydroxycinnamoyl/ benzoyl-CoA-anthranilate-N-hydroxycinna-moyl/ benzoyl-transferase</i> , <u>D</u> AT, <i>deacetylindoline-acetyltransferase</i>), GCN5- (<u>G</u> eneral <u>C</u> ontrol of <u>N</u> onrepressed <u>5</u> -related N-acyltransferasen ; GNAT) |
| bp | Basenpaare |
| cDNA | engl. <i>complementary DNA</i> |
| Ct | engl. <i>threshold cycle</i> CHS |
| DNase | Desoxyribonuklease |
| dNTP | Desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| dpi | engl. <i>day(s) post infection</i> (Tag(e) nach Infektion) |
| <i>et al.</i> | lat. <i>und andere</i> |
| EV | Leervektorkontrolle |
| ESI | Elektronensprayionisierung |
| Exp. | Experiment |
| flg22 | 22 aa langes Peptid des bakteriellen Proteins Flagellin |
| gFG | Gramm Frischgewicht |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| h | Stunde(n) |
| HR | engl. <i>hypersensitive response</i> (Hypersensitive Reaktion) |
| JA | Jasmonsäure |
| Kan | Kanamycin |
| kb | Kilobasenpaare |
| L3E | engl. <i>linker element</i> für drei klonierte Elemente |
| MATE | engl. <i>multidrug and toxic extrusion transporter</i> |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein Kinase |
| MS | Massenspektrometer |

| | |
|----------------|--|
| n.d. | nicht detektierbar |
| nos p/t | Nopalinsynthase-Promoter/-Terminator |
| ocs t | Octopaminsynthase-Terminator |
| PAMP | engl. <i>pathogen-associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziiertes Molekülmuster) |
| PCR | Polymerasekettenreaktion |
| QTOF | engl. <i>quadrupole time-of-flight</i> |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| RNase | Ribonuklease |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| ROS | engl. <i>reactive oxygen species</i> (reaktive Sauerstoffspezies) |
| RT | Reverse Transkriptase |
| rt | Retentionszeit |
| SA | Salizylsäure |
| SEM | engl. <i>standard error of the mean</i> |
| TAE | Tris, Acetat, EDTA |
| T _m | Schmelztemperatur |
| Tris | Tri-(hydroxymethyl) aminomethan |
| UHPLC | engl. <i>ultra high-performance liquid chromatography</i> |
| WT | Wildtyp |

1. Einleitung

Die Bevölkerung der Erde nimmt stetig zu und hat sich allein von 1970 bis 2014 von 3,7 Mrd. Menschen auf 7,2 Mrd. verdoppelt (Datenreport 2014 der Stiftung Weltbevölkerung). Trotz einer Steigerung der Ernten in der Landwirtschaft um 47% zwischen 1985 und 2005 (Foley *et al.*, 2011), kann die immer weiter steigende Bevölkerung immer weniger ernährt werden. Da die auf der Erde verfügbaren landwirtschaftlich nutzbare Flächen nicht unendlich erweiterbar sind, müssen die Ernteerträge unserer Nutzpflanzen wie Reis, Soja, Kartoffel, Weizen gesteigert werden. Um die Produktivität dieser Pflanzen auf Höchstleistungen zu steigern, müssen Abwehr-mechanismen in Pflanzen weiter erforscht und verstanden werden, um Nutzpflanzen die Möglichkeit zu geben, sich gegen Pathogene zu wehren und Ernteverluste zu verringern.

1.1. *Solanum tuberosum*

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), aus der Familie der Nachtschattengewächse (Solanaceae), gehört zu den fünf wichtigsten Nutzpflanzen, die weltweit konsumiert werden (Lovat *et al.*, 2015). Die Pflanze stammt ursprünglich aus Südamerika und kam im 16. Jh. über den Seeweg nach Europa, wobei nicht bekannt ist, wann und durch wen genau (Ames und Spooner, 2008). Kartoffelpflanzen haben 12 Chromosomen und sind diploid, tetraploid oder hexaploid. Die kultivierten Sorten sind tetraploid (Schöber-Butin, 2001). Seit 2011 ist das Genom der Kartoffelpflanze sequenziert und 39.031 proteinkodierende Gene annotiert, wovon 816 Resistenzgen-Kandidaten sind (Consortium, 2011; Hirsch *et al.*, 2014). *Solanum tuberosum* ist in ihrer Umwelt einer Reihe von Pflanzenpathogenen ausgesetzt. Die häufigste Krankheit von Kartoffelpflanzen ist die Kraut- und Knollenfäule, ausgelöst durch *Phytophthora infestans* (1.1.). Zudem sind viele Kartoffelsorten anfällig gegen Pilze, wie dem nekrotrophen Pilz *Alternaria solani*, der die Dürrefleckenkrankheit bei Kartoffel hervorruft, bakterielle Erreger wie *Pectobacterium carotovora*, Erreger der Schwarzbeinigkeit und Viren wie den Blattrollkrankheitserreger Blattrollvirus PLRV (*potato leafroll virus*). Hinzu kommen Insekten wie der Kartoffelkäfer *Leptinotarsa decemlineata* (Zellner und Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL), 2013).

1.2. *Phytophthora infestans*

Phytophthora infestans (MONT.) DE BARY ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule in *Solanum tuberosum* (Kartoffel) und der Kraut- und Braunfäule bei *Solanum lycopersicum* (Tomate). Das Pathogen wurde erstmals von den belgischen Botanikern und Mykologin Marie Anne Libert (1782-1865) beschrieben und als Ursache der Kraut- und Braunfäule erkannt (Schöber-Butin, 2001). *P. infestans* gehört zur Klasse der Oomyceten und wurde 1876 von Heinrich Anton De Bary (1831-1888) von der Gattung *Peronospora* in die von ihm neu aufgestellte Gattung *Phytophthora* abgegrenzt. Er gab ihm auch den heute gültigen Namen *Phytophthora* (Griechisch: *phyton* = Pflanze, *phthora* = verderben) (Schöber-Butin, 2001). Es ist bis heute nicht sicher bewiesen, ob der Ursprung des *P. infestans*, der 1845 nach Europa kam, in den Anden von Südamerika liegt oder in der Mitte von Mexiko. Nukleotid-Sequenz-Analysen, durchgeführt von Gómez-Alpizar *et al.* (2007), sprechen für die Anden-Hypothese, während die Analysen mit Mikrosatellitenmarkern und Nukleotid-Sequenzen von Yoshida *et al.* (2013) und Goss *et al.* (2014) eher für die Theorie spricht, dass der Erreger aus Zentral-Mexiko stammt. Heute, über 150 Jahre nach den ersten großen Ausbrüchen der Kraut- und Knollenfäule in Europa, ist *P. infestans* immer noch ein ernstzunehmendes Problem. In der EU werden jährlich auf einer Fläche von ca. 6 Mio. Hektar Kartoffeln angebaut. Die daraus resultierende Ernte an Kartoffelknollen entspricht einem Wert von ca. 6 Mrd. €. *P. infestans* verursacht dabei jährlich Kosten in Höhe von 1 Mrd. € durch Kontrollen und Schäden (Haverkort *et al.*, 2008). Deshalb ist die Forschung an der Kraut- und Knollenfäule immer noch ein aktuelles Thema und es wird mit großem Druck nach neuen Mechanismen gesucht, die resistente Pflanzen gegen *P. infestans* generieren sollen. Ein Indikator für die Intensität dieser Forschung sind 1230 Publikationen über *P. infestans* allein zwischen 2005 und 2014 (Kamoun *et al.*, 2015). Chemische Kontrolle durch Pflanzenschutzmittel und Fungizide stehen immer stärker in der Kritik, weil der Erreger der Kraut- und Knollenfäule zunehmend resistenter gegen diese Maßnahmen wird und der Einsatz von Chemikalien die Umwelt stark belastet (Haverkort *et al.*, 2008).

Bei anfälligen Kartoffelpflanzen ohne schützende Fungizide beginnt die Infektion durch asexuelle Sporangien, die auf das Kartoffelblatt gelangen (Judelson, 1997). Befindet sich die Sporangie in Tau- oder Wassertropfen auf dem Blatt, entlässt sie bei einem Minimum von 10-15°C zweigeißelige Zoosporen. Bei höheren Temperaturen (20-25°C) keimt die Sporangie direkt aus und bildet einen Keimhype (Fry, 2008). Die Zoosporen sind ca. 60 min bewegungsfähig, bevor sie ihre Geißeln abwerfen. Anschließend bilden sie ein

organ (Appressorium) und enzystieren, wobei ein Keimschlauch ausgebildet wird. Danach erfolgt eine Penetration der Epidermiszellwand durch die Kutikula (Nowicki *et al.*, 2012). In der Epidermiszelle bildet der Erreger Infektionsvesikel. Danach werden verzweigte Hyphen ausgebildet, die sich interzellulär ausbreiten und intrazellulär Haustorien entwickeln (Abbildung 1). Diese sogenannte biotrophe Phase des asexuellen Lebenszyklus von *P. infestans* findet in den ersten zwei Tagen nach dem ersten Kontakt zwischen Spore und Blatt statt. Äußerlich sind zu diesem Zeitpunkt noch keine Infektionssymptome zu sehen. Nach drei bis vier Tagen tritt die Infektion dann in die nekrotrophe Phase über, Zellen des zengewebes werden zerstört und braune Läsionen auf der infizierten Blattoberseite sind jetzt sichtbar. Ist die Luftfeuchtigkeit hoch genug, kann man auf der Blattunterseite einen weißen Myzelrasen sehen. Die aus dem Myzel, meist über Spaltöffnungen heraustretenden Sporenträger sind Sporangien, die auf Nachbarpflanzen übertragen werden können (moun, 2001; Judelson und Blanco, 2005; Fry, 2008; Nowicki *et al.*, 2012). Eine sexuelle Vermehrung von *P. infestans* kann nur erfolgen, wenn die Paarungstypen A1 und A2 zusammenkommen. Dann werden Oosporen, die Überdauerungsform von *P. infestans*, det. Diese können u.a. Kartoffelknollen direkt aus dem Boden heraus befallen (Schumann und Arcy, 2000; Niklaus, 2010).

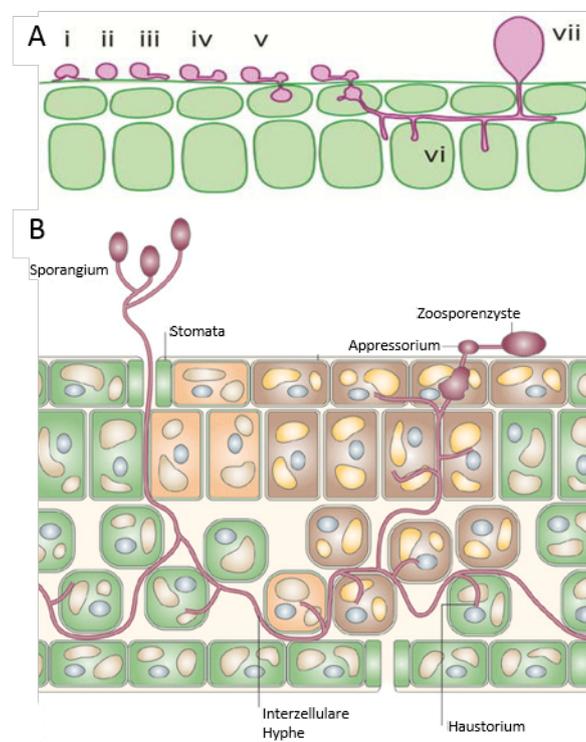


Abbildung 1 A) Schematischer Überblick einer *P. infestans*-Infektion auf einer anfälligen Pflanze. i) Zoospore auf der oberfläche, ii) Zyste, iii) keimende Zyste, iv) keimende Zyste mit Appressorium v) keimende Zyste mit um und Infektionsvesikel, vi) Haustorium, vii) Sporangie; Abbildung ist modifiziert nach Kamoun und Smart

(2005). B) Verlauf einer *P. infestans*-Infektion. Sporangium entlässt Zoosporen, die auf die Blattoberfläche gelangen, diese einzystieren und keimen aus, um ein Appressorium zu bilden. Anschließend wird die Wirtspflanzen-Epidermis durchbrochen und von dort aus über interzelluläre Hyphen besiedelt *P. infestans* das gesamte Blattgewebe. Neue Sporangien befinden sich gewöhnlich nahe der Grenze zwischen lebenden und nekrotischen Gewebe. (Abbildung modifiziert nach Judelson und Blanco (2005)).

1.3. Pflanzliche Immunantwort

Pflanzen sind wie alle terrestrischen Lebewesen abiotischen und biotischen Stressoren ausgesetzt. Zu den abiotischen Stressoren gehören z.B. Temperatur- und Klimaänderungen, Niederschlag, UV-Strahlung, Salinität, Umweltverschmutzung, zu den biotischen Stressoren gehören Bakterien, Pilze, Viren, Tiere und Unkräuter (Kitsios und Doonan, 2011). Da Pflanzen sessil sind, haben sie im Laufe der Evolution komplexe Strategien entwickelt, um Stressoren zu meiden oder zu bekämpfen. Bevor ein Pathogen eine Pflanze erfolgreich infizieren kann, müssen mehrere Barrieren überwunden werden (Mysore und Ryu, 2004). Das erste Hindernis sind passive Abwehrmechanismen wie Kutikula, Zellwände, antimikrobielle Wirkstoffe und andere Sekundärmetaboliten die konstitutiv von der jeweiligen Pflanze synthetisiert werden (Osbourn, 1996; Thordal-Christensen, 2003). So nutzen viele Pathogene natürliche Öffnungen wie Stomata, Verwundungsstellen oder Hydathoden, um einen Einlass in das Pflanzeninnere zu erlangen (Göhre und Robatzek, 2008). Pilzliche Pathogene können auch über die Sekretion von Cutinasen den Polyester Cutin auf der Pflanzenoberfläche aufbrechen (Fauth *et al.*, 1998; Hüdele *et al.*, 2005). Nicht vorkommenden Moleküle der Pathogene, die PAMPs (Pathogen assoziierte Molekül-Muster, *pathogen associated molecular patterns*) können von Pflanzen über Rezeptoren, den PRRs (PAMP erkennende Rezeptoren -Rezeptoren, *pattern recognition tor*) erkannt werden und Abwehrreaktionen der Pflanze induzieren (Brunner *et al.*, 2002; Göhre und Robatzek, 2008; Zhang *et al.*, 2010). PAMPs sind stark konservierte Moleküle wie Lipopolysaccharide, Peptidoglycan, Chitin oder Flagellin, die sich meist auf der fläche von Pathogenen befinden (Ausubel, 2005). Im Fall von *Phytophthora* erkennen silie (*Petroselinum crispum*) und Kartoffel ein 13 Aminosäure langes Peptid (Pep-13) aus einer Kalzium-abhängigen Zellwand-Transglutaminase (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002). Das Erkennen von PAMPs durch PRRs bilden eine wichtige Grundlage für eine basale Abwehr (Akira *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2013a; Macho und Zipfel, 2014; Zipfel, 2014). Pflanzliche PRRs können Rezeptor-ähnliche Kinasen (RLKs, *receptor-like kinases*), Rezeptor-ähnliche Proteine ((Prince *et al.*, 2014), auch als Leucin-reiche repeat (LRR)-

Proteine oder LRR-Rezeptor-Kinasen bezeichnet (Willmann und Nürnberger, 2012)) oder LysM-Rezeptoren (*Lysin motif*) sein (Buist et al., 2008; Sanchez-Vallet et al., 2010). Die wort auf PAMPs oder MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) wird PTI (PAMP-vermittelte Immunität, *PAMP triggered immunity*) genannt (Boller und He, 2009). Es ist die Stufe 1 des von (Jones und Dangl, 2006) aufgestellten *zigzag*-Modells der co-evolutionären Entwicklung des pflanzlichen Immunsystems und pflanzlichen Pathogenen (Abbildung 2). Erfolgreiche Pathogene können die PTI durch Effektoren unterdrücken, diese werden in die Pflanzenzelle eingeschleust und unterbinden die Erkennung von PAMPs oder deren Signalwege. Die Pflanze ist so nicht mehr in der Lage eine effektive Immunabwehr bauen, das Pathogen kann die Pflanze besiedeln. Dieser Zustand wird als ETS (Effektor-vermittelte Suszeptibilität, *effector triggered susceptibility*) bezeichnet (Doehlemann und berger, 2013) und ist nach der PTI die zweite Stufe im *zigzag*-Modell von Jones und Dangl (2006). Um die Effektoren in die Zelle zu transportieren, nutzen z.B. bakterielle pathogene Typ-III-Sekretionssysteme (Büttner und Bonas, 2003, 2006; Deslandes und Rivas, 2012). Über die Mechanismen, Effektoren filamentöser Pathogene ins Zytosol der zenzellen zu schleusen, ist sehr wenig bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass Pilze und Oomyzeten über Exo- und Endozytosemechanismen Effektoren ins Zellinnere sekretieren (Panstruga und Dodds, 2009; Petre und Kamoun, 2014). Oomyzeten besitzen zwei Klassen von zytoplasmatischen Effektoren, RXLR- und CRN-Proteine. Die Motive befinden sich N-terminal hinter dem Signalpeptid (Bozkurt *et al.*, 2012) und sind hypothetisch für den Transport ins Zellinnere mit verantwortlich, nicht jedoch für die Exozytose in die austoriale Matrix. Bhattacharjee *et al.* (2006); Whisson *et al.* (2007) und Kale und Tyler (2011) postulierten, dass die RXLR-Domäne Bindefunktion für Phosphaatidylinositol-3-Phosphat (PI3P) hat und somit über die Plasmamembran Zugang zur Wirtszelle men. Andere Arbeitsgruppen konnten die RXLR-PI3P-Bindung jedoch nicht ren. Yaeno und Shirasu(2013) diskutierten, dass der von *P. infestans* sekretierte Effektor AVR3a mit einem N-terminalen RXLR-Motiv für die Translokation in die Pflanzenzelle notwendig ist, die PI3P-Bindung aber nicht über das RXLR-Motiv sondern über eine tiv geladene Domäne mit Lysinresten, auf der C-terminalen Seite erfolgt. Allerdings ist eine Notwendigkeit der PI3P-Bindung beim Eintritt des Pathogens in die Wirtszelle sehr stritten (Bozkurt *et al.*, 2012). Wahrscheinlich sorgt die Bindung von AVR3a an PI3P für die Stabilität von AVR3a innerhalb der Wirtszelle (Yaeno und Shirasu, 2013). Die Funktionen von Pilz-und Oomyzeten-Effektoren, über die es bis heute eine Reihe an Erkenntnisse gibt,

reichen von RNA *silencing* (Qiao *et al.*, 2015), über Abbau von Makromolekülen des Wirtes (Kikot *et al.*, 2009) und Detoxifizierung von Sekundärmetaboliten (Ma *et al.*, 2015), bis zur Destabilisierung von Proteinen durch Proteasen (Tian *et al.*, 2004, 2005, 2007) oder 26S-Proteasom-vermittelten Abbau (Gilroy *et al.*, 2011; Dudler, 2013) und Inhibierung von Kinasen (Zheng *et al.*, 2014).

Effektoren lassen sich in intrazellulär und apoplastidär unterscheiden (Wang *et al.*, 2015). So wirken z.B. die Proteaseinhibitoren EPI1 und EPI10 aus *P. infestans* extrazellulär (Tian *et al.*, 2007), so wie andere Effektoren der filamentösen Pathogene, die eine supprimierende Wirkung auf pflanzliche Proteasen, Chitinasen und Glucanasen haben (Rose *et al.*, 2002; Kaschani *et al.*, 2010).

Werden die Effektoren, die die Abwehr der Pflanze inhibieren sollen, von Resistenz- (R-) Gen-kodierten R-Proteinen der Pflanze erkannt, führt dies zur nächsten Stufe des *zigzag*-Modells (Jones und Dangl, 2006) einer ETI (Effektor-vermittelte Immunität, *effector triggered immunity*). Die ETI ist meist stärker als die PTI und führt gewöhnlich zu hypersensitiven Zelltod-Antworten (HR, *hypersensitive response*) an der Infektionsstelle (Dangl und Jones, 2001; Jones und Dangl, 2006; Dodds und Rathjen, 2010; Doehlemann und Hemetsberger, 2013; Ali *et al.*, 2014). Der bereits erwähnte AVR3a-Effektor aus *P. infestans* wird vom R-Protein R3a von *S. tuberosum* erkannt (Chapman *et al.*, 2014). R3a gehört zu den NBS-LRR-Proteinen (*nucleotide binding site-leucine rich repeat*), denen eine Vielzahl von pflanzlichen R-Proteinen angehören. Die NBS-LRRs sind zytosolische Multidomänenproteine, mit einer C-terminalen CC-(*coiled-coil*) oder TIR-(*Toll-Interleukin-1 receptor*)-Domäne und einer N-terminalen LRR-(*leucine rich repeat*)-Domäne (Chisholm *et al.*, 2006; Takken und Tameling, 2009). Viele NBS-LRRs elizitieren einen programmierten Zelltod (PCD, *programmed cell death*) oder HR nach ihrer Aktivierung, um ein weiteres Ausbreiten des Pathogens im Pflanzengewebe zu verhindern (Heath, 2000a; Chapman *et al.*, 2014). R3a gehört zu den CC-NBS-LRRs und nach Erkennung von AVR3a findet eine Relokalisierung von R3a und AVR3a vom Zytosol in Vesikel und anschließend ins Endosom statt. Die Kompartimentsverlagerung ist notwendig für die HR (Engelhardt *et al.*, 2012). Neben der Lokalisierung von NBS-LRRs im Zytoplasma und Endosomen, wurden auch einige im Nukleus gefunden, wie das *A. thaliana*-NBS-LRR-Protein RRS1. Es besitzt eine C-terminale WRKY-Domäne, welche charakteristisch für Transkriptionsfaktoren ist (Takken und Tameling, 2009). NBS-LRR-Proteine an den Pathogeneffektor können direkt oder indirekt erfolgen. Bei der direkten Erkennung vermittelt der Effektor das Immunsignal über

dung zum NBS-LRR-Protein. Bei der indirekten Erkennung des Virulenzziels (*virulence gene*) über akzessorische Proteine, die ein Effektoren-Interaktionspartner sein können, spricht man vom *guard*-Modell. Erfolgt die indirekte Erkennung über eine strukturelle Mimikry eines solchen Zieles, handelt es sich um das *decoy*-Modell. Zusätzlich gibt es Effektoren, die erst an das akzessorische Protein binden und dann vom NBS-LRR-Rezeptor erkannt werden (*bait*-Modell) (Catanzariti *et al.*, 2010; Dodds und Rathjen, 2010). Diese Modelle zeigen, dass Pflanzen mit einer begrenzten Zahl an R-Proteinen auf eine Vielzahl von Virulenzeffektoren von Pathogenen reagieren können (Lorang *et al.*, 2012).

Die ETI ist nicht die letzte Stufe in der pflanzlichen Pathogenabwehr, da es sich hierbei um eine dynamische Co-Evolution der Entwicklung von neuen Effektoren auf der Pathogenseite und neuen R-Proteinen auf Pflanzenseite handelt (Jones und Dangl, 2006; Bent und Mackey, 2007; Shan *et al.*, 2007). Nach dem *zigzag*-Modell ist die pflanzliche Immunabwehr ein immer wieder kehrender Prozess erneuter Anpassung der Pflanze durch Entstehung neuer R-Gene und damit verbundener neuer Resistenzen. Auf Seiten der Pathogene, z. B. über horizontalen Gentransfer und Mutationen werden neue Effektoren „erworben“. Pritchard und Birch (2014) kritisieren viele Punkte des *zigzag*-Modells und haben ein neueres und detaillierteres Modell der Immunantwort der Pflanzen veröffentlicht, sind aber zu der Schlussfolgerung gekommen, dass das momentane Level des Wissens über die pflanzliche Immunantwort so ist, dass dynamische, quantifizierbare und vorraussagende Modelle von Wirt-Pathogen-Interaktionen immer falsch und unvollständig sein werden, aber die Basis für neue Fragen und Ansätze, die es zu überprüfen gilt, geben.

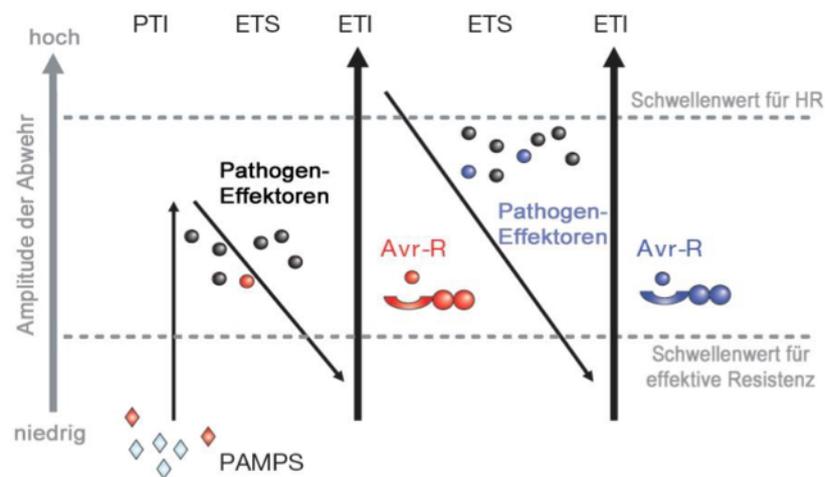


Abbildung 2: *zigzag*-Modell der Co-Evolution des pflanzlichen Immunsystems und der Pathogenvirulenz von (Jones und Dangl, 2006). Phase 1: Pflanzen erkennen PAMPS (◊, rot) durch PRR, dies vermittelt PTI. Phase 2, erfolgreiche Pathogene entlassen Effektoren (○, rot) die die PTI unterdrücken, dies führt zur ETS. Phase 3, ein Effektor wird von einem R-

Protein der Pflanze erkannt (rot), dies führt zur ETI, die stärker ist als die PTI und so eine HR hervorruft. Phase 4, Pathogen entwickelt z.B. über horizontalen Gentransfer neue Effektoren zur Repression der ETI. Ist das reich, führt es wieder zur ETS. Die Entwicklung weiterer R-Proteine ermöglicht es der Pflanze, auf den neuen oder veränderten Effektor zu reagieren und so wiederum eine erfolgreiche Abwehr zu initiieren (ETI). Diese Schritte des Erwerbs von Effektoren und R-Genen können sich wiederholen.

1.3.1. Nichtwirts-Resistenz

Verschiedene *Phytophthora*-Arten weisen einen hohen Spezialisierungsgrad auf und sind nur für eine geringe Zahl von Pflanzenarten infektiös (Kamoun, 2001; Schulze-Lefert und truga, 2011). Neben Petersilie (*P. crispum*) ist auch *A. thaliana* ein Nichtwirt für *P. infestans*. Laut Definition ist eine Nichtwirts-Resistenz die Resistenz einer Pflanzenart gegen alle Glieder einer Pathogenart (Heath, 2001). Nichtwirts-Resistenz ist die häufigste Form der Krankheitsresistenz bei Pflanzen (Heath, 2000b) und resultiert aus vielschichtigen Wehrmechanismen, die konstitutive und induzierbare Reaktionen einschließen (Lipka *et al.*, 2005; Egusa *et al.*, 2013). Die Immunabwehr von *A. thaliana* verhindert ein Besiedeln durch *P. infestans*, so dass der Oomyzeten auf *A. thaliana* seinen Lebenszyklus nicht vollenden kann. Wie bereits im vorherigen Abschnitt erläutert, spielt die PTI nach Erkennung des nicht adaptierten Pathogens *P. infestans* durch PAMPs eine wichtige Rolle in der Nichtwirts-Resistenz (Schwessinger und Zipfel, 2008). Nach einer Hypothese von (Schulze-Lefert und Panstruga, 2011) spielen neben der PTI auch Komponenten der ETI eine Rolle in der Nichtwirtsresistenz. Demnach ist die Bedeutung von PTI und ETI für die Resistenz größer oder kleiner in Abhängigkeit der phylogenetischen Verwandtschaft zwischen Nichtwirt und Pathogen. Das heißt, je größer der evolutionäre Abstand zwischen der Wirts- und Nichtwirts-Pflanzenart ist, um so wichtiger ist die Rolle der PTI in der Resistenz zwischen Pathogen und Pflanze und umgekehrt. Daraus ergibt sich, dass durch diese evolutionären Prozesse auch bei weit entfernt verwandten Arten die PRRs relativiert sind und durch eine hohe Diversität der R-Proteine das Erkennen von Effektoren adaptierter und nicht-adaptierter Pathogene zwischen nah verwandten Pflanzenarten scheinlicher ist (Schulze-Lefert und Panstruga, 2011). Das Nichtwirts-System *A. thaliana* und *P. infestans* wurde erstmals von Huitema *et al.* (2003) beschrieben. DNA-Microarray-Analysen haben gezeigt, dass über 700 Gene in *A. thaliana* nach Inokulierung mit *P. infestans* mind. dreifach induziert sind. Trotzdem ist mechanistisch über die Nichtwirts-Resistenz zwischen *A. thaliana* und dem Oomyzeten wenig bekannt. Gut untersucht sind prä- und postinvasive Abwehrmechanismen der *A. thaliana*-Penetrationsmutanten *pen1*, *pen2* und

pen3. PEN steht für Penetration. Die Entdeckung der *PEN*-Gene (*PEN1*, *PEN2*, *PEN3*) erfolgte bei Mutationsstudien von *A. thaliana*, deren Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegenüber dem nicht adaptierten Gerstepathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) gesetzt war (Collins *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006). Die Doppelmutante *pen1 pen2* hat eine höhere Penetrationshäufigkeit als die Einzelmutanten nach *P. infestans*-Behandlung, bei der Doppelmutante *pen2 pen3* blieb die Penetrationshäufigkeit gegenüber den Einzelmutanten gleich (Lipka *et al.*, 2005; Landtag, 2006; Stein *et al.*, 2006; Lipka *et al.*, 2010). Das lässt darauf schließen, dass *PEN2* und *PEN3* in einem Weg kooperieren, *PEN1* dagegen über einem anderen Abwehrmechanismus wirkt (Lipka *et al.*, 2008). Sind diese nicht intakt, wird postuliert, dass in 90% der Fälle die Penetration des Pathogens in den Papillen, gestoppt werden, welche das Haustorium des Pathogens in Callose einkapseln (Collins *et al.*, 2003; Assaad *et al.*, 2004; Voigt, 2014). *PEN1* kodiert für ein Membran-assoziiertes Syntaxin mit einer SNARE-Protein-Domäne (*v-t*-SNAREs; *luble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor*) (Collins *et al.*, 2003; Assaad *et al.*, 2004). Im Komplex mit anderen Proteinen und Faktoren ist *PEN1* in der Zellwand- und Vesikeltransport für die Zellwand verstärkende Prozesse beteiligt (Collins *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2005; Stein *et al.*, 2006; Kwon *et al.*, 2008; Eschen-Lippold *et al.*, 2012). *PEN2* kodiert für eine von 48 postulierten *A. thaliana* Familie 1- β -Glykosidhydrolasen (Lipka *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2009). Die auch in dieser Arbeit untersuchte *A. thaliana pen2*-Mutante ist eine in Peroxysomen lokalisierte Myrosinase und katalysiert die Hydrolyse von β -Thioglukosidesterbindungen. Das Resultat dieser Hydrolyse sind aglykone wie Isothiocyanat-, Thiocyanat- und Acetonitril-derivate (Bones und Rossiter, 2006; Schlaeppli *et al.*, 2010; Bednarek, 2012a). Der Verlust der *PEN2*-Aktivität in *pen2*-Mutanten führt zu einer verminderten Penetrationsresistenz gegenüber *P. infestans* und zu lokalen toten Reaktionen sowie einer achtfach stärkeren Akkumulation des Phytoalexin Camalexin im Vergleich zu Col-0 (Lipka *et al.*, 2005; Landtag, 2006; Böttcher *et al.*, 2009). Camalexin ist ebenfalls ein Indolderivat und der Camalexin-Stoffwechselweg ist eng mit dem *PEN2*-Stoffwechselweg verknüpft, da die Produkte der Cytochrom P450-Peroxidasen CYP79B2/B3: das Indol-3-acetaldoxim (IAOx), sowohl für die Indolglycosinolate für *PEN2* als auch für Camalexin Ausgangssubstrat ist (Böttcher *et al.*, 2009; Schlaeppli *et al.*, 2010; Stotz *et al.*, 2011; Bednarek, 2012b). Dem *PEN2*-Enzym vorgelagert ist eine P450-Monooxygenase: CYP81F2, die Indol-3-glukosinolat (I3G) zu 4-Hydroxy-Indol-3-glukosinolat (4-OH-I3G) hydroxyliert. Wird durch Indol-Glukosinolatmethyltransferasen (IGMT) eine Methylgruppe

auf die Hydroxylgruppe an Position 4 übertragen, entsteht 4-Methoxy-Indol-3-glukosinolat (4-Methoxy-I3G) (Pfalz *et al.*, 2011). 4-Methoxy-I3G wird als Ausgangssubstrate für PEN2 postuliert, wobei bis heute die Indolderivatprodukte nicht identifiziert sind (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009; Bednarek, 2012a, 2012b). Die *A. thaliana*-Mutanten *pen2*, *cyp81F2* und die Doppelmutante *pen2 cyp81F2* zeigen eine verminderte Penetrationsresistenz nach Inokulierung mit dem echten Mehltau *Bgh* und eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber dem roten Pathogen *Plectospharella cucumerina* (Lipka *et al.*, 2005; Sanchez-Vallet *et al.*, 2010). Nachdem I3G durch PEN2 deglycosyliert wird, entstehen Indolderivate Indol-3-ylmethylisothiocyanat (I3MIC) und nach Addition von Glutathion (GSH) re (RA) und Indol-3-ylmethylamin (I3MA) (Bednarek *et al.*, 2009, 2011; Bednarek, 2012a). Eine Mutation im Gen der γ -Glutamylcysteinsynthetase1 (GSH1), führt im Vergleich zu *A. thaliana*-Wildtyppflanzen zu einer Reduktion von RA und I3A nach Inokulierung mit dem hemibiotrophen, nicht adaptierten Pilz *Colletotrichum gloeosporioides*. Die Doppelmutante *pen2 gsb1* zeigt eine größere Hyphenfläche von *C. gloeosporioides* um die Inokulierungsstelle als im Wildtyp Col-0, *pen2* oder *gsb1* (Hiruma *et al.*, 2013).

Nach Abspaltung des Glykosidrestes durch PEN2 wird vermutet, dass die entstandenen Indolderivate durch einen von *PEN3* kodierten, in der Plasmamembran lokalisierten ATP binding cassette (ABC)-Transporter in den Apoplasten zur Penetrationsstelle exportiert werden (Stein *et al.*, 2006; Lipka *et al.*, 2010; Underwood und Somerville, 2013). *PEN3* ist ein *pleiotropic drug resistance* (PDR)-ABC-Transporter aus *A. thaliana*, arbeitet ATP-abhängig und besitzt ein großes Substratspektrum (Crouzet *et al.*, 2006). Neben der erhöhten Penetration von *Bgh* in Epidermiszellen von Arabidopsis *pen3*-Mutanten (Stein *et al.*, 2006), sind *pen3*-Pflanzen in ihrer Resistenz gegenüber *P. cucumerina* (nekrotroph), *Erysiphe pisi* (biotroph) und *P. infestans* (hemibiotroph) eingeschränkt und zeigen eine stark erhöhte Aktivierung von Salizylsäure (SA)-abhängigen Abwehr-Signalwegen. Sie zeigen eine erhöhte basale Resistenz gegen adaptierte Mehltauarten wie *Golovinomyces orontii* (*Erysiphe orontii*) und *Golovinomyces choracearum* (*Erysiphe cichoracearum*) (Stein *et al.*, 2006; Lipka *et al.*, 2008, 2010). Welche derivate von *PEN3* in den Apoplasten transportiert werden, ist bisher nicht bekannt. Ein Hinweis, dass es Indol-3-acetonitril (I3A) sein könnte, postulieren Johansson *et al.* (2014). Es wird vermutet, dass *Bgh*-Sporen, die erfolgreich die Epidermis penetriert haben, in *A. thaliana*-Wildtyppflanzen durch HR-ähnlichen Zelltod bekämpft werden. Erhöhten Zelltod im Mesophyll zeigen die Doppel- und Tripelmutanten der verschiedenen *pen*-Mutantenkombinationen (*pen1*, *pen2*, *pen3*, *pen1 pen2*, *pen1 pen3*, *pen2 pen3* und *pen1 pen2 pen3*)

72 Stunden nach *Bgb*-Inokulierung. Um zu testen, welches Indol-3-glucosinolat-Abbauprodukt die HR induziert, wurden mit I3A, Butyronitril und Puffer infiltrierte *bidopsis*-Blätter in ein Wasserbad getaucht. Anschließend wurde über einen Zeitraum von 72 Stunden die Leitfähigkeit des Wassers bestimmt, da diese durch den Austritt des Ions bei Zelltodreaktionen ansteigt. Nur bei den I3A-infiltrierten Blättern kam es zu einem Anstieg der Leitfähigkeit im Wasser. Der HR-ähnliche Zelltod nach *Bgb*-Inokulierung ist abhängig von *EDS1* (*enhanced disease susceptibility 1*) und seinen Interaktionspartnern *SAG101* (*senescence associated gene 101*) und *PAD4* (*phytoalexin deficient 4*) (Lipka *et al.*, 2005). Die Wirtsresistenz von *A. thaliana* kann nicht durch Mutation in den drei *PEN*-Genen gehoben werden, da die prä- und post-invasive Abwehr von einer Vielzahl von Komponenten abhängig ist. Erst die Kombination der Mutationen in *PEN2* und der Gene *EDS1*, *SAG101* und/oder *PAD4* beeinflusst die Postpenetrationsresistenz von *A. thaliana* gegen *Bgb* (Lipka *et al.*, 2005). So ist die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgb* und *E. pisi* in der *pen2 sag101 pad4*-Mutante gebrochen (Lipka *et al.*, 2005), sowie in der *pen3 eds1*-Mutant gegen *E. pisi* (Stein *et al.*, 2006). Die hier diskutierten Komponenten der prä- und post-invasiven Wehrmechanismen der Nichtwirtsresistenz sind nur ein Teil des Repertoires, das Pflanzen gegen nicht-adaptierte Pathogene nutzen.

1.4. Immunabwehr an der Zellperipherie in Pflanzen

Im Apoplasten findet ein „Krieg“ zwischen Pathogen und Pflanzenwirt statt., unabhängig davon, ob es sich um biotrophe, nekrotrophe, hemibiotrophe filamentöse Pathogene oder bakterielle Erreger handelt., Die Waffen sind Effektoren, ROS (*reactive oxygen species*), wand-abbauende Enzyme, Zellwandverstärkungen, Glucanase-Inhibitoren, Chitinasen oder die Sekretion von Toxinen, wie in Abbildung 3 von Doehlemann und Hemetsberger (2013) dargestellt. Die Akkumulation von ROS (Abbildung 3), ist eine Kernkomponente in der frühen pflanzlichen Pathogenabwehr im Apoplasten. Zu ROS gehören Superoxidion ($O_2^{\cdot-}$) (Sawyer *et al.*, 1978), das von NADPH-Oxidasen gebildet wird (Tripathy und Oelmüller, 2012), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) und Singulett-Sauerstoff (1O_2) (Kishida und Klann, 2007). Die Superoxiddismutase (SOD) wandelt $O_2^{\cdot-}$ in Anwesenheit von Wasser, in H_2O_2 um (Sutherland, 1991). H_2O_2 wird auch direkt, ohne SOD, von se-III-Peroxidasen gebildet (Pichorner *et al.*, 1992; Berglund *et al.*, 2002). ROS wirken schädlich auf eindringende Pathogene, indem sie Änderungen an der Molekülstruktur von

tiden und Nukleinsäuren hervorrufen (Mehdy, 1994; Kohen und Nyska, 2002; Apel und Hirt, 2004; Doehlemann und Hemetsberger, 2013). Zudem werden ROS zur Verstärkung der Zellwand bei der Papillenbildung gebraucht (Hückelhoven, 2007). So dient H_2O_2 bei der Ligninbiosynthese durch Peroxidasen als Oxidationsmittel (Davin und Lewis, 2005). ROS-Akkumulation im Apoplasten spielt eine Rolle bei der Abwehr gegen bakterielle Erreger wie *P. syringae*. So zeigen *A. thaliana*-Linien, deren H_2O_2 synthetisierende Peroxidase 33 (PRX33) herunterreguliert wurde, eine erhöhte Anfälligkeit gegen *P. syringae* (Daudi *et al.*, 2012). Andererseits führt eine Überexpression des Gens *CaPO2* aus Paprika (*Capsicum annuum*), das für eine extrazelluläre Peroxidase kodiert, in *A. thaliana* zu einer erhöhten Resistenz gegen *P. syringae* pv *tomato* (Choi *et al.*, 2007).

In der Pflanze-Pathogen-Interaktion im Apoplasten werden auch eine Reihe von Proteinen sekretiert, so geben u.a. Pflanzen Proteasen in den Apoplasten, die dem Erreger schaden sollen. Viele Pathogene können darauf antworten, indem sie Proteaseinhibitoren in den Apoplasten sekretieren (Abbildung 3, (Doehlemann und Hemetsberger, 2013). Ein Beispiel für solch eine Interaktion ist die von *S. lycopersicum* nach Kontakt mit *P. infestans* sezernierte Cysteinprotease PIP1 (*Phytophthora inhibited protease 1*) mit dem von *P. infestans* in den Apoplasten geschleusten Proteaseinhibitor EPIC1 (*extracellular protease inhibitor cystatin-like domain 1*; Tian *et al.*, 2007). EPIC1 interagiert nicht nur mit PIP1, sondern auch mit der PIP1-verwandten Cysteinprotease RCR3, die von Tomate in den extrazellulären Raum abgegeben wird (Dixon *et al.*, 2000; Rooney *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2009). Zusätzlich zu diesen zwei Cysteinproteasen kann EPIC1 von einer weiteren Protease, C14, gebunden werden, die in einigen *Solanaceen* im Apoplasten zur Pathogenabwehr präsent ist (Tian *et al.*, 2007; Kaschani *et al.*, 2010). Die Fähigkeit von EPIC1, die drei pflanzlichen Proteasen zu inhibieren zu, zeigt dass wichtige Komponenten der pflanzlichen Abwehr durch multiple Effektoren „abgefangen“ werden, um sicherzustellen, dass die pflanzliche Immunantwort supprimiert wird (Doehlemann und Hemetsberger, 2013).

Weitere Komponenten der pflanzlichen Abwehr im Apoplasten sind Chitinasen und Glucanasen. Chitin und β -Glucan sind PAMPs der pilzlichen Zellwand. Pathogene können über verschiedene Modifikationen dieser Moleküle einen Abbau durch Chitinasen oder Glucanasen zu verhindern oder die Perzeption durch diese PAMPs zu vermeiden, indem sie maskiert werden (Abbildung 3). Manche Rostpilze, wie *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* und *Uromyces fabae*, de-N-acetylieren ihr Chitin zu Chitosan um der enzymatischen Aktivität der Wirts-Chitinasen zu entgehen (El Gueddari *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2007). Andere

Pilze, wie das Reis- (*Oryza sativa*) Pathogen *Magnaporthe oryzae* maskieren ihr β -Glucan durch α -Glucan auf der Zellwandoberfläche während der Pathogenese. Das führt dazu, dass die Zellwand des Pilzes nicht durch pflanzliche β -Glucanasen abgebaut werden kann. Zum anderen kann α -Glucan von der pflanzlichen Immunabwehr nicht erkannt werden (Fujikawa *et al.*, 2009, 2012).

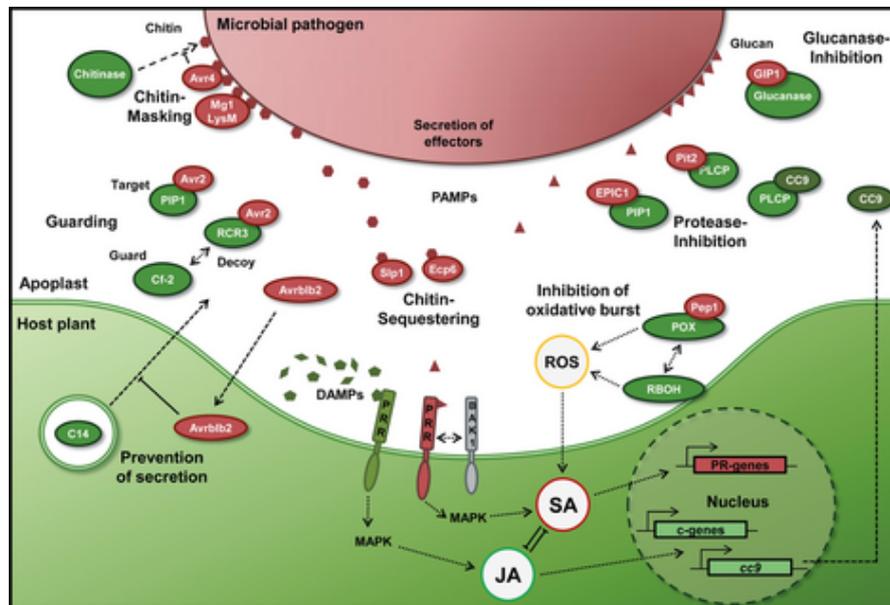


Abbildung 3: Die Rolle von ausgewählten Effektoren im Apoplasten in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Dargestellt ist ein schematischer Überblick einer hypothetischen Pflanzeninfektion durch filamentöse mikrobielle Pathogene. Gezeigt werden die Komponenten der basalen Pflanzenabwehr aus verschiedenen Pflanzenarten. Auf einzelne Komponenten der Interaktion wird im Text eingegangen. Mikrobielle Effektoren: Avr2, Avr4 (Avirulenz), Avrblb2, Ecp6 (pilzlicher Effektor des Tomatenpathogens *Cladosporium fulvum*), EPIC1 (*extracellular protease inhibitor cystatin-like domain 1*), GIP1 (*Glucanaseinhibitor-Protein*), Pep1 (*Fusarium spp. pea pathogenicity protein*), Pit2 (Cystein-Proteaseinhibitor aus *Ustilago maydis*). Pflanzliche Proteasen: C14 (*papain-like cysteine protease*), PIP1 (*Phytophthora inhibited protease 1*), PLCP (*papain-like cysteine protease*), Rcr3 (Tomaten-Protease). ROS-generierende Enzyme: POX (Peroxidase), RBOH (*respiratory burst oxidase homolog*). BAK1 (*Arabidopsis BRI1-assoziierte Rezeptorkinase1*; C-Gene (Kompatibilitäts-Gene); CC9 (*corn cystatin 2*; Cf-2, Tomaten-Resistenz-Protein Cf-2; JA, Jasmonsäure; MAPK, *Mitogen-aktivierte Protein Kinase*; PAMP/DAMP, *pathogen/damage-associated molecular patterns*; PR genes, Gene für PR (*pathogenesis related*)-Proteine; PRR, *pattern recognition receptor*; ROS, *reactive oxygen species*; SA, Salizylsäure (Doehle- mann und Hemetsberger, 2013).

Über proteinogene Komponenten der pflanzlichen Abwehr im Apoplasten ist viel bekannt. Sehr viel weniger ist die chemische Immunabwehr im extrazellulären Raum der Pflanzen untersucht. Zur Abwehr von Pflanzenpathogenen produzieren Pflanzen über 100000 verschiedene niedermolekulare Sekundärmetaboliten. Die Mehrheit davon sind Derivate aus dem Isoprenoid-, Phenylpropanoid-, Alkaloid- oder Fettsäure-/Polyketid-Stoffwechsel (Dixon, 2001). Dazu gehören Phytoalexine, Abwehrstoffe die nach Pathogenerkennung *de*

novoo synthetisiert werden und Phytoantizipine, Abwehrstoffe die konstitutiv in der Pflanze vorhanden sind (VanEtten *et al.*, 1994). Zu den Phytoalexinen zählen z.B. reamide (HCAA), Camalexin (Indolderivat), Resveratrol (Isoflavonderivat), ne uva. Phytoantizipine sind z.B. Tannine und Saponine (Dixon, 2001). Manche Substanzen können auch beides sein, so akkumuliert das methylierte Flavonon Sakuranetin in sen der schwarzen Johannesbeere (*Ribes nigrum*) konstitutiv, in Blättern von Reis (*O. sativa*) wird die Biosynthese jedoch erst durch UV-Licht-Bestrahlung induziert (Rakwal *et al.*, 1996; Dixon, 2001).

Tannine sind in vielen Pflanzen präsent. Sehr hohe Gehalte von Tanninen sind im Fruchtperikarp von Granatäpfeln (*Punica granatum* L.), die eine sehr starke antimikrobielle Wirkung u.a. gegen *Staphylococcus aureus* haben (Machado *et al.*, 2003; Romeo *et al.*, 2015). Sowohl in Granatapfelschalenextrakten als auch in Gerberstrauch- (*Rhus coriaria* L.) Fruchtschalenextrakten wurden hohe Konzentrationen an Anthocyanen wie Delphinidin-3,5-diglucosid und Cyanidin-3-glucosid, sowie phenolische Substanzen wie Gallsäure und Quercetinderivate gefunden (Romeo *et al.*, 2015) . Der konzentrierte Fruchtschalenextrakt von Granatäpfeln führt zu einer kompletten Inhibierung von *Botrytis cinerea* auf Tafelweintrauben (*Vitis vinifera* cv. *Italia*) im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 24 Stunden. Die Extrakte der Gerberstrauchfrüchte zeigen zwar signifikante aber sehr viel geringere Resistenz gegenüber *B. cinerea*, die Blattextrakte dieser Pflanzen können die Ausbreitung des Pilzes zu 50% inhibieren (Romeo *et al.*, 2015).

Proanthocyanin zählt zu den kondensierten Tanninen und akkumuliert in der Samenschale von *A. thaliana*. Es besitzt neben der Kontrolle der Samen-Langlebigkeit und Keimruhe auch Schutzeigenschaften gegen Pathogene (Debeaujon *et al.*, 2003; Auria und Gershenzon, 2005).

Eine weitere gut untersuchte Klasse von pflanzlichen antimikrobiellen Substanzen sind saponine, glycosylierte Steroide oder Steroidalkaloide, die eine konsitutive chemische Barriere gegen ein breites Spektrum von filamentösen und bakteriellen Pathogenen repräsentieren (Bowyer *et al.*, 1995; Osbourn, 1996). Saponine werden von Pflanzen synthetisiert, um einen Verlust der Membranintegrität bei pilzlichen Pathogenen zu verursachen, indem sie mit freien 3 β -Hydroxylgruppen der Sterole komplexieren. Diese Komplexe führen zu Poren in der Zellmembran des Pilzes, was zur Zellyse führt (Keukens *et al.*, 1995; Osbourn, 1996; Ökmen *et al.*, 2013). Ein sehr bekanntes Saponin ist α -Tomatin, das zur basalen Resistenz von *S. lycopersicum* beiträgt. Einige Tomatenpathogene sind in der Lage, α -Tomatin zu

ger fungiziden Substanzen abzubauen, wie β -Tomatin oder Tomatidin (Ökmen *et al.*, 2013). Oomyzeten sind gegen diese Phytoalexine nicht sensitiv, da ihre Membran frei von 3β -Hydroxysterolen sind. Daher werden keine α -Tomatin detoxifizierenden Enzyme von myzeten synthetisiert (Steel und Drysdale, 1988). Melton *et al.* (1998) schrieben, dass der biotrophe Pilz *Cladosporium fulvum* nicht in der Lage ist, α -Tomatin zu detoxifizieren. men *et al.*, 2013) zeigen aber, dass die Glycosylhydrolase CfTom1, *in vitro* und während der Infektion auf Tomate, α -Tomatin in Tomatidin umwandeln kann. Zehn Tage nach Lierung von Tomate mit *C. fulvum* kommt es zu einem signifikanten Anstieg von Tomatidin im Apoplasten. Funktionsanalysen mit *cfTom1*-Mutanten ergeben eine erhöhte Sensitivität des Pilzes gegenüber α -Tomatin und sie postulieren eine Notwendigkeit des Enzyms für die Virulenz von *C. fulvum* auf Tomate (Ökmen *et al.*, 2013).

Die Bildung einer Papille ist eine der frühesten zu beobachtenden Immunantwort der Pflanzen (Voigt, 2014). Sie wurde erstmals beschrieben bei *P. infestans*-Infektionen von (de Bary, 1861). Zu den chemischen Verbindungen die eine Rolle bei der Papillenbildung len gehören Callose, phenolische Substanzen und Lignin (Aist, 1976). Papillen entstehen an Penetrationsstellen von filamentösen Pathogenen, und bestehen hauptsächlich aus Callose, einem (1,3)- β -Glucanpolymer mit (1,6)- β -Glucanbrücken (Hayashi *et al.*, 1987). gerungen treten aber auch nach Verwundung und bei abiotischen Stress an der Zellwand, z.B. bei *A. thaliana* auf (Jacobs *et al.*, 2003; Mauch-Mani und Mauch, 2005). Beim Transport der benötigten antimikrobiellen Substanzen und des Zellwand verstärkenden Materials für die Papillenbildung spielt das sekretorische System der Pflanzen eine Rolle (Schulze-Lefert, 2004; Hückelhoven, 2007; Kwon *et al.*, 2008; Eschen-Lippold *et al.*, 2012). Die Substanzen werden über Vesikel transportiert, die dann selektiv mit der Membran fusionieren. Diese Prozesse finden nicht nur bei der Immunabwehr statt, sondern auch bei Entwicklungs- und anderen Stressvorgängen in Pflanzen (Collins *et al.*, 2003; Lipka *et al.*, 2007). Die fusionsprozesse werden vermittelt durch Vesikel- und Zielmembranständige SNARE-Proteine (Weber *et al.*, 1998; Bock *et al.*, 2001; Collins *et al.*, 2003; Diao *et al.*, 2010). Das reits im Abschnitt 0. erwähnte t-SNARE-Protein PEN1, auch SYP121 (*syntaxin of plants 121*) genannt, spielt eine Rolle in der Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegen *Bgh* lins *et al.*, 2003). Wichtig für den Eintritt von *Bgh* in die Wirtszellen von Gerste ist das SNARE-Adapterprotein SNAP33 (*soluble N-ethylmaleimide sensitive factor adapter protein 33*) (Wick *et al.*, 2003; Pajonk *et al.*, 2008). Um herauszufinden, welche Rolle SNARE-Proteine bei der Pathogenabwehr in *S. tuberosum* spielen, haben Eschen-Lippold *et al.* (2012) die

pression der Homologe in Kartoffel *StSYR1* und *StSNAP33* durch RNAi-Konstrukte unterreguliert und anschließend phänotypisch, biologisch und biochemisch charakterisiert. Dabei zeigen die transgenen *StSNAP33*- und *StSYR1*-RNAi-Pflanzen, nach zwei Wochen Wachstum in Erde, spontane Nekrosen- und Chlorosenbildung. Die Nekrosen- und Chlorosenbildung korreliert mit erhöhten SA-Gehalten in den RNAi-Pflanzen. Nach Infektion mit *P. infestans* zeigen die *StSYR1*-RNAi-Pflanzen eine erhöhte Resistenz, *StSNAP33*-RNAi-Pflanzen nicht. Die erhöhte Resistenz kann auch auf die erhöhten SA-Gehalte der Pflanzen sowie konstitutive Transkriptakkumulation des *PR1*-Gens (*pathogen related 1*) zurückzuführen sein. Die *StSYR1*-RNAi-Pflanzen zeigen zudem eine veränderte Reaktion an der Penetrationsstelle und somit auch schwächere Papillenbildung. *StSYR1* ist somit notwendig für die Ausbildung Callose-haltiger Papillen. Die Resistenz gegenüber rotrophen Pathogenen wie *B. cinerea* war hingegen unverändert bei beiden transgenen Pflanzen (Eschen-Lippold *et al.*, 2012).

1.4.1. Chemische Abwehr in *S. tuberosum* gegen *P. infestans*

Der erste aufgezeichnete große Befall von Kartoffelpflanzen mit *P. infestans* trat 1843 in Philadelphia und New York in den USA auf und breitete sich durch die Sporen von *P. infestans* günstige Wetterverhältnisse auf die Nachbarstaaten aus. Über Schiffe, auf infizierten Saatkartoffelknollen, kam der Erreger über den Atlantik nach Europa. Die ersten Symptome der Kraut- und Knollenfäule zeigten sich bei Kartoffelpflanzen von belgischen Bauern im Frühjahr 1845 (Reader, 2008; Nowicki *et al.*, 2012).

Als *P. infestans* wenig später Irland erreicht, lösen die von 1846-52 erlittenen Ernteverluste eine so große Hungersnot aus, dass eine Mio. Iren verhungerten und eine weitere Mio. Iren aus Irland flüchten. Irland war zu diesem Zeitpunkt stark abhängig von der Kartoffel, da sie Hauptnahrungsquelle war (Kinealy, 1994; Gráda und Eiriksson, 2006; Reader, 2008; Czekaj *et al.*, 2012). Bei der Kraut- und Knollenfäule sind alle Pflanzenteile inklusive Blätter, Stängel und Knollen betroffen (Fry und Goodwin, 1997; Fry, 2008; Abbildung 4). Erste Symptome sind dunkelbraune Flecken auf der Blattoberfläche und auf Stängeln, die sich bei feuchten Wetter rasch ausbreiten. Knollen weisen graublau verfärbte Flecken und braunes Knollenfleisch auf (Fry und Goodwin, 1997; Abbildung 4B). Trotz Suszeptibilität der meisten Kartoffelsorten gegenüber *P. infestans* hat *S. tuberosum* prä- und postinvasive Abwehrmechanismen gegen den Erreger. So akkumulieren nach Befall eine Reihe von Sekundärmetaboliten. Während der Pflanze-Pathogen-Interaktion kommt es zu den bereits

betrachteten Zellwandverstärkungen durch z.B. Callose und Lignin (Back *et al.*, 2001; Henriquez *et al.*, 2012), die die Penetration des Oomyzeten inhibieren sollen. In der Kartoffelknolle lassen sich große Mengen des Phytoalexins Rishitin und anderer Sesquiterpenderivate nach *P. infestans*-Befall finden (Zook *et al.*, 1987; Kuc, 1995). In den *P. infestans* infizierten Blättern akkumulieren erhöhte Mengen von Phytoalexinen, welche aus dem Phenylpropanstoffwechsel stammen und beispielsweise zur Zellwandverstärkung durch Vernetzung mit der Zellwand als Antwort auf den Pathogenangriff beitragen (Schmidt *et al.*, 1999). Ein Großteil dieser Substanzen sind Ferulasäure- und *p*-Cumarsäureester (Iiyama *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1999).

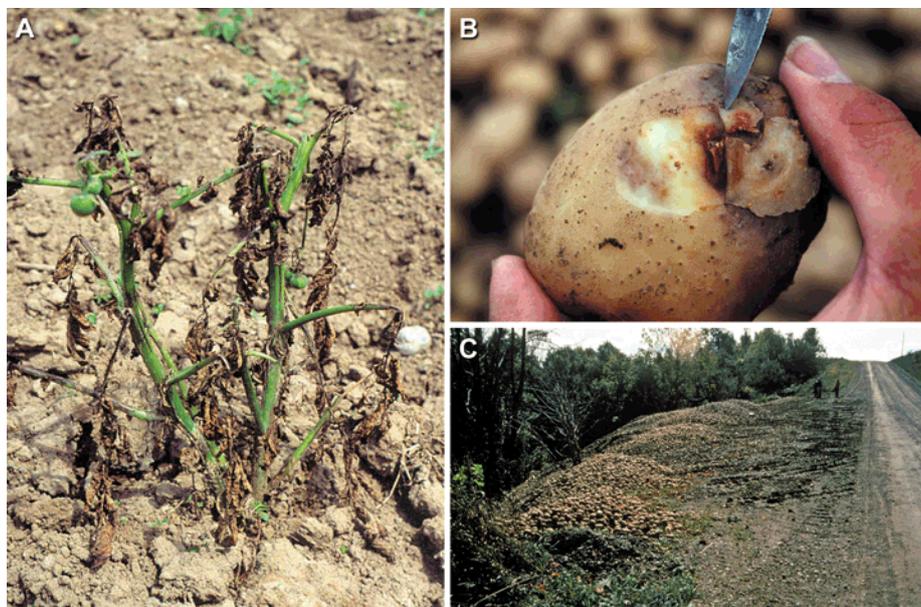


Abbildung 4: Das Schadbild von *P. infestans* auf *S. tuberosum*. Symptome auf Blättern (A) und Knollen (B). Die Kartoffelknollen wurden zwei Wochen nach der Ernte verworfen da die Kartoffelknollen durch die Kraut- und Knollenfäule fast vollständig zerstört waren (C). Fotos aus Fry (2008)

1.4.2. Hydroxyzimtsäureamide

Zur chemischen Abwehr im Apoplasten gehören die Hydroxyzimtsäureamide (HCAAs), die die Hauptphytoalexine in Kartoffelblättern sind. HCAAs sind in den höheren Pflanzen weit verbreitete, stickstoffhaltige Sekundärmetaboliten mit einem niedrigen Molekulargewicht (Martin-Tanguy, *et al.*, 1978; Facchini *et al.*, 2002). Es wird postuliert, dass sie in der pflanzlichen Abwehr bei vielen Stressarten eine Rolle spielen, wie bei Pathogeninfektionen, Verwundung oder Elizitorapplikationen in verschiedenen Pflanzengeweben (Hahlbrock

und Scheel, 1989; Schmidt *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2014). Gut untersucht ist die Funktion der HCAAs bei der Wundheilung von Kartoffelknollen. Ein Beispiel dafür ist Dihydroferuloyltyramin. Nach Verwundung befinden sich eine ca. 2,5-fach höhere Mengen des HCAAs im Kartoffelknollenperiderm im Vergleich zu unverwundeten Knollen (Negrel *et al.*, 1996). Durch die dikovalente Einbindung der Feruloyltyramine und -octopamine über ihre Hydroxylgruppen in die Zellwände von verwundeten und unverwundeten Kartoffelperidermen soll eine Barriere für potentielle Pathogene erzeugt werden (Negrel *et al.*, 1996). Gene der Biosynthesenzyme der HCAAs, wie die Hydroxycinnamoyl-CoA-Tyramin-*N*-hydroxycinnamoyltransferase (THT), sind wundinduziert in Kartoffelpflanzen und Knollen (Negrel *et al.*, 1993). Akkumulation von Feruloyl- und *p*-Coumaroyltyramin nach Wundung findet auch in Tomatenpflanzen statt (Pearce *et al.*, 1998; Campos *et al.*, 2014). Wundgene lösen ebenfalls eine Anreicherung von HCAAs in Pflanzen aus. Nach Inokulierung mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* sind erhöhte Mengen *p*-Coumaroyl- und Feruloylagmatin sowie *p*-Coumaroyl- und Feruloylputreszin in den Blättern von *A. thaliana* zu messen (Muroi *et al.*, 2009). Korrelativ gezeigt wird die Funktion von HCAAs in der Immunabwehr durch Untersuchungen zu den Hydroxycinnamoyl-Coenzym A-Polyamintransferasen AT1 (Acyltransferase1) und DH29 aus *Nicotiana attenuata* nach Inokulation von Oralsekret der Larven des Tabakschwärmers *Manduca sexta*. AT1 und DH29 werden von dem Transkriptionsfaktor MYB8 reguliert. Die durch VIGS (virus induced gene silencing, Becker und Lange (2010)) herunterregulierten Transferasen AT1- und DH29 in *N. attenuata* führen zu geringeren Caffeoyl- und *p*-Coumaroylputreszingehalten in den Blättern nach Inokulation mit dem Herbivorenssekret im Vergleich zu Kontrollpflanzen. Die DH29-VIGS-Pflanzen akkumulieren weniger Caffeoyl-, *p*-Coumaroyl- und Feruloylputreszin vier Tage nach Behandlung mit *M. sexta* im Gegensatz zu Kontrollpflanzen (Kaur *et al.*, 2010; Onkokesung *et al.*, 2012). Es gibt Hinweise darauf, dass HCAAs weitere Funktionen bei Wachstums- und Entwicklungsprozessen in Pflanzen wie Blütenbildung haben (Martin-Tanguy, *et al.*, 1978; Facchini *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2009). In Kartoffel gibt es einen Zusammenhang zwischen der Akkumulation von *p*-Coumaroyl-, Caffeoyl-, Feruloylputreszin und Caffeoylspermidine in Stolonen und der Knollenbildung die parallel stattfinden (Paynot *et al.*, 1983; Facchini *et al.*, 2002). Unter Bedingungen, die die Blütenbildung fördern und Knollenbildung unterdrücken, werden unterschiedliche Mengen an HCAAs in den Blättern gemessen. Das lässt die Hypothese zu, dass HCAAs an der Regulierung dieser Prozesse beteiligt sind (Facchini *et al.*, 2002). Leubner-Metzger und Amrhein (1993) verglichen die

Verteilung von Hydroxycinnamoylputreszinen (HCP) in verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien von sieben Solanaceen-Arten. Sie fanden nur sehr geringe Mengen HCP in *S. tuberosum* und *Solanum nigrum* in allen Organen und in allen Entwicklungsstufen, im Gegensatz zu anderen Solanaceen wie *S. lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* oder *Nicotiana glauca*. Das lässt den Schluss zu, dass es keine ubiquitäre Akkumulation spezifischer HCAs in den Nachtschattengewächsen während bestimmter Entwicklungsprozesse gibt und die Autoren sehen keine kausale Beteiligung der Hydroxycinnamoylputreszine in den- und Blütenbildungsprozessen in Solanaceen (Leubner-Metzger und Amrhein, 1993).

Die Biosynthese von HCAs ist gekennzeichnet durch eine Kondensation von biogenen Aminen wie Tyramin, Octopamin, Agmatin oder Putreszin mit Hydroxycinnamoyl-CoA-Estern wie z.B. *p*-Cumaroyl-, Feruloyl- und Caffeoyle-CoA (Schmidt *et al.*, 1999; Facchini *et al.*, 2002; Muroi *et al.*, 2009). Ausgangsmolekül für die Biosynthese ist die Aminosäure L-Phenylalanin, welche im Phenylpropanstoffwechsel durch das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL; EC 4.3.1.5) unter Freisetzung von Ammoniak (NH₃) zu Zimtsäure umgewandelt wird (Hagel und Facchini, 2005; Eda-ahiro und Seki, 2006; Abbildung 5). Anschließend wird durch das Enzym Zimtsäure-4-Hydroxylase (CA4H, EC 1.14.13.11) unter Verbrauch von NADPH+H⁺ und einem Sauerstoffmolekül der aromatische Ring der Zimtsäure hydroxyliert und es entsteht *p*-Cumarsäure (Abbildung 5). Sowohl aus Zimtsäure und *p*-Cumarsäure synthetisieren Ligasen Ester mit Coenzym A (Cinnamoyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA). Die *p*-Cumarat-CoA-Ligase (4CL, EC 6.2.1.12), die aus *p*-Cumarsäure *p*-Cumaroyl-CoA synthetisiert, arbeitet ATP-abhängig. Andere Acid-Thiol-Ligasen (EC 6.2.1.-), welche z.B. für die Synthese von Cinnamoyl-CoA verantwortlich sind, arbeiten ATP-unabhängig unter Abspaltung von Wasser. Durch weitere Hydroxylierungsschritte z.B. durch das Enzym *p*-Cumaroyl-CoA-CoA-3-Hydroxylase (CCoA3H, EC 1.14.13.-) steht aus *p*-Cumaroyl-CoA das Caffeoyle-CoA (Abbildung 5). Die Caffeoyle-CoA-O-methyltransferase (CCoAOMT, EC 2.1.1.104) methyliert die Hydroxylgruppe an der meta-Position des Phenolringes von Caffeoyle-CoA und bildet so Feruloyl-CoA. Bei dieser Reaktion entsteht gleichzeitig aus S-Adenosyl-L-methionin (SAM), durch Übertragung der Methylgruppe auf Caffeoyle-CoA, S-Adenosylhomocystein (SAH). Die entstandenen Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester-Derivate aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel der Pflanzen stellen die Acyl-Donoren bei der HCA-Biosynthese dar. Als Acylakzeptoren dienen biogene Amine, das können die aus der Polyamin-Biosynthese resultierenden aliphatischen Amine wie z.B. Agmatin, Putreszin, Spermin, Thermospermin und Spermidin sein (Fuell *et al.*, 2010)

oder aromatische Amine wie Tyramin, Octopamin und Dopamin. Die biogenen Amine entstehen durch die Decarboxylierung der Aminosäuren L-Arginin, L-Ornithin und L-Tyrosin, katalysiert von Decarboxylasen (Abbildung 5). Das einfachste Polyamin Putreszin entsteht direkt durch die Decarboxylierung aus Ornithin, katalysiert von der Decarboxylase (ODC, EC 4.1.1.17), bei *A. thaliana* nicht, da es keine ODC besitzt. Putreszin kann aber auch unter Abspaltung von Harnstoff aus Agmatin durch das Enzym Agmatinase (EC 3.5.3.11, Abbildung 5) synthetisiert werden. Agmatin wiederum wird von der Arginindecarboxylase (ADC, EC 4.1.1.19) generiert. Spermidin wird durch mehrfache Addition von Aminopropylgruppen an Putreszin und Spermidin gebildet, katalysiert durch Spermidin- und Sperminsynthase (SPDS, EC 2.5.1.16; SPMS, EC 2.5.1.22) (Alcázar *et al.*, 2010). Die Thermosperminsynthase (TSPMS, EC 2.5.1.79) konvertiert Spermin zu Thermospermin. Die beiden letzteren Reaktionen brauchen decarboxyliertes SAM als Methylgruppendonor (Takano *et al.*, 2012). Tyramin wird durch die Decarboxylierung von Tyrosin durch die Tyrosindecarboxylase (TDC, EC 4.1.1.25) synthetisiert, Octopamin, indem das C₁-Atom von Tyramin von der Tyramin- β -Hydroxylase (β TH, EC 1.14.17) hydroxyliert wird (Monastirioti *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999). Tyraminmonooxygenase (TMO, EC 1.14.18.1) synthetisiert mit O₂ und unter Verbrauch von NADH+H⁺, Tyramin zu Dopamin. BAHD- (BEAT, *benzylalcohol acetyltransferase*; AHCT, *anthocyanin-O-hydroxycinnamoyl-acetyltransferase*; HCBT, *hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA-anthranilate-N-hydroxycinnamoyl/benzoyl-transferase*, DAT, *deacetylindoline-acetyltransferase*), GCN5- (General Control of Nonrepressed 5-related N-acyltransferasen; GNAT) und andere Acyltransferasen katalysieren die Kondensation der Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester mit den Polyaminen. Durch die hohe Zahl an Kondensationsmöglichkeiten entsteht eine Vielzahl von HCAA-Derivaten, u. a. *p*-Cumaroylagmatin, *p*-Cumaroylputreszin, *p*-Cumaroyltyramin, Feruloylagmatin und Feruloyltyramin (Abbildung 5). Wie vorher bereits an einigen Beispielen erläutert, werden den verschiedenen HCAA-Derivaten unterschiedliche Funktionen und Rollen in der Pflanzenabwehr oder Pflanzenentwicklung postuliert (Martin-Tanguy, *et al.*, 1978; Schmidt *et al.*, 1999; Back *et al.*, 2001; Muroi *et al.*, 2009; Handrick *et al.*, 2010; Fellenberg *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2014; Fellenberg und Vogt, 2015).

Generell können HCAAs in zwei Typen unterschieden werden, den alkalischen und den neutralen Amiden. Alkalische Amide enthalten primäre Amin-Funktionen und sind löslich. Die Kondensation der alkalischen Amide fand meist mit aliphatischen Di- und Polyaminen statt wie Putreszin, Agmatin, Spermin und Spermidin. Neutrale Amide haben

ne starke Ionisierungs-Funktion, sind schwer wasserlöslich und enthalten meist aromatische Amine wie Tyramin, Octopamine und Tryptamin (Facchini *et al.*, 2002).

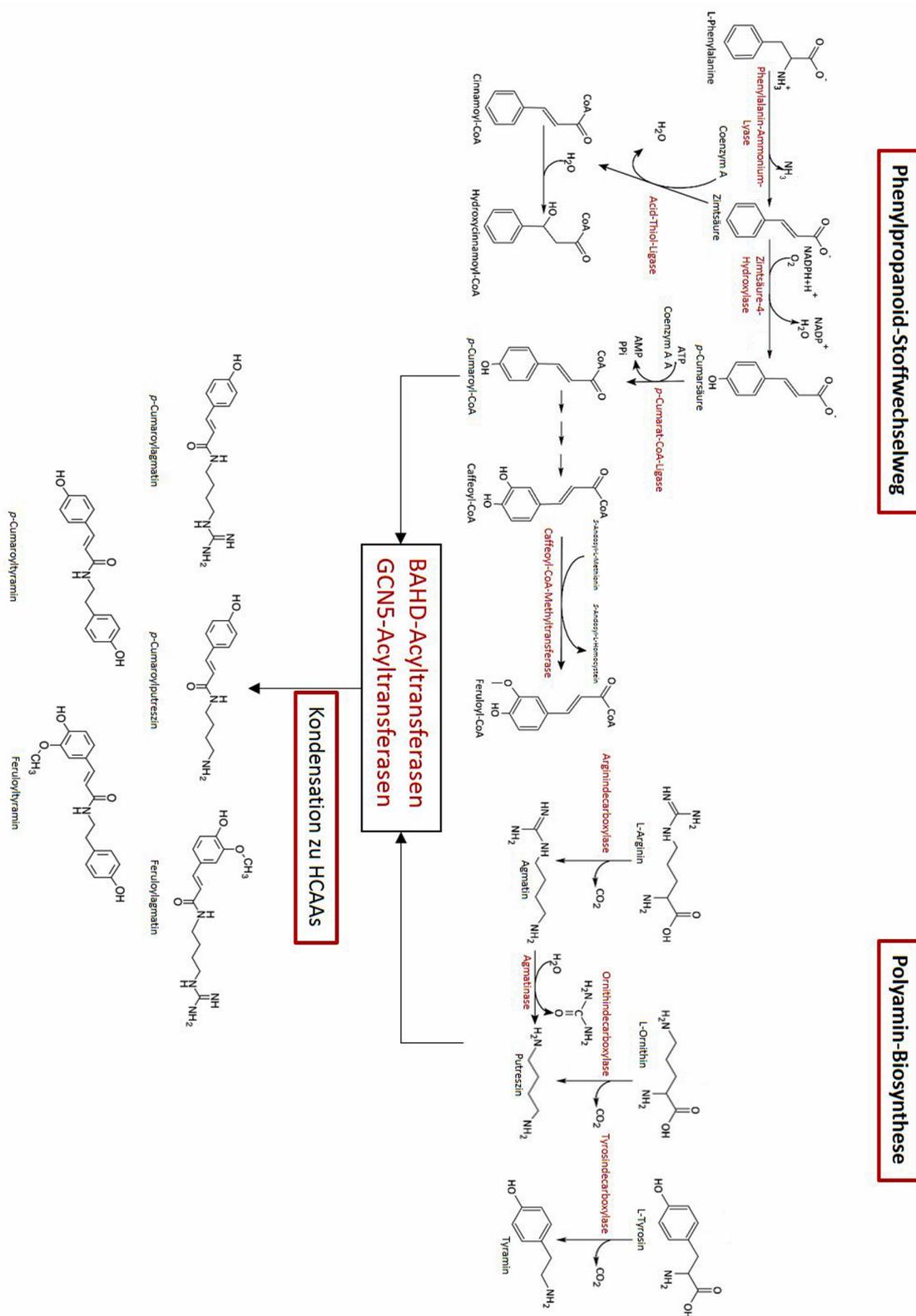


Abbildung 5: Biosynthese von Hydroxytryptamine Acylamiden (HCAAs). Die Acyl-Donormoleküle für die Acyltransferasen sind roxycinnamoyl-Coenzym A-Ester aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechselweg und leiten sich von L-Phenylalanin

ab. Als Acylgruppenakzeptoren gelten Polyamine, welche sich durch Decarboxylierung von L-Arginin, L-Ornithin, L-Tyrosin oder anderen Aminosäuren ableiten. CoA = CoenzymA

1.5. *Acyltransferasen*

Die Mechanismen der Acylierung, Transacylierung oder Deacylierung von phenolischen Metaboliten und Fettsäuren durch Acyltransferasen sind im Sekundärmetabolismus der Pflanzen weit verbreitet (D’Auria, 2006). Die Enzymkatalysen sind wie im Fall der HCAA-Biosynthese Thioester-abhängige (Coenzym A) Reaktionen, können aber auch UDP-Glucose-abhängig verlaufen (Steffens, 2000). Die aktivierten Ester-Gruppen liefern Gruppentransfer-Potentiale von ca. -36 kJ mol^{-1} (Mock und Strack, 1993; Steffens, 2000). Die HCAA-Biosynthese wird in *A. thaliana* und *S. tuberosum* von Acyltransferasen katalysiert, die unterschiedlichen Familien angehören. In *A. thaliana* findet die Biosynthese von HCAs wie *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin durch die Agmatine *N*4-*p*-Cumaroyl-Transferase AtACT1 (EC 2.3.1.64) statt, welche zur BAHD-Acyltransferasen-Superfamilie gehört (Muroi *et al.*, 2009). In *S. tuberosum* werden HCAs wie *p*-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin von der Tyramin-*N*-(Hydroxycinnamoyl)-Transferase (StTHT; EC 2.3.1. 110) synthetisiert, welche zu der GCN5-verwandten *N*-Acyltransferasen (GNAT)-Superfamilie gehört (Dyda *et al.*, 2000; Bassard *et al.*, 2010; Kuhn *et al.*, 2013).

1.5.1. BAHD-Acyltransferasen

BAHD- Acyltransferasen haben ein Molekulargewicht von 45 bis 61 kD. Im Jahr 2000 ren 42 BAHD-Acyltransferasen-kodierende Gene in *A. thaliana* annotiert (St-Pierre und Luca, 2000). Im Jahr 2005 waren es bereits 64, allerdings inklusive Pseudogene (Auria und Gershenzon, 2005). Mitglieder der BAHD-Familie haben nur eine geringe Sequenzidentität zwischen 25 und 34% (Ma *et al.*, 2005). Alle haben aber konservierte Sequenzmotive wie das HXXXD- und das DFGWG-Motiv (Ma *et al.*, 2005; D’Auria, 2006; Tuominen *et al.*, 2011; Walker *et al.*, 2013). Der katalytische Mechanismus wurde erstmals durch Ma *et al.* (2005) über die Kristallstruktur der Vinorinsynthase aus *Rauwolfia serpentina* (Indische genwurzeln oder Wahnsinnskraut) aufgeklärt. Das Enzym besteht aus zwei fast identischen Domänen. Jede Domäne ist aus 14 β -Faltblättern und 13 α -Helices aufgebaut. Die Domänen sind über einen Loop verbunden. Das aktive Zentrum befindet sich in einem Kanal zwischen den beiden Domänen. Ein katalytischer His-Rest im HXXXD-Motiv ist von beiden Seiten im Kanal zugänglich. Das DFGWG-Motiv befindet sich nicht im aktiven Zentrum. Der His-Rest deprotoniert ein Sauerstoff- oder Stickstoffatom vom

Akzeptorsubstrat und erlaubt somit einen nukleophilen Angriff auf den Carbonyl-Kohlenstoff im Thioester vom CoA. So wird ein tetrahedrales Intermediat zwischen CoA und Akzeptorsubstrat gebildet. Das Intermediat wird dann wieder reduziert. Daraus tiert ein freies CoA und ein acylierter Ester oder acetyliertes Amid (Ma *et al.*, 2005; D'Auria, 2006). Desweiteren lassen sich die Mitglieder der BAHD-Familie nach dem jeweiligen strattyp oder den Bedingungen, unter denen die kodierenden Gene für diese Enzyme viert sind, in fünf Stämme einteilen (D'Auria, 2006). Tuominen *et al.* (2011) aktualisieren nach neuen phylogenetischen Untersuchungen die Stämme I, III und IV und fügt noch die Unterteilung in a und b hinzu. Das in dieser Arbeit untersuchte Enzym AtACT1 (*At5g61160*; EC 2.3.1.64) gehört demnach zu den BAHD-Enzymen Stamm Ia (Tuominen *et al.*, 2011) gemeinsam mit den Malonyltransferasen. Nagata *et al.* postulierten 2005, dass das Gen *At5g61160* aus *A. thaliana* für eine Anthocyanin-5-aromatische Acyltransferase (AAT) kodiere. 2007 stellten (Luo *et al.*, 2007) fest, dass das Gen wahrscheinlich nicht für eine AAT kodiert, da die Genexpression unter hohen Saccharose-Bedingungen reprimiert war. Andere AAT-Gene sind unter diesen Bedingungen aktiviert. 2009 veröffentlichen Muroi *et al.*, (2009) Enzymassays, die zeigten, dass *At5g61160* für eine der BAHD-Acyltransferasenfamilie angehörenden, Agmatine *N*4-*p*-Cumaroyl-Transferase (AtACT1) kodiert (Muroi *et al.*, 2009). Aline Jakobitz zeigte in ihrer Diplomarbeit 2009 gemeinsam mit Tilo Lübken und Thoma Vogt vom IPB Halle, sowie Elke Blum von der MLU Halle-Wittenberg, parallel zu, dass rekombinante AtACT1 die Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin, sowie *p*-Cumaroyl- und Feruloylputreszin mit *p*-Cumaroyl-CoA oder Feruloyl-CoA und Agmatin bzw. Putreszin als Ausgangssubstrate talysiert.

1.5.2. GCN5-Acyltransferasen

In Solanaceen gibt es ebenfalls BAHD-Acyltransferasen wie z.B. die Fettsäure- ω -Hydroxyacid/Fettsäure-Alkohol-Hydroxycinnamoyltransferase (FHT) in Kartoffelpflanzen, die Feruloyl-CoA auf ω -Hydroxypalmitinsäure überträgt und somit an der synthese beteiligt ist (Serra *et al.*, 2010). Für die Biosynthese von HCAAs in Solanaceen wurde noch keine BAHD-Acyltransferase identifiziert. Als HCAA-Biosyntheseenzyme in *S. tuberosum* wurde die StTHT identifiziert und charakterisiert (Hohlfeld *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1999). Die Putreszin-*N*-Hydroxycinnamoyltransferase (StPHT; EC 2.3.1.138) ist

falls als verantwortliches Enzym für die HCAA-Biosynthese in Kartoffelpflanzen ben (Pushpa *et al.*, 2013). Die StTHT gehört zur GCN5-Acyltransferase Superfamilie (GNAT) und ist ein Homodimer (Schmidt, 1998). Bei der StPHT wurde bisher keine ordnung zu einer Proteinfamilie getroffen, aber eine Zugehörigkeit zur BAHD-Familie geschlossen, da kein HXXXD- und DFGWG-Motif in der Aminosäuresequenz gefunden wurde (Pushpa *et al.*, 2013). Bakterielle GNAT-Enzyme sind sehr gut charakterisiert, bishin zur Proteinkristallstruktur (Vetting *et al.*, 2005; Kuhn *et al.*, 2013; Srivastava *et al.*, 2014). Pflanzliche GNAT-Enzyme sind wenig beschrieben, neben der StTHT ist als Beispiel für pflanzliche GNAT-Enzyme noch eine Histon-H4-Acyltransferase (OsdIHAT1) aus *Oryza sativa* identifiziert wurden (Song *et al.*, 2015). Die Aminosäuresequenz der StTHT zeigt ße Homologie zur Säuger-Spermidin-/Spermin-Acetyltransferase (SSAT) (Lu *et al.*, 1996; Pegg, 2008; Bassard *et al.*, 2010). Eukaryotische SSATs, pflanzliche THTs und einige robiell antibiotischen GNATs haben zwei hoch konservierte Domänen mit vier Motiven (A-D). Das RGFGIGS-Motiv (Motiv A) besitzt drei Aminosäurereste R-G-G, die essentiell für die Aktivität der N-Acyltransferasen sind (Lu *et al.*, 1996; Hickman *et al.*, 1999; vastava *et al.*, 2014). Dabei soll Domäne I in die Acyl-CoA-Bindung involviert sein. Die Domäne II ist mit dem Polyaminsubstrat assoziiert (Hickman *et al.*, 1999). Das kann aber nicht bei allen GNATs gezeigt werden (Dyda *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2006). Der katalytische Mechanismus läuft ähnlich ab wie bei den BAHD-Enzymen (1.5.1) über ein tetrahedrales Intermediat bei dem der Acylrest direkt auf den Amin-Akzeptor übertragen wird. Hohlfeld *et al.* (1995) beschreiben einen geordneten Bi-Bi-Mechanismus der StTHT aus zellkultur. In der Literatur wurde auch über einen einen Ping-Pong-Mechanismus diskutiert, bei dem der Acylrest erst auf einen Cys-Rest im Enzym übertragen wird. Da dies aber zu einem kovalent gebundenen Acyl-Enzym-Intermediat führen würde, dass jedoch nicht nachgewiesen werden konnte, ist der geordnete Bi-Bi-Mechanismus wahrscheinlicher (Hohlfeld *et al.*, 1995; Dyda *et al.*, 2000).

Zur Substratspezifität der THTs wurden viele Untersuchungen durchgeführt. Die fel-THT ist in *P. infestans* infizierten Kartoffelblättern aktiviert und ist für die Kondensation von Feruloyl-CoA und *p*-Cumaroyl-CoA mit Tyramin zu Feruloyltyramin und *p*-Cumaroyltyramin verantwortlich, kann aber auch die Acyldonatoren Cinnamoyl-, Sinapoyl- oder Caffeyoyl-CoA und den Acylakzeptor Octopamin als Substrate für reamide (HCAAs) nutzen (Schmidt *et al.*, 1999). Die HCAAs Feruloyl-octopamin, Feruloyl-3'-methoxy-octopamin, *p*-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin akkumulierten in

wänden und im Medium von Elicitor behandelten Kartoffelzellkulturen (Keller *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1999; Back *et al.*, 2001).

Die Substratspezifität der StTHT ist, sowohl aus Kartoffelzellkulturen isoliert als auch rekombinant aus *Escherichia coli*, sehr breit. Das Substratspektrum umfasst Cinnamoyl-, Sinapoyl-, Feruloyl- und *p*-Cumaroyl-CoA als Acyldonoren und Tyramin, Optopamin, Dopamin und Noradrenalin als Acylakzeptoren (Hohlfeld *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1999). Rekombinante THT aus Paprika (*Capsium annuum*) zeigt eine ähnliche Substratspezifität, arbeitet aber nicht mit Dopamin und Noradrenalin als Acylakzeptorsubstrate (Back *et al.*, 2001). Die Serotonin-*N*-Hydroxy-cinnamoyltransferase (SHT) aus Paprika hat mit der THT aus Paprika 76% Sequenzidentität und 82% Similarität, trotzdem kann die THT keine Acylgruppen auf Serotonin übertragen, während die SHT beides als Akzeptor nutzen kann, Serotonin aber besser als Tyramin (Kang *et al.*, 2006).

1.6. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Acyltransferase AtACT1 (kodiert von *At5g61160*) und einem annotierten AtMATE-Transporter des zum *AtACT1* koexprimierten Gens *At3g23550* in der Nichtwirts-Resistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* aufzuklären. Desweiteren sollte untersucht, ob die Expression von *AtACT1* und *AtMATE* in *S. tuberosum* das HCAA-Muster in Kartoffelblättern verändert werden kann und welchen Einfluss eine solche Veränderung auf die Pathogenabwehr hat.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Pflanzen

2.1.1.1. *Arabidopsis thaliana*

Der verwendete *Arabidopsis-thaliana*-Ökotyp Columbia (Col-0) und Col-3 (*gl1*), sowie die *knock-out*-Linien *act1* SALK_097380 (genetischer Hintergrund Col-0), *mate1* SALK-062231 (genetischer Hintergrund Col-0) und *mate2* GK_411D06 (genetischer Hintergrund Col-0) stammen aus dem Saatgut vom European Arabidopsis Stock Centre (NASC) (Alonso *et al.*, 2003). Das Saatgut der *knock out*-Linie *pen2* (genetischer Hintergrund Col-3 (*gl1*)) wurde freundlicherweise von Volker Lipka (Georg-August-Universität, Göttingen) der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Das Doppelmutanten-Saatgut von *act1 mate1* und *pen2 act1* stellte freundlicherweise Lore Westphal (IPB Halle) zur Verfügung und *pen2 mate1* ist während dieser Arbeit entstanden. Alle Linien wurden vor ihrer Verwendung für Experimente genotypisiert (s. 2.2.9.).

2.1.1.2. *Solanum tuberosum*

Sowohl als Kontrollpflanzen für alle Kartoffelexperimente als auch zur Generierung der transgenen Kartoffelpflanzenlinien *AtACT1*, *AtMATE*, *p35S-ACT-p35S-MATE* und *p35S-ACT-pSTLS1-MATE* wurde der Wildtyp *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée verwendet, der freundlicherweise von Eckhard Tacke (Bioplant GmbH, Ebstorf) zur Verfügung gestellt wurde. Zusätzlich als Kontrollpflanzen in allen Kartoffelexperimenten dienten Leervektorkontrollpflanzen welche von Angelika Weinel (IPB Halle) mit dem Plasmidvektor pGPTV transformiert wurden.

2.1.2. Pathogen

2.1.2.1. *Phytophthora infestans*

Für Infektionsexperimente und *in-vitro*-Inhibierungsansätze wurden Zoosporen eines *P. infestans*-Isolates Cra208m2 verwendet, das stabil mit *GFP* (green fluorescent protein) transformiert ist (Si-Ammour *et al.*, 2003) und freundlicherweise von Felix Mauch (Universität de Fribourg, Schweiz) zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.3. Bakterien

Klonierungen wurde mit den *E.-coli*-Stämmen DH5 α , One Shot[®] TOP10 (life technologies (Invitrogen), Darmstadt) oder One Shot[®] Mach1[™] (life technologies (Invitrogen, Darmstadt) durchgeführt.

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* und *Nicotiana benthamiana* wurde *Agrobacterium tumefaciens* Stamm AGL0 (Lazo *et al.*, 1991) verwendet.

2.1.4. Chemikalien

Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten hatten Analysequalität. Chemikalien und Wasser die für die Herstellung von Methanolextrakten und für LC/MS-Messungen verwendet wurden hatten LC-MS-Qualität. Für alle anderen Laborexperimente wurde Bidest-Wasser verwendet welches 20 min bei 121°C autoklaviert wurde.

2.1.5. Medien

Tabelle 1 Medien

| Medium: | Inhaltsstoffe: | Verwendung: |
|---------|--|--|
| 2 MS | 4,41 g/l MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL) 6 g/l plant agar 20 g/l Saccharose pH 5,0 | Anzucht von sterilen Kartoffel- Meristemkulturen |
| 3 MS | 4,41 g/l MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL) 0,5 g/l MES 30 g/l Saccharose pH 5,8 | Stabile Transformation von Kartoffelblättern mittels <i>A. tumefaciens</i> |
| GMS | 16 g/l Glucose 0,5 g/l MES 4,41 g/l MS-Salze (Duchefa) pH 5,8 (6 g/l plant agar) | Grundlage für Medien FG75 und FG76 |
| FG 75 K | 1% Vitaminlg. (s.u.) 0,25 g/l Carbenicillin | Spross-Induktion nach stabiler Transformation |

| | | |
|--------------------|---|--|
| | 0,002 g/l Zeatinriboside 0,02 mg/l NAA 0,02 mg/l GA3 in GMS (s.o.) 0,05 g/l Kanamycin | von Kartoffelblättern tels <i>A. tumefaciens</i> |
| FG 76 K | 1% (v/v) Vitaminlsg. (s.u.) 0,1 g/l Carbenicillin 0,1 mg/l BAP 5 mg/l NAA in GMS (s.o.) | Kallus-Induktion nach stabiler Transformation von Kartoffelblättern mittels <i>A. tumefaciens</i> |
| Vitaminlösung | 0,5 g/l Nicotinsäure 0,5 g/l Pyridoxin-HCl 1 g/l Thiamin-HCl 2 g/l Glycin | Kartoffelanzuchtmedien |
| Hafer-Bohne-Medium | 34 g/l Bohnenmehl 17 g/l Hafermehl 8,5 g/l Saccharose 15 g/l Agar | Kultivierung und Zoosporenproduktion von <i>P. infestans</i> |
| LB | 10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Yeast Extract 5 g/l NaCl (15 g/l Agar) | Anzucht <i>E. coli</i> |
| YEB | 5 g/l Bacto-Beef Extrakt 1 g/l Hefe-Extrakt 5 g/l Bacto-Peptide 5 g/l Saccharose 2 mM MgSO ₄ | Anzucht <i>A. tumefaciens</i> Anzucht |
| Rye A | 60 g/l Roggen (Bio-Anbau) 20 g/l Saccharose 15 g/l Agar | <i>In-vitro</i> -Biotest Myzel-Wachstum von <i>P. infestans</i> |

2.2. Methoden

2.2.1. Nukleinsäuren-Isolierungen

2.2.1.1. DNA-Isolierung für Amplifizierung von Genen aus genomischer DNA

Um genomische DNA aus *Arabidopsis thaliana* oder Kartoffel-Blattmaterial sehr rein zu isolieren wurde das GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Deutschland) verwendet und nach dessen Protokoll isoliert.

2.2.1.2. DNA-Isolierung für Genotypisierungen aus *A. thaliana*-Blattmaterial

Es wurden 1-2 Blätter ca. 6 Wochen alter Pflanzen in Schraubgefäße (2 ml) mit Keramik-Kügelchen (Ermil; 1,25-1,6 mm) geerntet und sofort in flüssigen Stickstoff eingefroren. Gemörsert wurde das Blattmaterial unter flüssigen Stickstoff mithilfe eines FastPrep-24™-Homogenisators (MP Biomedicals, 6500 M/S; 2 × 20s). Die anschließende DNA-Isolierung erfolgte nach der „Quickprep“-Methode von (Weigel und Glazebrook, 2002).

2.2.1.3. DNA-Isolierung für Southernhybridisierungsanalysen

Dem gemörserten Blattmaterial (s. 2.2.1.2) wurde 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0; 50 mM EDTA; 500 mM NaCl; 1.5% SDS (w/v)) zugegeben, gemischt und für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl 5M Kaliumacetat(ohne pH-Einstellung) wurde für 10 min auf Eis inkubiert, 10 min zentrifugiert (4°C, 20817×g), der Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 µl Phenol/Chloroform/ Isoamylalkohol (25/24/1(v/v))-Gemisch (Carl Roth, Karlsruhe) wurde 1 h bei RT geschwenkt. Dann wurde für 5 min zentrifugiert (15294×g), die wässrige Phase abgenommen und diese mit 800 µl Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 20817×g und anschließendem Waschen des Pellets mit 70%igem Ethanol (rein) wurde das Pellet in 15 µl Wasser aufgenommen. Anschließend wurde die DNA mit entsprechenden Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben geschnitten (s. 2.2.7).

2.2.1.4. RNA-Isolierung für Northernhybridisierungsanalysen (Trizol-Methode mit Hochsalz)

Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana* oder Kartoffel-Blattmaterial wurde nach Chomczynski und Sacchi (1987) isoliert. Jedoch wurden beim Präzipitationsschritt statt 500

µl Isopropanol nur 250 µl Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) und 250 µl Hochsalzlösung (0,8 M Na-Citrat; 1,2 M NaCl; (Carl Roth, Karlsruhe)) zugegeben.

2.2.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

Die Auftrennung von DNA nach Fragmentlängen erfolgte in 1-2%igen (w/v) Agarosegelen (Biozym LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 2 mM EDTA) nach (Deininger, 1990). Als Größenmarker diente *PstI* geschnittene λ-Phagen-DNA für DNA-Fragmentgrößen von 500 bp bis 10.000 bp. Für Fragmente unter 500 bp wurde GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Thermo Scientific; St. Leon-Rot) verwendet. Vor Beladen des Gels wurde den Proben DNA-Probenpuffer (50% Glycerin (v/v), 120 mM EDTA pH 8,0; 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1% Bromphenolblau (w/v); Probe zu Puffer 5/1) zugegeben. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße und Elektrophoresekammertyp bei 35V-90V.

Die Auftrennung von Gesamt-RNA für Northernhybridisierung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 1%igen (w/v) Agarosegelen (Biozym LE Agarose, Biozym, Hessisch Oldendorf) mit 1x MEN-Puffer (200 mM MOPS, pH 7,0; 50 mM Natriumacetat; 5 mM EDTA; 5% (v/v) Formaldehyd) als Laufpuffer. 10 µg oder 20 µg Gesamt-RNA wurden in Wasser gelöst (Endvolumen: 18 µl). Dem wurde 5 µl RNA-Probenpuffer (bestehend aus: Formamid (42,4% (v/v)); 10 × MOPS (28,2% (v/v)); Formaldehyd (13,6% (v/v)); Wasser (5,6% (v/v)); Glycerin (5,6% (v/v)); Bromphenolblau (0,45% (v/v)) sowie 0,3 µl Ethidiumbromid (4M) zugegeben. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Ansätze 5 min bei 65°C inkubiert. Die Gesamt-RNA wurde bei 80 V aufgetrennt.

2.2.2. Southern-Blot für Southernhybridisierung

Die nach Größe aufgetrennten DNA-Fragmente im Agarosegel wurden 10 min in einem Ethidiumbromidbad (0,8 µg/ml) markiert und anschließend neben einem fluoreszierenden Lineal im Transilluminator fotografiert. Anschließend wurde das Gel 45 min in Rungslösung (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) geschwenkt, mit Wasser gewaschen und nochmals 45 min in Neutralisierungslösung (1,5M NaCl; 0,5 M Tris, pH 7,0) geschwenkt. Das anschließende Blotten erfolgte wie bei (Southern, 1975) und (Geerts *et al.*, 1994) und (Jansohn, 2007) beschrieben. Die kovalente Bindung der DNA an die positiv geladene ran (Roche, Basel, *crosslinking*) erfolgte durch UV-Strahlung (254 nm, 5× 8 W, UV ker™ 1800, Stratagene, Heidelberg). Die Nylonmembran wurde dann mit der Oberseite

nach Innen in ein Hybridisierungsröhre überführt und mit ca. 15 ml Hybridisierungspuffer (0,9 M NaCl; 50 mM NaH₂PO₄; 5 mM EDTA; 0,1% SDS; 50% Formamid (v/v); 0,2% PVP 40; 0,2% Ficoll 400; 0,2% BSA; 100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA) 1 h bei 42°C im Hybridisierungssofen vorhybridisiert.

2.2.3. Northern-Blot für Northernhybridisierung

RNA-Transfer auf positiv geladene Nylonmembranen erfolgte anlag 2.2.2, jedoch ohne Denaturierungs- und Neutralisierungsschritte.

2.2.4. Herstellung radioaktiv markierter Sonden und Hybridisierung

Als Sonde für Northern- oder Southernhybridisierung dienten genspezifische DNA-Fragmente. Diese wurden entweder mittels Restriktionsenzymen aus, das nachzuweisende Gen enthaltender, Plasmid-DNA heraus geschnitten (s. 2.2.7) oder mittels genspezifischer Primer über PCR amplifiziert (s.). Die so gewonnenen Fragmente wurden nach Auftrennung im Agarosegel mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Im Weiteren wurde die Sonde nach dem Protokoll des Amersham Megaprime DNA Labeling System, dNTP-Kit (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg) hergestellt. Als radioaktives Nukleotid diente α P³²-dATP (Hartmann Analytic, Göttingen). Die radioaktiv markierte Sonde wurde zum Hybridisierungspuffer der vorhybridisierten Nylonmembran gegeben und für 24-72 h bei 42°C im Hybridisierungssofen hybridisiert.

2.2.5. Waschen der Nylonmembran und Storage Phospho-Screen – Analyse

Nach der Hybridisierung wurde die Nylonmembran dreimal 20 min mit 3× SSC; 0,1 (v/v) bei 65°C gewaschen und anschließend in Frischhaltefolie eingeschlagen und für 1 d - 7 d in eine Metallkassette mit einem Storage Phosphor *screen* gelegt. Das Auslesen der Signale auf dem *screen* erfolgte mit dem Typhoon 9410 Variable Mode Imager oder Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg).

2.2.6. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Wenn nicht anders vermerkt, wurde folgendes Standard-Protokoll für PCRs verwendet:

Tabelle 2 Standard-Protokoll für PCR mit Pfu-DNA-Polymerase und DreamTaq-DNA-Polymerase (Fermentas Thermo Scientific)

| Komponente | Volumen im 50 µl-Ansatz | Endkonzentration im Reaktionsansatz |
|------------------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| H ₂ O | 36 µl | - |
| Genomische DNA oder Plasmid-DNA | 1 µl | 10 pg-1 µg |
| 10× PCR-Puffer | 5 µl | 1× |
| 2 mM dNTPs | 5 µl | 200 µM |
| 100 µM 5'-Primer | 1 µl | 2 µM |
| 100 µM 3'-Primer | 1 µl | 2 µM |
| DNA-Polymerase | 1 µl | 1,5 U (DreamTaq); 0,75 U (Pfu) |

Tabelle 3 Standard-Thermalprofil im Thermocycler für PCR mit Pfu-DNA-Polymerase und DreamTaq-DNA-Polymerase (Fermentas Thermo Scientific)

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklenzahl | PCR-Schritt |
|---------------------------|---------------------|------------|----------------------|
| 94 | 2 min | 1 | Initialdenaturierung |
| 94 | 20 sec | 30-40 | Denaturierung |
| Primer T _m – 5 | 30 sec | | Annealing |
| 72 | 1 min/kb (DreamTaq) | | Verlängerung |
| | 2 min/kb (Pfu) | | |
| 72 | 7 min | 1 | End-Verlängerung |

Tabelle 4 Standard-Protokoll für PCR mit Herculase II Fusion-DNA-Polymerase (Agilent Technologies Genomics)

| Komponente: | Volumen im 50 µl-Ansatz: | Endkonzentration im Reaktionsansatz: |
|------------------------------------|--------------------------|--|
| H ₂ O | X µl zu Endvolumen 50 µl | - |
| Genomische DNA oder Plasmid-DNA | X µl | 100-400 ng genomische DNA 1-30 ng Plasmid-DNA |
| 5× Herculase II Reaktionspuffer | 10 µl | 1 x |
| 25 mM dNTPs | 0,5 µl | 250 µM |
| 10 µM 5'-Primer | 1,25 µl | 0,25 µM |
| 10 µM 3'-Primer | 1,25 µl | 0,25 µM |
| DMSO | X µl | 0-8% |
| DNA-Polymerase | 1 µl | nicht angegeben |

Tabelle 5 Standard-Thermalprofil im Thermocycler für Herculase II Fusion-DNA-Polymerase (Agilent Technologies Genomics)

| Temperatur (°C) | Zeit | Zyklenzahl | PCR-Schritt |
|---------------------------|-----------|------------|----------------------|
| 95 | 1 min | 1 | Initialdenaturierung |
| 95 | 20 sec | 30-40 | Denaturierung |
| Primer T _m - 5 | 20 sec | | Annealing |
| 72 | 30 sec/kb | | Verlängerung |
| 72 | 3 min | 1 | End-Verlängerung |

2.2.7. Restriktionsverdau

Die isolierte Plasmid-DNA wurde durch Restriktion mit drei verschiedenen Enzymen der Firmen Fermentas Thermo Scientific oder New England BioLabs überprüft. Dafür wurden 1 U Restriktionsenzym und ca. 2 µg Plasmid-DNA in 20 µl eingesetzt.

2.2.8. Kreuzung der *Arabidopsis thaliana*-Mutanten *pen2* und *mate1*

Die Kreuzung von *pen2*- und *mate1*-Pflanzen erfolgte nach (Landtag, 2006).

2.2.9. Genotypisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

Alle in der Arbeit verwendeten *A. thaliana*-Mutanten (s.2.1.1.1) wurden genotypisiert, um das Arbeiten mit nicht homozygoten Pflanzen zu vermeiden. Dafür wurde DNA aus Blättern wie unter 2.2.1.2 beschrieben isoliert. Die Mutation im *PEN2*-Gen wurde mit Hilfe eines CAPS-Markers (*cleaved amplified polymorphic sequence*) nachgewiesen (Lipka *et al.*, 2005). Nach Restriktionsverdau (s. 2.2.7) der PCR-Produkte mit dem Enzym AlwI konnte zwischen Wildtyp- und Mutanten-Allel unterschieden werden (s. Anhang; 7.3.)

Alle anderen Mutanten waren SALK- oder GABI-KAT-T-DNA-Insertionslinien (*act1*, *mate1*) und wurden durch genspezifische Primer in Kombination mit Border-Primern (s. Anhang; 7.3.) genotypisiert.

2.2.10. Klonierungen

2.2.10.1. *AtACT1*-cDNA ohne Stoppkodon-Klonierung in pENTR

Die cDNA von *At5g61160* (*AtACT1*) wurde aus der Plasmid-DNA des Klonen pENTR-*AtACT1* (Vektorkarte s. Anhang) über PCR (s.2.2.6, Primer s. Anhang, 7.3.) ohne Stoppkodon amplifiziert. Diese Plasmid-DNA war bereits durch vorherige Arbeiten in der Arbeitsgruppe vorhanden. Anschließend wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese in einem 1%igen (v/v) Agarosegel aufgetrennt und die DNA der 1356 bp großen Bande mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Dieses *AtACT1*-cDNA-o.S.-Fragment wurde in den pENTR™/D-TOPO®-Vektor (life technologies (Invitrogen), Darmstadt) nach dem Protokoll des Herstellers kloniert. Hierzu wurden 2 µl des Klonierungsreaktions-Ansatzes zu 50 µl chemikompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (von Ulrike Smolka zur Verfügung gestellt) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgten 30 s Hitzeschock bei 42°C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde den Zellen unter sterilen Bedingungen 250 µl LB-Medium zugegeben und anschließend bei 37°C für ca. 1 h bei 150 rpm in einem Brutschrank inkubiert. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurden 20 µl und 100 µl auf Kanamycin-LB-Selektionsplatten (100 µg/ml Spectinomycin) ausplattiert, und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10.2. *AtMATE*-Klonierung in pENTR

Die cDNA von *At3g23550* (*AtMATE*) wurde aus der Plasmid-DNA des Klonen U18345 (tair-Stock: 3986246; Vektor: pUNI51; Donor: Ronald Davis, Athanasios Theologis, Joseph Ecker (SSP Consortium: Salk, Stanford, PGEC)) über PCR (s.2.2.6., Primer s. Anhang, 7.3.) mit und ohne Stoppkodon amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte

durch Gelelektrophorese in einem 1%igen (v/v) Agarosegel aufgetrennt und die DNA der 1410 bp bzw. 1407 bp großen Banden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, den) isoliert. Diese DNA wurde, wie unter 2.2.10.1. beschrieben in pENTR™/D-TOPO® kloniert und DH5α-Einzelkolonien generiert. 2 µl des Klonierungsreaktions-Ansatzes den dann zu 50 µl chemikompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (von Ulrike Smolka zur gung gestellt) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgten 30 s Hitzeschock bei 42 °C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde den Zellen unter sterilen Bedingungen 250 µl LB-Medium zugegeben und anschließend bei 37 °C für ca. 1 h bei 150 rpm inkubiert. Danach wurden 20 µl und 100 µl auf Kanamycin-LB-Selektionsplatten (50 µg/ml Kanamycin) plattiert um Einzelkolonien zu erhalten und diese über Nacht bei 37°C inkubiert

2.2.10.2.1. pENTR-*AtACT1*-cDNA o.S.- und pENTR-*AtMATE*-cDNA-Plasmid-DNA-Präparation aus *E. coli*

Anschließend wurden 10 Einzelkolonien unter sterilen Bedingungen mit sterilen Pipettenspitzen gepickt und "Minipräparationen" angimpft, d.h. jede Einzelkolonie wurde zuerst auf eine LB-Master-Platte (50 µg/ml Kanamycin) gedippt und dann in 2 ml LB-Medium (50 µg/ml Kanamycin) in 10-ml-Zellkulturröhrchen (Greiner bio one, Frickenhausen) überführt. Die Zellkulturröhrchen und die beimpfte LB-Platte wurden über Nacht bei 37°C inkubiert, die Röhrchen zusätzlich bei 150 rpm im Inkubator ~~Die Isolierung~~ der Plasmid-DNA der Übernachtskulturen erfolgte nach dem Protokoll von (Bimboim und Doly, 1979). Die Plasmid-DNA wurde mit unterschiedlichen enzymen (Fermentas, Thermo Scientific; St. Leon-Rot) nach Herstellerangabe 2h bei 37°C geschnitten (s. 2.2.7) und im 1%igen Agarosegel (v/v) aufgetrennt. Von Kolonien mit rekten Plasmid-DNA-Fragmentgrößen wurden größere Plasmid-Präparationen angesetzt. Die Übernachtskulturen wurden unter sterilen Bedingungen in 300-ml-Erlenmeyerkolben angesetzt (50 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Kanamycin). Das Animpfen erfolgte von der LB-Master-Platte. Von der Übernachtskultur (37°C, 150 rpm) wurde 1 ml steril entnommen und mit 50%iger Glycerinlösung (v/v) gemischt und sofort in flüssigen Stickstoff ren und als Glycerinstock bei -80°C gelagert. Die restlichen 49 ml Übernachtskultur wurde in 50-ml- Schraubgefäße (Greiner bio one, Frickenhausen) überführt. Die Plasmid-DNA wurde mithilfe eines QIAfilter Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) nach dessen Protokoll isoliert. Die Plasmid-DNA mit der *AtACT1*-cDNA o.S.- bzw. *AtMATE*-cDNA-Sequenz wurde sequenziert (eurofins mwg/operon (Ebersberg)), um nur mit Plasmid-DNA

zuarbeiten, die keinerlei Mutationen enthielt. Da sowohl der pENTR-Vektor als auch der Zielvektor pGWB14 eine Kanamycinresistenzkassette hatten, wurde mit dem Enzym PvuII gespalten und die Fragmente anschließend mit Ethanol gefällt (Deining, 1990). Da der Zielvektor für *AtACT1*-cDNA-o.S., pUBC-YFP-Dest (Grefen *et al.*, 2010), eine Spectinomycinresistenzkassette enthält (Vektorkarten s. Anhang 7.2.), waren onsspaltung und Ethanolfällung bei pENTR-*AtACT1*-cDNA-o.S. nicht notwendig.

2.2.10.3. *AtACT1*- und *AtMATE*-Klonierung in pGWB14

Der Entry-Klon pENTR-*AtACT1*-cDNA (Vektorkarte s. Anhang 7.2.) war durch vorangegangene Arbeiten in der Arbeitsgruppe vorhanden. Auch dieser Vektor wurde sequenziert (eurofins mwg/operon (Ebersberg)), um eventuelle Mutationen in der cDNA-Sequenz auszuschließen. Beide Entry-Klone pENTR-*AtACT1* und pENTR-*AtMATE* (siehe 2.2.10.2) wurden mittels Gateway® LR Clonase™ II (Life Technologies (Invitrogen), Darmstadt) in den Destinations-Vektor pGWB14 (Vektorkarten s. Anhang 7.2.) kloniert. Das nach Herstellerprotokoll wurde dahingehend modifiziert, dass die Reaktion bei RT statt für eine Stunde, über Nacht inkubiert wurde. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 µg Proteinase K wurden 1 µl Ligationsansatz verwendet, um wie unter 2.2.10.1 beschrieben mittels DH5α-Einzelkolonien zu generieren. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgten 30 s Hitzeschock bei 42 °C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde den Zellen unter sterilen Bedingungen 250 µl LB-Medium zugegeben und anschließend bei 37 °C für ca. 1 h bei 150 rpm im Inkubator inkubiert. Danach wurden 20 µl und 100 µl auf Kanamycin-LB-Selektionsplatten (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert um Einzelkolonien zu erhalten und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10.4. *AtACT1*-cDNA o.S. in pUBC-YFP-Dest

Die Entry-Klonen pENTR-*AtACT1*-cDNA-o.S. (siehe 2.2.10.1) wurden analog 2.2.10.3 in den Destinations-Vektor pUBC-YFP-Dest (Grefen *et al.*, 2010) Vektorkarten s. Anhang 7.2.) kloniert. Wie unter 2.2.10.1 beschrieben, wurden mittels DH5α Einzelkolonien riert, die LB-Selektionsplatten enthielten statt 50 µg/ml Kanamycin 100 µg/mL mycin., mit einer Ausnahme: die Reaktion wurde nicht für eine Stunde bei RT inkubiert, sondern über Nacht. Nach Abstoppen der Reaktion mit 2 µg Proteinase K wurden 1 µl Ligationsansatz zu 50 µl chemikompetenter *E. coli* DH5α-Zellen (von Ulrike Smolka zur Verfügung gestellt) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgten 30 s Hitzeschock

bei 42 °C. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde den Zellen unter sterilen Bedingungen 250 µl LB-Medium zugegeben und anschließend bei 37 °C für ca. 1 h bei 150 rpm im Inkubator inkubiert. Danach wurden 20 µl und 100 µl auf Kanamycin-LB-Selektionsplatten (100 µg/ml Spectinomycin) ausplattiert um Einzelkolonien zu erhalten und diese über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10.5. Golden-GATE-Klonierung von *AtACT1* und *AtMATE* in pICH52292

Für Golden-Gate-Klonierungen durften keine *BsaI*- oder *BpiI*-Restriktionsschnittstellen in den zu klonierenden Genen vorhanden sein. Deshalb wurden alle entsprechenden Schnittstellen in *AtACT1* und *AtMATE* still gelegt, indem mit Primern eine Standard-PCR mit der Polymerase Pfu (siehe 2.2.1.) durchgeführt wurde, die die Schnittstelle über die Wobbleposition im Codon austauschten, ohne eine Mutationen in der Aminosäuresequenz zu verursachen. Man erhielt dann jeweils drei Sequenzfragmente pro Gen, die einen spezifischen Überlapp von 4 bp und gleichzeitig an beiden Enden die Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym Typ IIS *BpiI* (Fermentas Thermo Scientific, St. Leon-Rot) auswiesen. Für *AtMATE* wurde neben der cDNA auch das erste Intron amplifiziert. Die Klonierungsschritte: Level 0, Level 1 und Level 2 erfolgte nach den Protokollen von Engler *et al.* (2009) und (Weber *et al.*, 2011) und mit den angegebenen Vektoren des folgenden Klonierungsstrategieplanes (Abb. 1, Vektorkarten: S. Anhang).

Die Vektoren für die Klonierung wurden freundlicherweise von Sylvestre Marillonnet (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt.

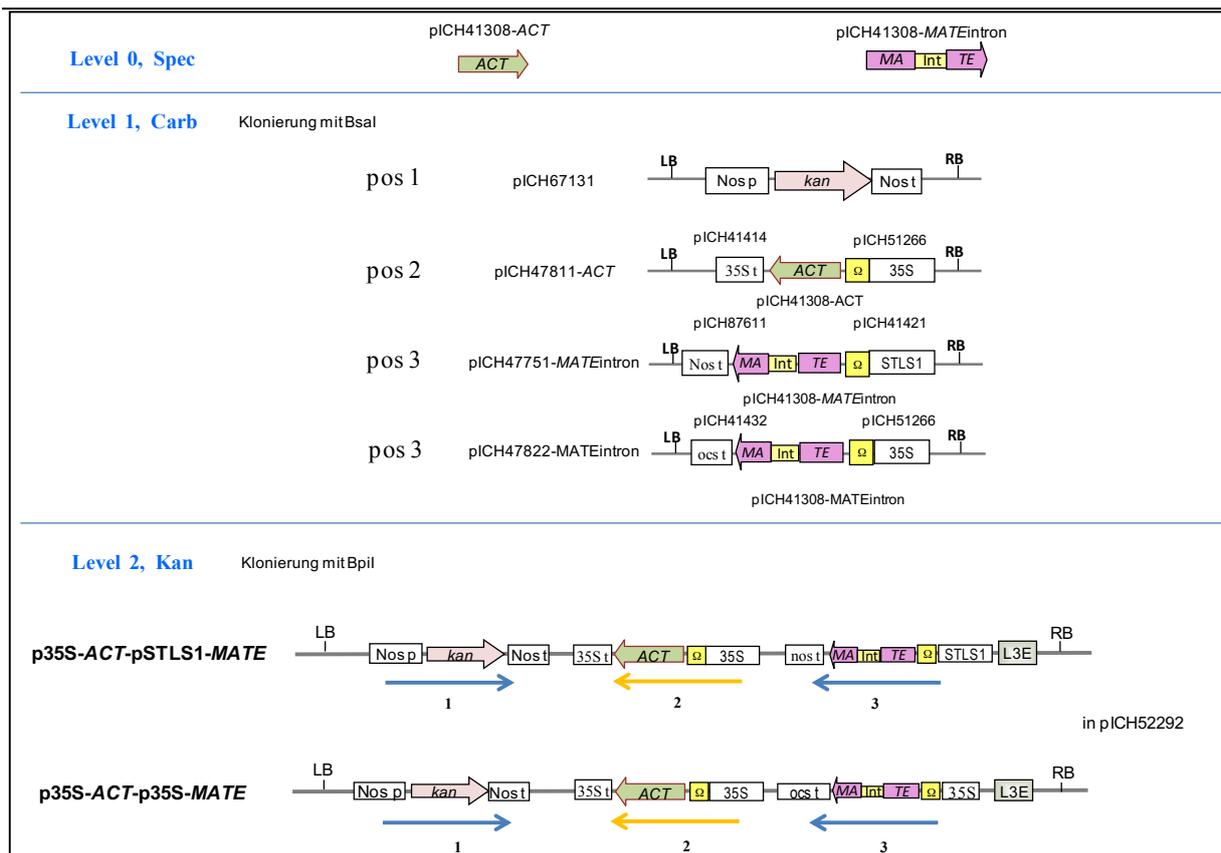


Abbildung 6: Golden-Gate-Klonierungsstrategie für die Transformation von p35S-*ACT*-pSTLS1-*MATE* und p35S-*ACT*-p35S-*MATE* in *Solanum tuberosum*. *ACT* – *AtACT1*-Gen; *MATE* – *AtMATE*-Gen; kan – Kanamycin-Resistenzkassette; Nos p – Nopalinsynthese-Promotor; 35S – CaMV 35S-Promotor; STLS1 – Blatt spezifischer Promotor aus *S. solanum* (Stockhaus *et al.*, 1989); Ω – 5'-untranslatierte Sequenz (Omega-Sequenz); Nos t – Nopalinsynthese-Terminator; 35S t – CaMV 35S-Terminator; ocs – Octopaminsynthese-Terminator; L3E – endlinker für drei klonierte Elemente

2.2.11. Transformation von kompetenten *A. tumefaciens* AGL-0-Zellen

Die Transformation von *Agrobacterium-tumefaciens*-AGL-0-Zellen mit pGWB14-*AtACT1*, pGWB14-*AtMATE*, pICH52292-p35S-*ACT*-p35S-*MATE* oder pICH52292-p35S-*ACT*-pSTLS1-*MATE* erfolgte nach (Hofgen und Willmitzer, 1988).

2.2.12. Plasmid-DNA-Isolierung aus *A. tumefaciens*

Zur Überprüfung der Transformation von *A. tumefaciens* mit dem entsprechenden Plasmid wurde die Plasmid-DNA über das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) mit genden Abweichungen vom Protokoll durchgeführt: Nach Zugabe von Puffer P2 wurde 5 min bei RT inkubiert, nach der Zugabe von Puffer N3 wurde 20 min zentrifugiert (17900 ×g). Die Elution erfolgte mit 21 µl 70°C heißem Wasser, wobei 20 µl für einen Verdau mit

entsprechenden Restriktionsenzym eingesetzt wurde und 1 µl für eine eventuelle PCR mit spezifischen Primern, wenn der Restriktionsverdau nicht funktioniert hatte.

2.2.13. Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen mit *A. tumefaciens*

Mit den Klonierungsprodukten aus 2.2.10 in *A. tumefaciens* wurden Kartoffel-Wildtyp-pflanzen aus der Meristem-Sterilkultur transformiert. Mit folgenden Änderungen wurden die Kartoffel-Blatt-Transformationen nach (Feltkamp *et al.*, 1995; Rocha-Sosa *et al.*, 1989) durchgeführt. Die entsprechende Agrobakterienkultur wurden zwei Tage in 20 ml YEB-Medium (s. 2.1.5) mit entsprechendem Antibiotikum bei 28°C und 130 rpm im Inkubator angezogen. Anschließend in ein steriles 50-ml-Schraubgefäß überführt und 10 min bei 2057 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml 10 mM steriler MgSO₄-Lösung resuspendiert und erneut 10 min bei 2057 ×g, zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml 3MS-Medium (s. 2.1.5) durch Schwenken auf Eis gelöst und verblieb dort bis zum weitem Gebrauch. Von pflanzen aus der Meristem-Sterilkultur wurden dann 5-6 Blätter mit dem Skalpell schnitten und mit der Blattoberseite nach unten auf steriles, in 3MS-Medium getränktes Filterpapier gelegt. Mittels Skalpell wurde der Stengelansatz entfernt., Anschließend wurde die Blattfläche 4-5 mal über die Mittelrippe eingeringelt und danach die Blätter mit der te nach unten in Petrischalen mit 10 ml 3MS-Medium gelegt und 100 µl suspension zum Medium gegeben. Pro Transformation wurden sechs Petrischalen angesetzt. Diese wurden mit Aluminiumfolie umwickelt und zwei Tage in der Phytokammer unter Meristem-Sterilkulturbedingungen inkubiert (s. 2.2.19). Die Blätter wurden aus der suspension kurz auf steriles Filterpapier gelegt und danach, wiederum mit der Unterseite nach oben, in Plastiktöpfe (OS80Box/green filter, ø 90 mm Boden, ø 115 mm Deckel, he 80 mm; Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande), die ca. 100 ml Kallus induzierendes FG76 K-Medium (s. 2.1.5) enthielten, überführt. Die Inkubation erfolgte ab diesen punkt in der Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20°C, ~150 µE m⁻² s⁻¹, 8 h Dunkel, 18°C). Nach einer Woche wurde auf Spross-induzierendes FG75 K (s. 2.1.5) umgesetzt und von da an im 14-tägigen Rhythmus auf frisches FG75 K, bis die Sprosse groß genug zum Abschneiden und Umsetzen auf 2MS-Medium mit Kanamycin (s. 2.1.5) waren. Bekamen die Sprosse dann Wurzeln, konnten sie alle zwei bis vier Wochen auf 2MS-Medium ohne Selektions-Antibiotikum gesetzt werden. Zur Überprüfung ob die

Transformation der Kartoffelpflanzen erfolgreich war wurden Northen- und ridsierungsanalysen (s. 2.2.2 ff.) durchgeführt.

2.2.14. Transiente Transformation von Tabakpflanzen mit *A. tumefaciens*

Die Transformation von *Nicotiana benthamiana* für die transiente Expression von pUBC-*AtACT1*-YFP erfolgte unter Coexpression von mCherry-Plasmamembranmarker pm-rk *CD3-1007* (Nelson *et al.*, 2007) nach Van den Ackerveken *et al.* (1996) und Marois *et al.* (2002) durch die Infiltration der Blätter mit nadellosen Spritzen (1 ml).

2.2.15. Transformation von Arabidopsis-Protoplasten

Die Präparation und Transformation von Mesophyll-Protoplasten erfolgte durch Dr. Lennart Eschen-Lippold nach dem Protokoll von (Yoo *et al.*, 2007). Zur Transformation wurden 10 µg pUBC-*AtACT1*o.S.-YFP-Plasmid-DNA pro 100 µl Protoplasten-Suspension eingesetzt.

2.2.16. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Die Aufnahmen der YFP- und mCherry-Fluoreszenz (siehe 2.2.14.) erfolgte mit einem inversen Konfokalmikroskop LSM 710 und der zugehörigen Software ZEN2009 (Zeiss, Jena). Die Anregung erfolgte durch einen Argonlaser mit einer Anregungswellenlänge für YFP von $\lambda_{\text{Ex}} = 514$ nm und für mCherry $\lambda_{\text{Ex}} = 594$ nm. Die Detektion der YFP-Emission erfolgte bei $\lambda_{\text{Em}} = 520\text{-}578$ nm und die von mCherry bei $\lambda_{\text{Em}} = 598\text{-}643$ nm.

2.2.17. Zoosporengewinnung von *P. infestans*

Die Erhaltung der Dauerkulturen von *P. infestans* und das Animpfen der Erlenmeyerkolben (50 ml) mit Hafer-Bohne-Medium (s. 2.1.5) für die Infektionsexperimente wurde cherweise von Andreas Matern, Marina Häußler oder Lore Westphal übernommen. dem die Kolben 11 d mit *P.-infestans*-Myzel überwachsen, wurde bei jedem Kolben das zel mit 4 ml Wasser überschichtet und die Kolben anschließend zum Sporulieren für 3,5 h in die Kühlkammer (4°C) gestellt. Die Kolben lagen dabei schräg, damit das Myzel mit Wasser benetzt war. Anschließend wurden die Sporensuspensionen der einzelnen Kolben vereinigt und über eine doppelt gelegte feinmaschige Gaze (PE-Gewebe, 20 µm

ße) auf Eis filtriert. Die Sporenkonzentration wurde durch Überprüfung der Sporenzahl über eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer oder ein Luna-Zellzählgerät (logos biosystems, Annandale, VA, USA) eingestellt.

2.2.18. Gewinnung von *P.-infestans*-Sporangien

Auch hier wurden 11 d altes *P.-infestans*-Myzel auf Hafer-Bohne-Medium verwendet. Das Myzel wurde mit 8 ml Wasser überschichtet, der Kolben kurz und kräftig geschüttelt und dann das Wasser mit den Sporangien vorsichtig in einen Kolben auf Eis überführt. Die Sporangienkonzentration im Wasser wurde über eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt und mit Wasser auf die erforderliche Konzentration verdünnt.

2.2.19. Kulturführung der Kartoffel-Meristem-Sterilkultur

Für stabile Transformationen von Kartoffelpflanzen und zur Erhaltung und Vermehrung der Kartoffellinien wurden die Linien in Meristem-Sterilkulturen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, 1962) mit Carbenicillin oder Cefotaxim (500 mg/l) gehalten. Alle vier Wochen wurden unter sterilen Bedingungen die Sprossspitzen von 4 Kartoffelpflanzen mit dem Skalpell abgeschnitten und mit einer Pinzette in einen Plastiktopf (OS80Box/green filter, ø 90 mm Boden, ø 115 mm Deckel, Höhe 80 mm; Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) der ca. 100 ml MS-Medium enthielt umgesetzt. Nach einer Woche in der Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20°C, ~150 µE m⁻² s⁻¹; 8 h Dunkel, 18°C) bekamen die Sprossspitzen Wurzeln und nach ca. drei Wochen konnten die Pflanzen in Erde ausgetopft oder zur Vermehrung genutzt werden.

2.2.20. Probennahme für LC/MS/MS-Messungen von *A. thaliana*

A. thaliana Wildtyp-Linien wurden als Kontrolllinien im Vergleich zu den *knock out*-Linien *act1*, *mate1*, *mate2*, *mate1 act1*, *pen2*, *pen2 act1*, *pen2 mate1* verwendet. Die Aussaat erfolgte rallel auf dampfsterilisiertem Einheitserde-Vermiculit-Gemisch (3:1). Nach zweitägiger Stratifizierung (dunkel, 4°C) erfolgte die Anzucht der Pflanzen in einer Phytokammer unter Kurztagsbedingungen (8 h Licht, ~150 µE m⁻² s⁻¹, 16 h Dunkel, 22°C, 60% rel. tigkeit). Nach sechs Wochen wurden die Pflanzen mit einer *P.-infestans*-Zoosporensuspension (Konzentration: 5×10⁵ Zoosporen/ml) inokuliert. Diese Zoosporensuspension war ein Sterilfiltrat der *P.-infestans*-Zoosporensuspension oder Wasser, das sich

zuvor 3,5 h auf Hafer-Bohne-Medium (s. 2.1.5) befand. Jede Pflanze wurde mit $30 \times 10 \mu\text{l}$ des jeweiligen Inokulums ($5 \times 10 \mu\text{l}$ pro Blatt, je 6 Blätter pro Pflanze) behandelt. Nach 24 h Inkubation in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20°C , $\sim 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 8 h Dunkel, 18°C , 60% rel. Luftfeuchtigkeit) wurden die 30 Tropfen des Inokulums pro Pflanze abgenommen und vereinigt. Zusätzlich wurde ein Blatt pro Pflanze geerntet, welches vorher mit fünf Tropfen inokuliert war. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.21. Probennahme für LC/MS/MS-Messungen von *S. tuberosum*

Drei Wochen alte Kartoffelpflanzen (transgene *AtACT1*-, *AtMATE*- oder *AtACT1-AtMATE*- exprimierende, sowie Kontrollpflanzen Desirée (Wildtyp) und Leervektor-Pflanzen *pGPTV*) wurden aus der Meristem-Sterilkultur (s. 2.2.19) in Töpfe mit gedämpftem Erde-Sand-Gemisch (1:1) umgesetzt und unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 20°C , $\sim 150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 8 h Dunkel, 18°C , 60% rel. Luftfeuchtigkeit) in einer Phytokammer angezogen. Nach drei Wochen wurden drei Blätter der oberen Blattetagen mit einer *P. infestans*-Zoosporen-Suspension (s. 2.2.17., Konzentration: 1×10^5 Zoosporen $\times \text{ml}^{-1}$), z.Teil einem Sterilfiltrat der *Phytophthora infestans* Zoosporen-Suspension oder Wasser, welches sich zuvor 3,5 h auf Hafer-Bohne-Medium (s. 2.1.5) befand, inokuliert (je Blatt $10 \times 10 \mu\text{l}$ Inokulat auf die Blattunterseite. Die infizierten Blätter wurden sofort mit einem Rotilabo-Kordelzugbeutel (160 mm \times 240 mm, Carl Roth, Karlsruhe) umhüllt, um die notwendige Luftfeuchtigkeit für die *P. infestans*-Zoosporenkeimung und ein Verdunsten des Inokulums zu verhindern. Nach 24 h wurden die 30 Tropfen des Inokulums pro Pflanze abgenommen und vereinigt. Zusätzlich wurden 12 Blattscheiben (\varnothing 6 mm, 4 pro Blatt) mithilfe eines Korkbohrers ausgestanzt und in Schraubgefäßen (2 ml) mit Keramik-Kügelchen (Ermil; 1,25-1,6 mm) vereinigt. Alle Proben wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.22. LC/MS/MS-Messungen

Arabidopsis-Blätter oder Kartoffel-Blattscheiben wurde unter flüssigen Stickstoff in Schraubgefäßen (2 ml) mit Keramik-Kügelchen (Ermil; 1,25-1,6 mm) gemörsert (FastPrep-24TM-Homogenisator, MP Biomedicals, 6500 M/S; $2 \times 20\text{s}$). Danach wurde pro 100 mg Pflanzenbiomasse $200 \mu\text{l}$ Methanol/Wasser (80/20 (v/v)) zugegeben und erneut $2 \times 20\text{s}$ bei 6500 M/S gemischt. Nach 15 min Ultraschallbad bei 20°C wurden die Proben für 5 min zentrifugiert ($20817 \times g$, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß

dorf; 1,5 ml) überführt und auf Eis gestellt. Zum Sediment wurde nochmals nol/Wasser (80/20 (v/v), 200 µl/100 mg Biomasse) zugegeben, gemischt, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Der Überstand wurde zum ersten Überstand überführt und die vereinigten Überstände wurden zentrifugiert (5 min, 20817 ×g, 4°C). Über einen PTFE-Filter (0,22 µm Porengröße, Whatman) wurden die Überstände in HPLC-Gefäße (glas, 0,3 ml, Chromacol LTD) transferiert.

Die nach 24 h gesammelten Tropfenproben wurden 10 min zentrifugiert (20817 ×g, 4°C) und direkt in HPLC-Mikrogefäße (Amber Glass Qsert screw Top Vial, Waters) überführt.

Die chromatographische Trennung der Metaboliten erfolgte mit einem Acquity UPLC-System (Waters, Eschborn) an einer HSS T3 (100 × 1,0 mm, Partikelgröße 1,8 µm, Waters, Eschborn). Das Injektionsvolumen betrug 5 µl.

Tabelle 6 Programm der UHPLC-Gradiententrennung.

Laufmittel A: Wasser mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure

Laufmittel B: Acetonitril mit 0,1 % (v/v) Ameisensäure

| Zeit [min] | Volumen [mL] | A [%] | B [%] |
|------------|--------------|-------|-------|
| 0 | 0 | 95 | 5 |
| 1 | 0,15 | 95 | 5 |
| 5 | 0,6 | 75 | 25 |
| 10 | 0,75 | 5 | 95 |
| 12 | 0,3 | 5 | 95 |
| 12,1 | 0 | 95 | 5 |
| 15 | 0,435 | 95 | 5 |

Die eluierten Substanzen wurden in einem Bereich von $m/z = 50-1000$ mittels eines koppelten micrOTOF-Q II Hybrid Quadrupol *time-of-flight* Massenspektrometers (Bruker Daltonics) mit Apollo II Elektrospray-Ionen-Quelle vermessen. Die Detektion erfolgte wohl im positiven als auch bei einigen Experimenten im negativen Ionisierungsmodus: Sprayergas: Stickstoff; 1,2 bar; Trockengas: Stickstoff, 8 L/min, 190°C; Kapillare: -4500 V; end plate offset: -500 V; funnel 1 RF, 200 V; funnel 2 RF, 200 V; in-source CID energy: 0 V; hexapole RF: 100 V; quadrupole ion energy: 5 eV; Kollisionsgas: Stickstoff; energie: 8 eV; collision RF: 120 V (timing 50/50); transfer time, 70 µs; pre pulse storage, 4 µs; pulser frequency, 10 kHz; spectra rate, 2 Hz. Die MS-Chromatogramme wurde im

Centroid Modus aufgezeichnet. Die Kalibrierung erfolgte über Lithiumformiat-Cluster-Ionen nach automatischer Injektion von 20 µl 10 mM LiOH in nol/Wasser/Ameisensäure (49,9/49,9/0,2 (v/v/v)) bei einer Retentionszeit von 12 min über ein Nebenventil.

MS-Rohdaten wurden mittels CompassXport (<http://www.bdal.de>) ins mzData-Format konvertiert anschließend . Für die Prozessierung mittels XCMS (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/xcms.html>) wurden folgende Parameter verwendet: snthr=5, method='centWave', ppm=25, peakwidth=c(5,12), snthr=snthr, verbose.columns=F, scanrange=c(50,1020), prefilter=c(3,500), Daten gruppieren: minfrac = 0.75, bw = 5, mzwid = 0.05, max = 20.

2.2.23. Identifizierung von Metaboliten

Die Identifizierung der Hydroxyzimtsäureamide p-Cumaroylagmatin und p-Cumaroylputreszin erfolgte sowohl über manuelle Interpretation der MS/MS-Spektren von m/z 277,00 (isol. Width 2; collision energy, 15 eV; in-source CID energy, 0 V; acq. Factor 1.0) als auch über den Vergleich der Fragmentpeaks mit verschiedenen Massendatenbanken über die Metaboliten-Identifizierungs-Software MetFrag (msbi.ipb-halle.de/MetFrag/MetFragIPB.iface) und MetFusion (msbi.ipb-halle.de/MetFusion/).

The screenshot shows the MetFrag web interface. At the top, the logo 'MetFrag' is displayed with the tagline 'In silico fragmentation for computer assisted identification of metabolite mass spectra'. Below the logo, there are navigation tabs for 'MetFrag', 'MzAnnotate Viewer', and 'About / News'. The main interface is divided into several sections:

- Database Settings:** Includes options for 'Database' (KEGG, PubChem, ChemSpider, Local SDF), 'Neutral exact mass' (276.156923545), 'Search PPM' (10), 'Molecular formula' (C₁₄H₂₀N₂O₂), 'Only biological compounds' (checked), 'Limit # of structures' (1000), and 'Database ID's'.
- Parent ion:** 277.1642, with a dropdown for charge state ([M+H]⁺) and a 'Calculate' button.
- Peaks:** A list of peaks with their m/z and relative intensities: 114.1010 (3.01), 147.0435 (100), 218.1174 (17.23), 260.1367 (15.84), and 277.1642 (24.54).
- MetFrag Settings:** Includes 'TreeDepth' (2), 'Mode' ([M+H]⁺), 'Charge' (pos.), 'Mzabs' (0.01), and 'Mzppm' (10).
- Search Results:** A table with columns: Score, # Explained Peaks, Trivial Name, Exact Mass, Structure, Database ID, and Actions. The top result is for p-Cumaroylagmatin with a score of 1.0, 4 explained peaks, and a database ID of 389322. The chemical structure is shown as a 2D ball-and-stick model.

Abbildung 7: MetFrag-Eingabe für Fragmentpeaks die nach MS²-Messungen erhalten wurden. Peaks: - m/z und Peakintensitäten der erhaltenen Fragmente; Score – Wahrscheinlichkeit das Fragmentmuster zu der hier gezeigten Struktur von *p*-Cumaroylagmatin gehört (0.0 = sehr unwahrscheinlich; 1.0 = sehr wahrscheinlich)

Für *p*-Cumaroylagmatin wurde zusätzlich ein synthetischer Standard zur Identifizierung und Quantifizierung genutzt. Bei jeder Messreihe wurden *p*-Cumaroylagmatin-Standards der Konzentrationen 0,1 μM; 1 μM; 5 μM; 10 μM; 20 μM; 50 μM; 75 μM und 100 μM in HPLC-Vials gefüllt und zwischen den biologischen Proben vermessen. Daraus wurde zu jedem Experiment eine separate Eichgerade erstellt (Diagramm 1), anhand derer die *p*-Cumaroylagmatin-gehalte quantifiziert wurden.

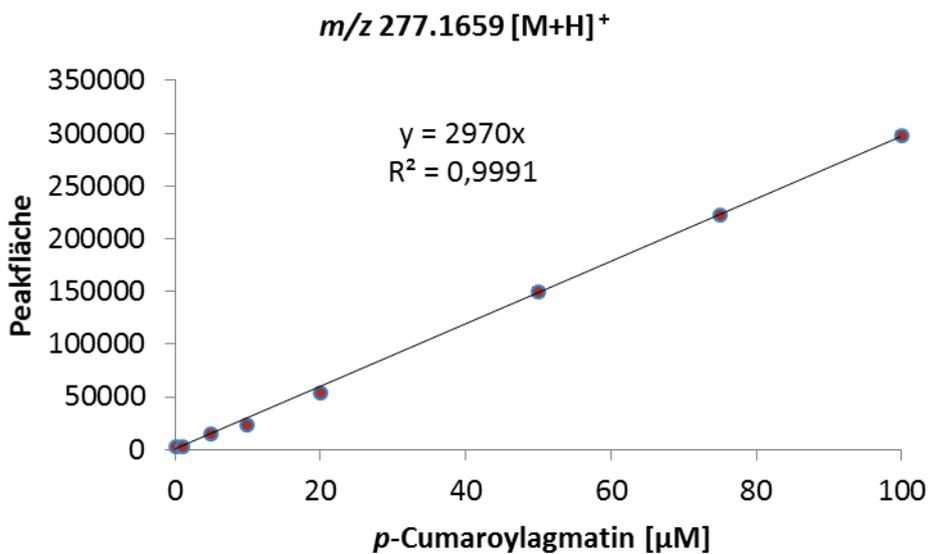


Abbildung 8: Beispiel einer *p*-Cumaroylagmatin-Eichgerade welche zu jeder LC-MS-Messreihe erstellt wurde. Per UHPLC-ESI-QTOF-MS wurde in Wasser gelöstes *p*-Cumaroylagmatin in den Konzentrationen 0,1 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM; 20 µM; 50 µM; 75 µM und 100 µM vermessen (X-Achse) (n=2). Die Y-Achse zeigt die Peakintensitäten von m/z 277.1659. Über die von Microsoft Excel errechnete Anstiegsgleichung der Trendlinie wurde quantifiziert.

2.2.24. Relative Quantifizierung von *P. infestans*-Biomasse

Die Anzucht der Kartoffelpflanzen erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie bei 2.2.20., allerdings wurden drei Blätter der oberen Blattetagen mit je 6×10^6 µl *P. infestans*-Zoosporen-suspension mit einer Konzentration von 1×10^5 /ml Zoosporen inokuliert und für drei Tage unter Kodelzugbeutel inkubiert.

Um Unterschiede im Wachstum von *P. infestans* auf Wildtyp- und transgenen Kartoffelpflanzen bestimmen zu können, wurde von drei inokulierten Blättern pro Pflanze die Infektionsstellen (gesamt 18) mit einem Korkbohrer (Ø 6 mm) ausgestanzt und in Schraubgefäßen (2 ml) mit Keramik-Kügelchen (Ermil; 1,25-1,6 mm) vereinigt. Eine relative Quantifizierung über quantitative *real time* PCR (qPCR) erfolgte dann nach (Eschen-Lippold *et al.*, 2007).

2.2.25. *In vitro*-Inhibierungsassay von *p*-Cumaroylagmatin auf *P. infestans*- Myzelwachstum

Der Einfluss von *p*-Cumaroylagmatin und steril filtriertem *P. infestans*-Inokulum, das 24 h auf *A. thaliana* –Blattoberflächen von Wildtyp und *knock out*-Linien (s. 2.1.1.1) war, wurde nach (Eschen-Lippold *et al.*, 2009) bestimmt, mit folgenden Ausnahmen: Die Versuche

wurden in 48 Well-Platten (greiner bio-one, Frickenhausen) durchgeführt. 100 μ L *P. infestans*-Sporangiensuspension (1×10^4 Sporangien /ml, s. 2.2.18) auf 900 μ l RyeA-Medium (s. Tab. 1), wurde nach 24 h pro Well 20 μ l *p*-Cumaroylagmatin (in H₂O) in den Konzentrationen 10 μ M, 100 μ M oder 1 mM zugegeben, oder 20 μ l steril filtrierte *P. infestans*-Inokulum (wie oben beschrieben). Als Positivkontrolle diente 1 mM Oxocrotonat C16 (enthielt 1,25 % DMSO (v/v)), das freundlicherweise von Alexander Otto, IPB Halle zur Verfügung gestellt wurde. Lösungsmittelkontrollen waren Wasser und DMSO (Carl Roth, Karlsruhe). Die emittierte Fluoreszenz des GFP-transformierten *P. infestans* (s. 2.1.2.) wurde alle 24 h über fünf Tage mit einem Plattenlesegerät (CytofluorII, Bioserch, Bedford, MA, USA) bestimmt mit einer Extinktionswellenlänge von 485/20 nm, einer Anregungswellenlänge von 530/30 nm, ohne Schwenken mit 10 Messungen/Well.

2.2.26. *P. infestans*-Zoosporen Inhibierungs-Assay

Zur Untersuchung des Einflusses von *p*-Cumaroylagmatin und steril filtriertem *P. infestans*-Inokulum, das 24 h auf *A. thaliana* –Blattoberflächen von Wildtyp und *knock-out*-Linien (s. 2.1.1.1) war, wurde in braunen Eppendorf-Reaktionsgefäßen 50 μ l *P. infestans*-Zoosporensuspension (s. 2.2.17) mit einer Konzentration von 3×10^5 Sporen/ml und 50 μ l *p*-Cumaroylagmatin (2 mM, 200 μ M oder 20 μ M) bzw. Inokulum von *A. thaliana* Col-0, *mate1* oder *act1* gemischt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 4°C inkubiert (Eschen-Lippold *et al.*, 2009). Anschließend wurden die Proben in eine Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben und unter einem Mikroskop (Nikon AZ 100 Multizoom, Nikon Instruments) bei Durchlicht und fünffacher Vergrößerung an 14 verschiedenen Stellen in der Zählkammer fotografiert. Später wurden die Fotos am PC ausgewertet, indem gekeimte Zoosporen und nicht gekeimte Zoosporen gezählt wurden. Als gekeimte Zoospore galt, wenn der Keimschlauch größer als der Durchmesser der Spore war. Der *in vitro*-Inhibierungsassay mit Inokulum von Kartoffelpflanzen wurde bei dem Temperaturoptimum für die Zoosporenkeimung bei 15°C durchgeführt.

2.3. Statistische Signifikanzberechnungen von Messwerten

Alle Werte wurden einem Studentschen t-Test in Microsoft Excel (2007, 2010, 2013) unter Verwendung folgender Formel: $TTEST(Matrix1; Matrix2; 2; 3)$

Als signifikant unterschiedlich wurden Werte eingestuft, wenn der Signifikanzwert (p-Wert) kleiner 0,05 war. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei allen Versuchen mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt. In Diagrammen wurde der p-Wert folgendermaßen angegeben:

Tabelle 7 Signifikanzen

| P-Wert | Signifikanz |
|------------|------------------------|
| >0,05 | nicht signifikant (ns) |
| 0,01-0,05 | * |
| 0,001-0,01 | ** |
| <0,001 | *** |

Bei Experimenten, bei denen mehrere Variablen miteinander verglichen werden sollten, wurde eine *one-way* ANOVA (Varianzanalyse) mit dem Programm Prism (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) und nach dessen Anleitung durchgeführt. Auch hier wurden Werte als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn der P-Wert kleiner 0,05 war. Dieser signifikante Unterschied wurde durch unterschiedliche kleine Buchstaben im Diagramm deutlich gemacht.

Abbildung 9: A) Atted II-Coexpressionsnetzwerk des *AtACT1*-Gens (At5g61160, gelbe Markierung). Das stärksten coexprimierte Gen *AtMATE* (At3g23550, rote Umrandung) hat den kürzesten Abstand zu *AtACT1*. www.atted.jp
 B) Expression der Gene *AtACT1* (●) und *AtMATE* (●) 6h, 12h und 24h nach Inokulierung mit *P. infestans* in *A. thaliana*-Wildtyp-Blättern. Abbildung aus www.genevestigator.com

3.2. Subzelluläre Lokalisation von AtACT1 in *A. thaliana*

Laut SLP-Local-Annotierung und *The Arabidopsis Information Resource* (TAIR, www.arabidopsis.org) sollte das Enzym AtACT1 im Zytosol oder Nukleus lokalisiert sein. Zur Überprüfung dieser Annahme wurde die cDNA ohne Stoppkodon zunächst in den Entry-Vektor pENTR (2.2.10.1) und später über eine Gateway LR Clonase in den binären Vektor pUBC-YFP-Dest (Grefen *et al.*, 2010; 2.2.10.4) kloniert, um AtACT1 mit YFP (*yellow fluorescent protein*) zu fusionieren und transient sowohl in *Nicotiana-benthamiana*-Blättern als auch in *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten (durch Dr. Lennart Eschen-Lippold) zu exprimieren.

3.2.1. Transiente AtACT1-YFP Expression in *Nicotiana benthamiana*

Zur subzellulären Lokalisierung wurden Agrobakterien (*A. tumefaciens*) mit pUBC-*AtACT1*-YFP-Plasmid-DNA transformiert. Anschließend wurde das Protein in *N. benthamiana* transient exprimiert. Unter dem dem invers konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop sah man unter der Anregungswellenlänge $\lambda=514$ nm für das AtACT1-YFP-Protein (Abbildung 10, A) eine Fluoreszenz im Zytosol und um den Zellkern. Zur besseren Unterscheidung der Zellkompartimente wurde der mCherry-Plasmamembranmarker pm-rk *CD3-1007* (Plasmamembran, rote Fluoreszenz, Kanamycinresistenz, Nelson *et al.*, 2007) koexprimiert (Abbildung 10, B). Die Überlagerung der Aufnahmen YFP, mCherry und Hellfeld (Abbildung 10, D) zeigte einige Bereiche, in denen AtACT1-YFP (gelb) nicht mit dem Plasmamembranmarker (rot) kolokalisierte, aber auch Bereiche in denen sie kolokalisierten (orange). Keine Kolokalisation war um den Zellkern zu sehen. Das sprach dafür, dass AtACT1 im Zytosol lokalisiert ist, aber sehr nahe der Plasmamembran.

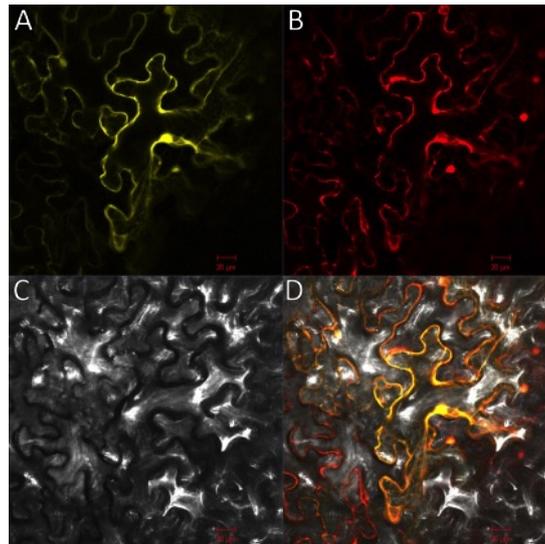


Abbildung 10: Subzelluläre Lokalisierung des AtACT1-YFP-Proteins in *N. benthamiana*. *N. benthamiana*-Blätter wurden mit pUBC-*AtACT1*-YFP-Plasmid-DNA und mCherry-Plasmamembranmarker pm-rk *CD3-1007*-Plasmid-DNA transformierten *A. tumefaciens*-Suspensionen infiltriert. Nach 48-72h wurden Fluoreszenzsignale des Fusionsproteins AtACT1-YFP und des Markerproteins pm-rk durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie detektiert. A: YFP-Fluoreszenz von AtACT1-YFP, Anregung: $\lambda_{\text{EX}} = 514$ nm, Emission: $\lambda_{\text{EM}} = 520-578$ nm, B: mCherry-Fluoreszenz vom Plasmamembranmarker pm-rk *CD3-1007*, Anregung $\lambda_{\text{EX}} = 594$ nm, Emission: $\lambda_{\text{EM}} = 598-643$ nm; C: Hellfeldaufnahme; D: Überlagerung YFP-Fluoreszenz von AtACT1-YFP, mCherry-Fluoreszenz vom Plasmamembranmarker und Hellfeldaufnahme. Die Abbildung ist stellvertretend für drei unabhängige Experimente (n=15).

3.2.2. Transiente *AtACT1*-YFP Expression in Zellkulturprotoplasten

Freundlicherweise erklärte sich Dr. Eschen-Lippold bereit, die pUBC-*AtACT1*o.S.-YFP-Plasmid-DNA in *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten zu exprimieren und anschließend die unter dem Mikroskop beobachtete AtACT1-YFP-Expression durch eine Westernblot-Analyse mit einem GFP-Antikörper zu überprüfen. Die Aufnahmen der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie zeigten eine Lokalisierung von AtACT1-YFP im Zytosol (Abbildung 11, A-D). Die anschließende Kontrolle per Westernblot-Analyse zeigte eine starke Markierung mit einem GFP-Antikörper.

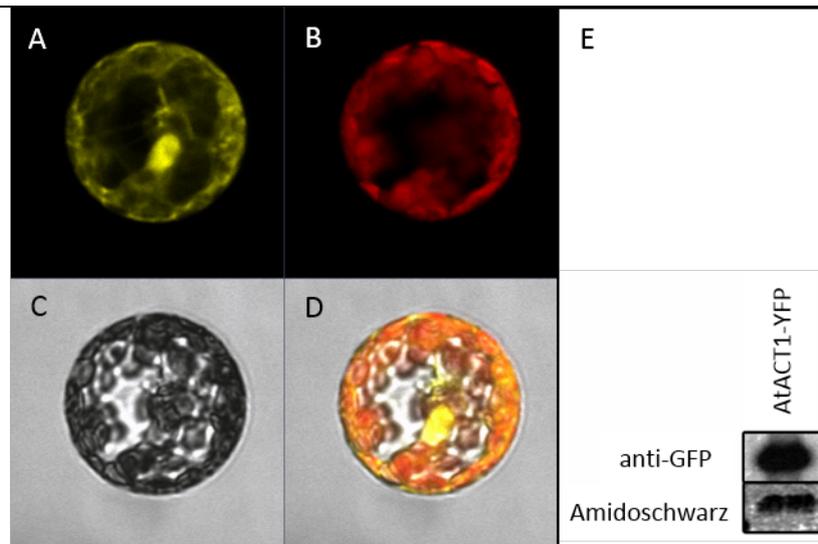


Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisierung des AtACT1-YFP-Proteins in *A. thaliana*-Mesophyllprotoplasten. A-D: Konfokale Laserscan-Mikroskopie-Aufnahmen von *A.thaliana*-Mesophyllprotoplasten. Pro 100 μ l Protoplastensuspension wurden 10 μ g pUBC-*AtACT1* o.S.-YFP-Plasmid-DNA transformiert und anschließend unter einem konfokalen Laserscan-Mikroskop die Expression des Fusionsproteins AtACT1-YFP aufgenommen. A: YFP-Fluoreszenz, Anregung: $\lambda_{\text{Ex}} = 514$ nm, Emission: $\lambda_{\text{Em}} = 520-578$ nm, B: Autofluoreszenz der Chloroplasten, C: Hellfeldaufnahme; D: Überlagerung YFP-Fluoreszenz-, Autofluoreszenz und Hellfeldaufnahme; E: Zur Kontrolle wurde eine Western-Blot-Analyse von AtACT1-YFP mit GFP-Antikörper (anti-GFP) und Ladekontrolle (Amidoschwarz) durchgeführt. Die Aufnahme ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente, wobei zwei Experimente mit Mesophyllprotoplasten und ein Experiment mit Zellkulturprotoplasten durchgeführt wurden. Pro Experiment wurde die Expression in 10-20 Protoplasten beobachtet.

3.3. Charakterisierung von *AtACT1*- und *AtMATE*-*knock out*-Linien

Um die Funktion der Proteine AtACT1 und AtMATE zu untersuchen, sollte ein Metabolitenprofil vom Zellinneren der Blätter von *A.thaliana*-Wildtyp-Pflanzen sowie den *knock-out*-Linien *act1* (SALK_097380), *mate1* SALK-062231 und der Doppelmutante *act1 mate1*, nach Inokulierung mit *P. infestans*, erstellt werden. Als Kontrolle erfolgte die Inokulierung mit einer steril filtrierten *P.infestans*-Suspension (Sterilfiltrat) oder Wasser. Durch die persönliche Mitteilung von Christoph Böttcher, dass HCAs auch auf der Blattoberfläche von *A. thaliana* zu finden sind, wurde nach 24 Stunden das Inokulum von der Blattoberfläche wieder abgenommen und ein Metabolitenprofil des Inokulums erstellt. Beim inokulierten Blattmaterial ging eine methanolische Extraktion voraus. Vom Inokulum wurde direkt ein ungerichtetes Metabolitenprofil per UHPLC-ESI-QTOF-MS/MS erstellt. Auf die Darstellung der Ergebnisse nach der Behandlung mit allen Inokulierungssubstraten (*P. infestans*, Sterilfiltrat und Wasser) wurde in den folgenden Abbildungen zur besseren Übersichtlichkeit verzichtet und nur der Vergleich zwischen *P. infestans* und Wasser gezeigt.

Der vollständige Vergleich zwischen den Pflanzenlinien und allen Inokulierungssubstraten ist im Anhang ersichtlich (Abbildung 40, 7.6.2).

3.3.1. *p*-Cumaroylagmatingehalte in Blättern von *A.-thaliana-knock-out*-Linien

Die Methanolextrakte der inokulierten Blätter der *act1-knock-out*-Linien zeigten im Vergleich Wildtyppflanzen zwischen 29 und mehr als 100 signifikante Unterschiede im Metabolitenprofil in den drei unabhängigen Experimenten. In jedem unabhängigen Experiment war der Metabolit mit dem Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) von 277.1659 [M+H]⁺ in den Blattextrakten von *act1* durchschnittlich 35-fach niedriger als in den Wildtyp-Blattextrakten einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*, Abbildung 12). Über Tandem-Massenspektrometrie (siehe 7.6.1.) und einem Datenbankabgleich der Fragmente mittels MetFrag (siehe 2.2.22., Abbildung 7) konnte diese Substanz als *p*-Cumaroylagmatin identifiziert werden. *p*-Cumaroylagmatin (www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd:C04498, *Exact mass* 276.1586) gehört zu den HCAAs und wurde als Biosyntheseprodukt der *AtACT1* beschrieben (s. 1.5.1., S. 23). Über die, zwischen den biologischen Proben, vermessenen *p*-Cumaroylagmatinstandards in verschiedenen Konzentrationen bei jeder Messreihe, wurde *p*-Cumaroylagmatin über eine Eichgerade (siehe Abbildung 8) in den Extrakten und im Inokulum quantifiziert. Die *p*-Cumaroylagmatingehalte in den Blättern von *A.-thaliana*-Wildtyppflanzen waren 24 Stunden nach Inokulierung mit *P.-infestans*-Zoosporen im Vergleich zu *p*-Cumaroylagmatingehalten in den Blättern, welche mit Wasser inokuliert wurden, um das Dreifache erhöht (Abbildung 12). Die *p*-Cumaroylagmatin-Biosythesemutanten *act1* und *act1 mate1* zeigten sehr geringe Mengen an *p*-Cumaroylagmatin in den Blättern, unabhängig davon, ob mit *P. infestans* oder Wasser inokuliert wurde. Die Mutante *mate* hingegen hatte nach Behandlung mit *P. infestans*, *p*-Cumaroylagmatingehalte die mit denen in Wildtyp-Blättern vergleichbar waren. Nach Inokulierung mit Wasser waren die Mengen an *p*-Cumaroylagmatin in den Blattextrakten von *mate* signifikant 1,8-fach niedriger als bei Wildtyp-Blattextrakten. Aus diesen Ergebnissen ließ sich schließen, dass die *p*-Cumaroylagmatin-Akkumulation, außer in den Blättern der Biosynthesmutante *act1*, durch *P. infestans* induziert wurde.

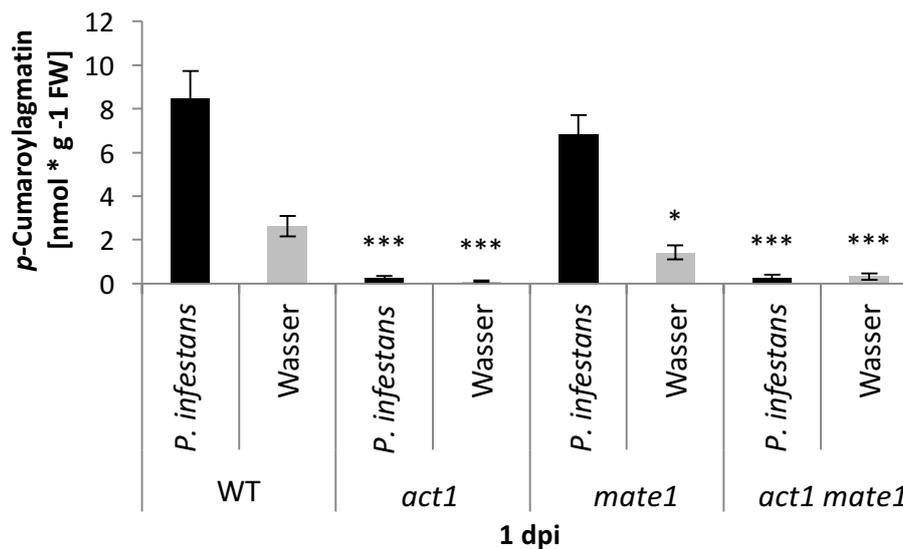


Abbildung 12 *p*-Cumaroylagmatiningehalte in *A. thaliana*-Blattextrakten 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Die methanolischen Blattextrakte wurden per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen: m/z 277.1659 [M+H]⁺; Für die Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und segregierenden MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 107 *P. infestans*, n = 49 Wasser); *knock-out*-Linien: *act1* (n = 22 *P. infestans*, n = 12 Wasser); *mate1* (n = 48 *P. infestans*, n = 30 Wasser); *act1 mate1* (n = 9 *P. infestans*, n = 14 Wasser); Statistik: SEM, Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert ≤ 2*10⁻⁶ *** (Studentscher t-Test).

Ein chemischer Abwehrmechanismus in *A. thaliana* verläuft über über Indolderivate an der Zellperipherie, durch die im Peroxysomen lokalisierte Myrosinase PEN2, die die Hydrolyse von β -Thioglukosidesterbindungen von Glykosiden katalysiert (Bones und Rossiter, 2006; Schlaeppli *et al.*, 2010; Bednarek, 2012a; siehe 1.3.1, S. 10) Zum Vergleich wurden die Mutanten *pen2*, *act1 pen2* und *mate1 pen2* ebenfalls auf ihre *p*-Cumaroylagmatiningehalte nach Inokulierung mit *P. infestans* untersucht (Abbildung 13). In den Blättern der *pen2*-Mutante und *mate1-pen2*-Doppelmutante fanden sich signifikant erhöhte *p*-Cumaroylagmatiningehalte (*pen2*: 5-fach; *mate pen2*: 3,5-fach) gegenüber *A. thaliana*-Wildtyp-Blättern (Abbildung 13). Dies deutete auf eine Kompensation der fehlenden Myrosinaseaktivität durch eine erhöhte *p*-Cumaroylagmatin-Biosynthese in den *pen2*-Mutanten nach *P. infestans*-Inokulierung hin oder Denkbar wäre auch, dass die Penetration durch *P. infestans* zu verstärkten Antwortreaktionen führte. War zusätzlich zum Fehlen der Myrosinaseaktivität die Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin ausgeschaltet (*act1 pen2*), fand sich auch kein *p*-Cumaroylagmatin mehr in den Blättern, unabhängig davon, ob mit *P. infestans* oder Wasser inokuliert wurde (Abbildung 13).

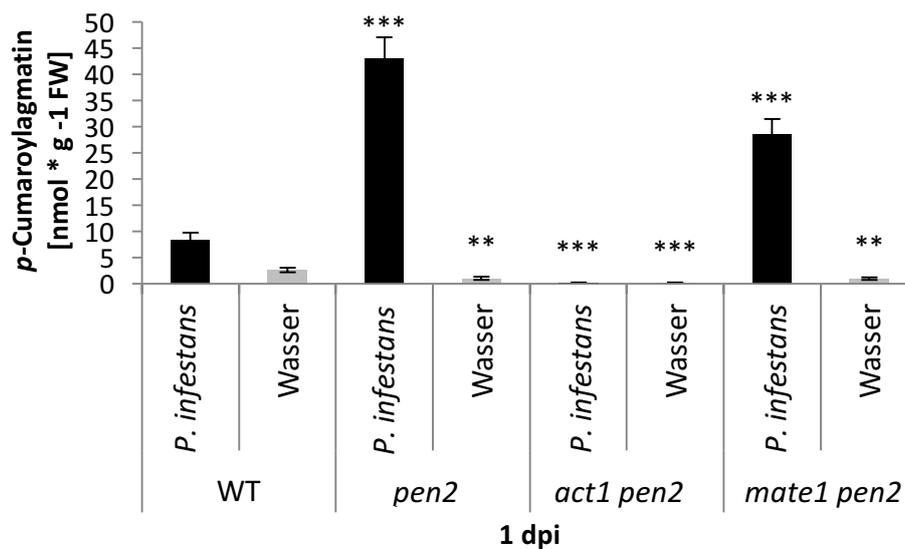


Abbildung 13: *p*-Cumaroylagmatingehalte von *A. thaliana*-Blattextrakten 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Die methanolischen Blattextrakte wurden per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen, m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und „segregierender“ MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 107 *P. infestans*, n = 49 Wasser); *knock-out*-Linien: *pen2* (n = 24 *P. infestans*, n = 13 Wasser); *act1 pen2* (n = 26 *P. infestans*, n = 13 Wasser); *mate pen2* (n = 6 *P. infestans*, n = 11 Wasser); Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert ≤ 2*10⁻⁴*** (Student'scher t-Test).

3.3.2. *p*-Cumaroylagmatingehalte in Tropfen von *A. thaliana*-*knock-out*-Linien

p-Cumaroylagmatin sollte sich auf der Blattoberfläche von *A. thaliana* befinden, wenn *P. infestans* dort präsent ist. Zur Überprüfung dieser Hypothese sollten Metabolitenprofile im Inokulum, das 24 Stunden nach Inokulierung wieder von der Blattoberfläche abgenommen wurde, erstellt werden. Wie schon in den Blattextrakten waren auch die *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum nach Inokulierung mit *P. infestans* erhöht. In *P. infestans*-Tropfen fanden sich ca. 43-fach höhere *p*-Cumaroylagmatingehalte als in identisch behandelten Wassertropfen (Abbildung 14). Das Inokulum der Biosynthesemutante *act1* enthielt, im Vergleich zum Wildtyp nach *P. infestans* –Behandlung nahezu kein *p*-Cumaroylagmatin mehr (Abbildung 14). Das Ausschalten des Gens *AtMATE* führte bei *mate1*-Pflanzen zu einem Verlust der Fähigkeit, *p*-Cumaroylagmatin an die Blattoberfläche zu transportieren (Abbildung 14), obwohl im Blattinneren *p*-Cumaroylagmatin nach *P.*

infestans-Inokulierung akkumuliert wurde (Abbildung 12). Dieses sehr aufschlussreiche Ergebnis führte zur Hypothese, dass AtMATE für den *p*-Cumaroylagmatintransport notwendig ist. In der Doppelmutante *act1 mate1*, die sowohl in der Biosynthese als auch mutmaßlich im Transport von *p*-Cumaroylagmatin defizient war, wurde ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp-Inokulum, 24 Stunden nach *P. infestans*-Inokulierung, kaum *p*-Cumaroylagmatin detektiert werden.

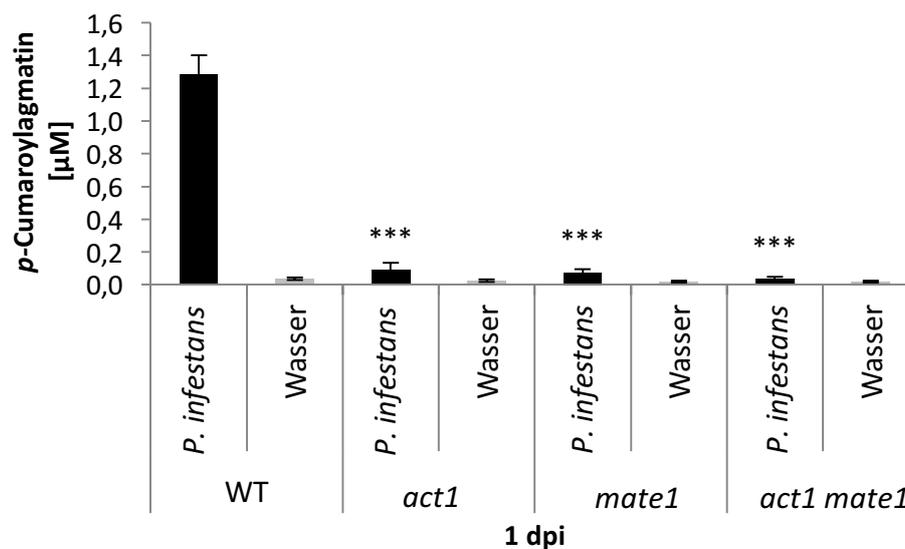


Abbildung 14: *p*-Cumaroylagmatinergehalte im Inokulum von *A. thaliana* 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Das nach einem Tag von den Blättern abgenommene Inokulum wurde direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und „segregierender“ MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 109 *P. infestans*, n = 48 Wasser); *knock out*-Linien: *act1* (n = 22 *P. infestans*, n = 13 Wasser); *mate* (n = 47 *P. infestans*, n = 26 Wasser); *act1mate* (n = 12 *P. infestans*, n = 16 Wasser); Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 4 \cdot 10^{-11}$ *** (Studentscher t-Test).

Um zusätzliche Mutationen in anderen Genen der SALK-Linie *mate 062231* (*mate1*) schließen, die für das Fehlen von *p*-Cumaroylagmatin im Inokulum hätten verantwortlich sein können, wurden die LC-MS-Messungen bei einer weiteren *A. thaliana* *mate*-Mutantenlinie *mate 411D06* (*mate2*, Gabi-Kat. 411D06) durchgeführt. Bei der Linie *mate 062231* (*mate1*) befindet sich die T-DNA-Insertion im Exon 6, bei *mate 411D06* (*mate2*) im Exon 5 (Abbildung 15 A). Die *Arabidopsis*-Doppelmutanten *act1 mate1* und *mate1 pen2* wurden mit der SALK-Linie 062231 (*mate1*) durch Kreuzung der Linien generiert (2.2.8.). In den Blattextrakten von *mate 411D06* (*mate2*) wurden signifikant 3-fach niedrigere *p*-

Cumaroylagmatingehalte gefunden als in Wildtyp-Blattextrakten (Abbildung 15 B). Im Gegensatz dazu zeugte die Biosynthesemutante *act1*, 14-fach niedrigere *p*-Cumaroylagmatinlevel (Abbildung 12). Im Inokulum der *mate-411D06*-Mutante wurden signifikant erniedrigte *p*-Cumaroylagmatingehalte nach Inokulierung mit *P. infestans* tiert (Abbildung 15 C). Das sprach dafür, dass die stark reduzierten, extrazellulären *p*-Cumaroylagmatin-Mengen der *mate-knock-out*-Linien im Vergleich zum Wildtyp, durch den Verlust der *At3g23550*-Genfunktion verursacht wurde und nicht durch zusätzlichen in anderen Genen.

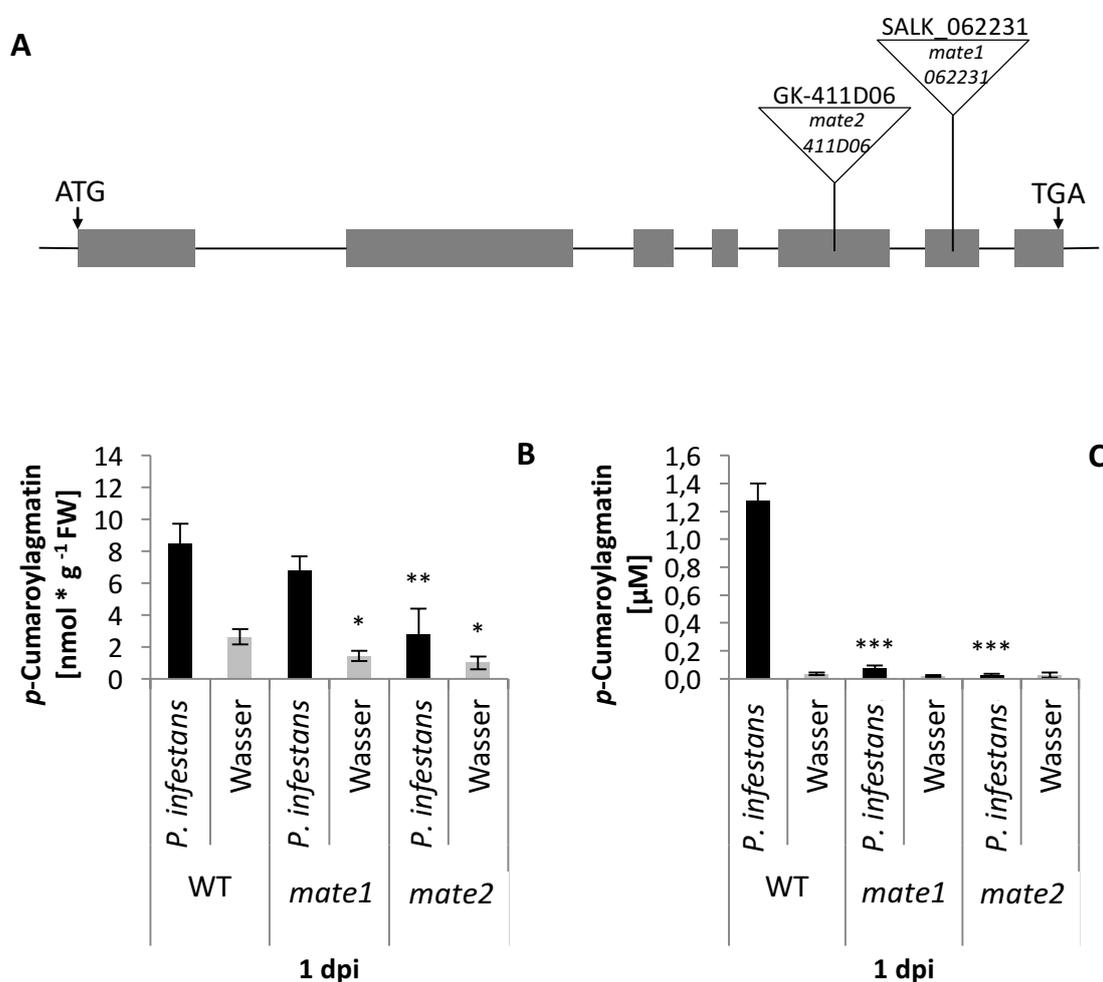


Abbildung 15: A) Schematische Darstellung des *AtMATE*-Gens mit der Exon-Intron-Struktur und Positionen der T-DNA-Insertionen der *knock-out*-Linien *mate1* 062231 (SALK_062231) und *mate2* 411D06 (GK-411D06); graue Boxen = Exons, schwarze Linien zwischen den Boxen = Introns.

B) *p*-Cumaroylagmatingehalte von *A. thaliana*-Blättern 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Die methanolischen Blattextrakte wurden per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen; *m/z* 277.1659

[M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und segregierender MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 107 *P. infestans*, n = 49 Wasser); *knock out*-Linien: *mate1* (SALK_062231; n = 48 *P. infestans*, n = 30 Wasser); *mate2* (GK_411D06; n = 9 *P. infestans*, n = 11 Wasser); Die Daten der Wildtyplinien und *mate1* wurden übersichtshalber aus Abbildung 12 hier noch einmal genutzt. Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert ≤ 2*10⁻⁴ *** (Student'scher t-Test).

C) *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum von *A. thaliana* 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Das nach einem Tag von den Blättern abgenommene Inokulum wurde direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen; *m/z* 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und „segregierender“ MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 109 *P. infestans*, n = 48 Wasser); *knock out*-Linien: *mate1* (SALK_062231; n = 47 *P. infestans*, n = 326 Wasser); *mate2* (GK_411D06; n = 9 *P. infestans*, n = 11 Wasser); Die Daten der Wildtyplinien und *mate1* wurden übersichtshalber aus Abbildung 14 hier noch einmal genutzt. Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Signifikanzen zu Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert ≤ 2*10⁻⁴*** (Student'scher t-Test).

Die erhöhten Mengen an *p*-Cumaroylagmatin aus den *pen2*-Blattextrakten gegenüber den Wildtyp-Blattextrakten konnten auch im *P. infestans*-Inokulum von *pen2* beobachtet werden (Abbildung 16). Der Anstieg der *p*-Cumaroylagmatingehalte war ebenfalls durch *P. infestans* induziert. (Abbildung 16). In *pen2*-Tropfen fanden sich ca. 3-fach höhere *p*-Cumaroylagmatingehalte als in Wildtyp-Tropfen. Die Gehalte der Doppelmutanten *act1 pen2* und *mate1 pen2* entsprachen denen der Einzelmutante *act1* und *mate1* (Abbildung 14). Eine Erhöhung der *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum bei *pen2*-Mutanten liegt eventuell in einer Kompensation des Fehlens von Indolderivaten begründet. Eventuell induzierte die erhöhte Penetrationrate eine verstärkte chemische Abwehrantwort. Diese verstärkte Antwortreaktion war in den Doppelmutanten *act1 pen2* und *mate1 pen2* durch das Ausschalten der Gene *AtACT1* und *AtMATE* verloren gegangen, da die Biosynthese und der mutmaßliche Transport von *p*-Cumaroylagmatin nicht stattfand.

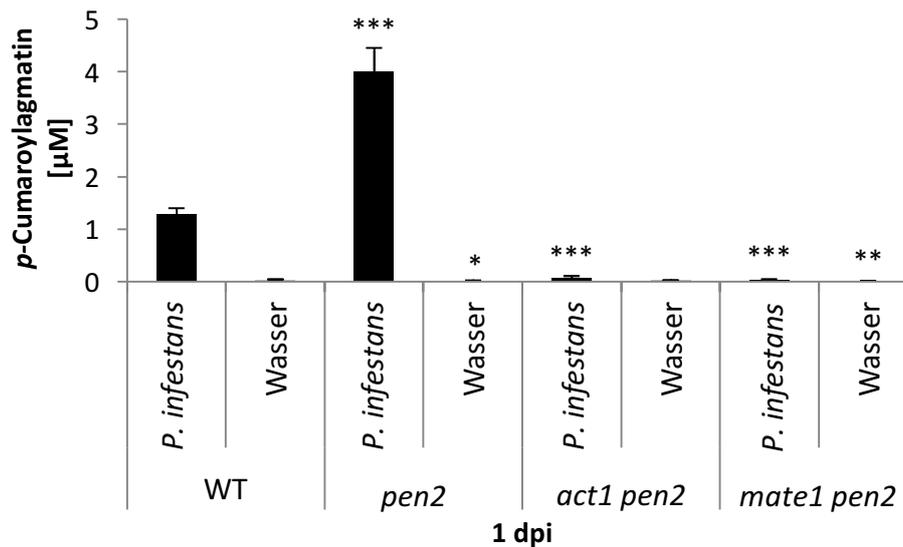


Abbildung 16: *p*-Cumaroylagmatinergehalte im Inokulum von *A. thaliana* 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Das nach einem Tag von den Blättern abgenommene Inokulum wurde direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und „segreg.“ MATE-WT zusammengefasst (n = 107 *P. infestans*, n = 49 Wasser); knock out-Linien: *pen2* (n = 24 *P. infestans*, n = 13 Wasser); *act1 pen2* (n = 26 *P. infestans*, n = 13 Wasser); *mate pen2* (n = 6 *P. infestans*, n = 11 Wasser); Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert ≤ 4*10⁻⁶*** (Student'scher t-Test).

3.4. Die Rolle von *p*-Cumaroylagmatin in der Abwehr gegen *P. infestans*

p-Cumaroylagmatin wurde bereits mehrfach als antimikrobielle Substanz beschrieben (Stoessl, 1967; Muroi *et al.*, 2009; Bassard *et al.*, 2010; Muroi *et al.*, 2012). Um einen eventuellen Einfluss von *p*-Cumaroylagmatin auf das Wachstum bzw. auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans* zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Inhibierungstests zum einen auf das Myzelwachstum und zum anderen auf die Sporenkeimung durchgeführt.

3.4.1. *In-vitro*-Inhibierungstest von *p*-Cumaroylagmatin auf das Myzelwachstum von *P. infestans*

Für den Test, ob *p*-Cumaroylagmatin einen Einfluss auf das Myzelwachstum von *P. infestans* hat, wurde die fluoreszierende Eigenschaft des *P. infestans*-Isolates genutzt, das stabil mit GFP (green fluorescent protein) transformiert ist (Si-Ammour *et al.*, 2003). So wurde zu 24 Stunden alten *P. infestans*-Sporangien *p*-Cumaroylagmatin zugegeben. Anschließend wurde über fünf Tage die GFP-Fluoreszenz als Marker für das *P. infestans*-Wachstum über ein Plattenlesegerät bestimmt (Abbildung 17). Als Negativkontrolle wurde die Fluoreszenz

nach Zugabe von Wasser gemessen, als Positivkontrolle die nach Zugabe von Oxocrotonat (Abbildung 17). Von Oxocrotonat ist bekannt, dass es einen inhibitorischen Effekt auf das Myzelwachstum von *P. infestans* hat (Eschen-Lippold *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Wasser führte die Zugabe von *p*-Cumaroylagmatin nach 24 Stunden zu einem zwar signifikanten, aber nur 1,7-fach höheren Wachstum des *P. infestans*-Myzels. Zu späteren Zeitpunkten (Tag 2-5) wurden keine signifikanten Unterschiede im *P. infestans*-Myzelwachstum zwischen Wasser und *p*-Cumaroylagmatin mehr festgestellt (Abbildung 17). *p*-Cumaroylagmatin hatte demzufolge keinen inhibitorischen Einfluss auf das *P. infestans*-Myzelwachstum. Das Myzelwachstum war nach Behandlung mit Oxocrotonat ab dem Zeitpunkt zwei Tage signifikant inhibiert.

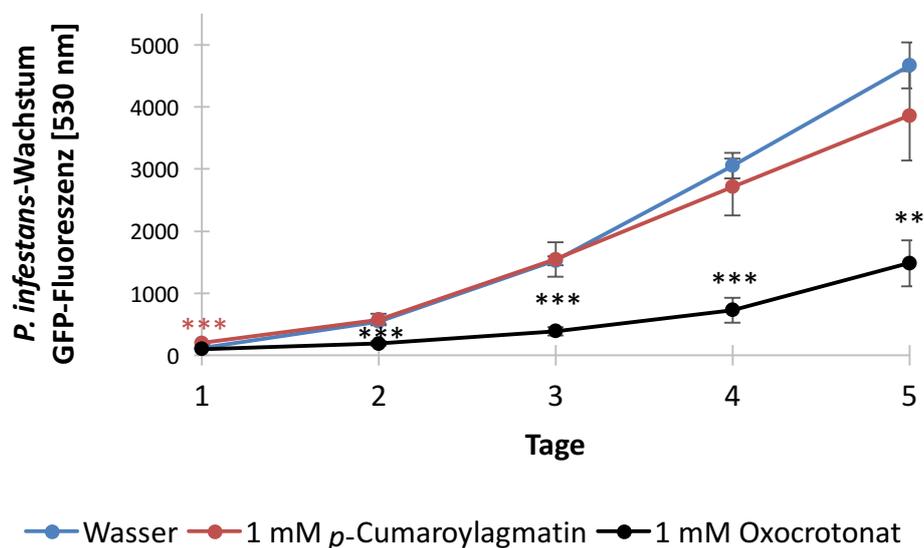


Abbildung 17: *In-vitro*-Inhibierungstest von *p*-Cumaroylagmatin auf das *P. infestans*-Myzelwachstum. Zu 100 μ l *P. infestans*-Sporangiensuspension (1×10^4 Sporangien/ml) wurde nach 24 h pro Well 20 μ l 1 mM *p*-Cumaroylagmatin zugegeben, 20 μ l Wasser (Negativkontrolle) oder 20 μ l 1 mM Oxocrotonat-C16-Lösung (Positivkontrolle). Die emittierte Fluoreszenz des GFP-transformierten *P. infestans* wurde alle 24 h über fünf Tage mit einem Plattenlesegerät (CytofluorII) bestimmt. 3 Experimente: *p*-Cumaroylagmatin-Standard 1 mM ($n = 18$); Positivkontrolle: Oxocrotonat 1mM ($n = 18$), Wasser ($n = 18$). Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wasser sind mit Sternen dargestellt, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

3.4.2. *In-vitro*-Inhibierungstest von *p*-Cumaroylagmatin auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans*

Nach der Beobachtung, dass *p*-Cumaroylagmatin keinen Einfluss auf das Myzelwachstum von *P. infestans* hatte, wurde untersucht ob *p*-Cumaroylagmatin eine inhibitorische Wirkung

auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans* hat. Dafür wurde *P.-infestans*-Zoosporensuspension mit verschiedenen konzentrierten *p*-Cumaroylagmatin-Lösungen mischt und die Ansätze für 24 Stunden unter Keimungsbedingungen (siehe 2.2.26) biert. Unter dem Mikroskop wurden dann 14 Aufnahmen pro Ansatz gemacht und diese wurden dann, durch das Auszählen gekeimter und ungekeimter Sporen ausgewertet. Im Gegensatz zum Myzelwachstum wurde die Zoosporenkeimung von *P. infestans* durch die Zugabe von *p*-Cumaroylagmatin konzentrationsabhängig gehemmt (Abbildung 18). Bei einer Endkonzentration von 1 mM *p*-Cumaroylagmatin war die Keimung der Zoosporen fast vollständig inhibiert und signifikant niedriger im Vergleich zur Keimung in reinem Wasser. Eine *p*-Cumaroylagmatin-Konzentration von 0,1 mM im Sporenkeimungsmedium reichte aus, um die Sporenkeimung um ca. 50% zu inhibieren (Abbildung 18).

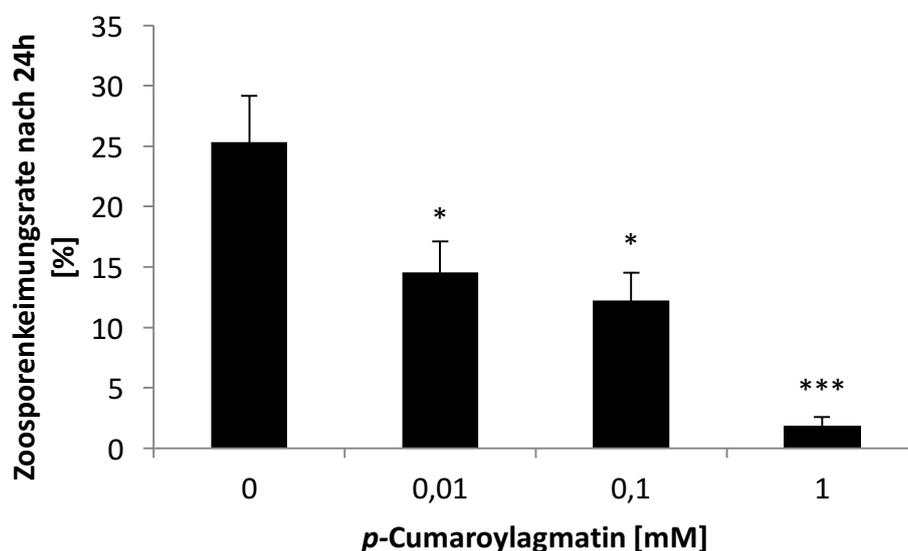


Abbildung 18: *In-vitro*-Inhibierungstest von *p*-Cumaroylagmatin auf *P.-infestans*-Zoosporenkeimung. 50 μ l *P.-infestans*-Zoosporensuspension (3×10^5 Sporen/ml) und 50 μ l *p*-Cumaroylagmatin (2 mM, 200 μ M oder 20 μ M) wurden gemischt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter dem Mikroskop und am PC ausgewertet, indem gekeimte Zoosporen und nicht gekeimte Zoosporen gezählt wurden. Als gekeimte Zoospore galt, wenn der Keimschlauch größer als der Durchmesser der Spore war. 3 Experimente: *p*-Cumaroylagmatin: n = 9. Statistik: SEM, Signifikanzen zu 0 μ M *p*-Cumaroylagmatin sind mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

3.4.3. *In-vitro*-Inhibierungstest von Inokulierungstropfen auf das Myzelwachstum von *P. infestans*

Als nächstes sollte *in vitro* untersucht werden, ob steril filtriertes Inokulum, welches sich vorher für 24 Stunden auf *A. thaliana*-Blättern befand, ebenfalls einen Einfluss auf die

renkeimung von *P. infestans* hat. Neben Inokulum von Wildtyp-Arabidopsis-Pflanzen den steril filtrierte Tropfen von *A. thaliana*-Mutanten benutzt, deren Fähigkeit *p*-Cumaroylagmatin zu synthetisieren (*act1*), es nach außen zu transportieren (*mate1*) oder beides (*act1 mate1*), ausgeschaltet war, bzw. die erhöhten Mengen ins Inokulum ten (*pen2*). Ein Einfluss von steril filtriertem Inokulum der *knock-out*-Linien auf das wachstum von *P. infestans*, konnte im Vergleich zu Wildtyp-Inokulum nicht beobachtet werden (Abbildung 19). Nach einem Tag gab es zwar signifikante, aber nur sehr geringe Unterschiede im *P. infestans*-Myzelwachstum nach Behandlung mit Inokulum von *act1* (1,5-fach) und *act1 mate1* (1,2-fach höher) im Vergleich zur Zugabe von Inokulum der Wildtyp-Arabidopsis-Pflanzen (Abbildung 19). Dabei zeigte das *P. infestans*-Myzel mit Wasser ein 1,5-fach verringertes Wachstum im Vergleich zum Myzel welches mit Inokulum von typ-Linien behandelt wurde. Zu den späteren Zeitpunkten zwei, drei, vier und fünf Tage wurden keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp-Inokulum festgestellt (Abbildung 19). Das Inokulum, welches je nach *A. thaliana*-Linie, *p*-Cumaroylagmatin beinhaltete oder nicht, hatte keinen Einfluss auf das Myzelwachstum von *P. infestans*.

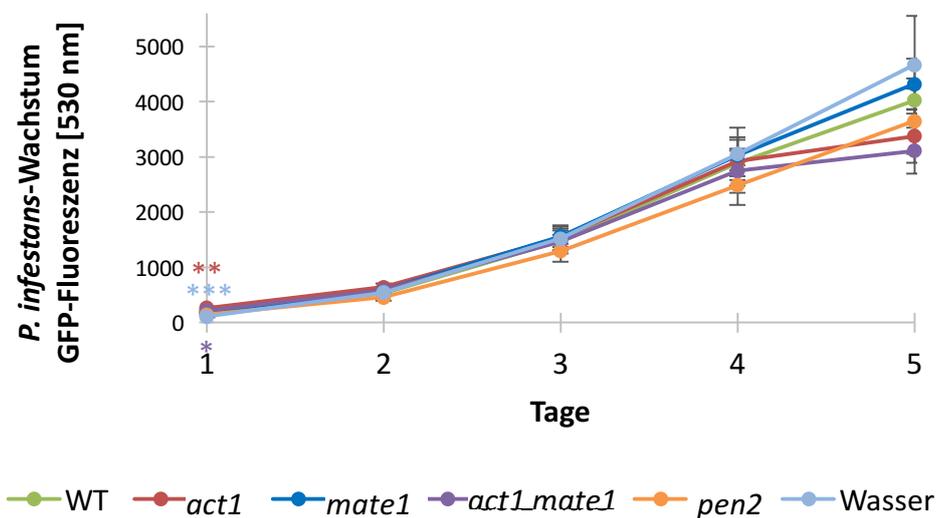


Abbildung 19: *In-vitro*-Inhibierungstest von sterilfiltriertem Inokulum auf *P. infestans*-Myzelwachstum. Das Inokulum befand sich 24 h auf *A. thaliana*-Blättern, wurde anschließend steril filtriert. Zu 100 µl *P. infestans*-Sporangiensuspension (1×10^4 Sporangien/ml) wurde nach 24 h 20 µl steril filtriertes Inokulum oder Wasser zugegeben. Die emittierte Fluoreszenz des GFP-transformierten *P. infestans* wurde alle 24 h über fünf Tage mit einem Plattenlesegerät (CytofluorII) gemessen. 3 Experimente: als Kontrolle diente steril filtriertes Inokulum der Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und *gl-2*. MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 54), *act1* (n = 18), *mate1* (n = 54), *act1 mate1* (n = 18), *pen2* (n = 18),

Wasser (n = 18). Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen sind mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert 0,01 - 0,001**, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

3.4.4. *In-vitro*-Inhibierungstest von Inokulierungstropfen auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans*

Es wurde gezeigt, dass *p*-Cumaroylagmatin (Abbildung 18) die Zoosporenkeimung *in vitro* inhibiert. Daher wurde untersucht, ob die Mengen an *p*-Cumaroylagmatin, die von *A. thaliana* ins Inokulum sezerniert wurden, ebenfalls einen inhibitorischen Einfluss auf die Sporenkeimung von *P. infestans* haben. Verglichen wurden die Inokulierungstropfen, die vor dem Experiment 24 Stunden auf der Blattoberfläche der *A. thaliana*-Wildtyplinien Col-0 und den *knock-out*-Linien *act1* und *mate1* waren. Als Kontrolle wurde Wasser zur Zoosporensuspension gegeben. Das *A. thaliana*-Inokulum aller drei Linien (Col-0, *act1* und *mate1*) inhibierte die Zoosporenkeimung signifikant um ca. 50% im Vergleich zu Wasser (Abbildung 20). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Inokulum und Inokulum der *knock-out*-Linien *act1* und *mate1* in der Keimungshemmung (Abbildung 20). Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass *A. thaliana* neben *p*-Cumaroylagmatin noch weitere Zoosporenkeimung inhibierende Substanzen sekretiert.

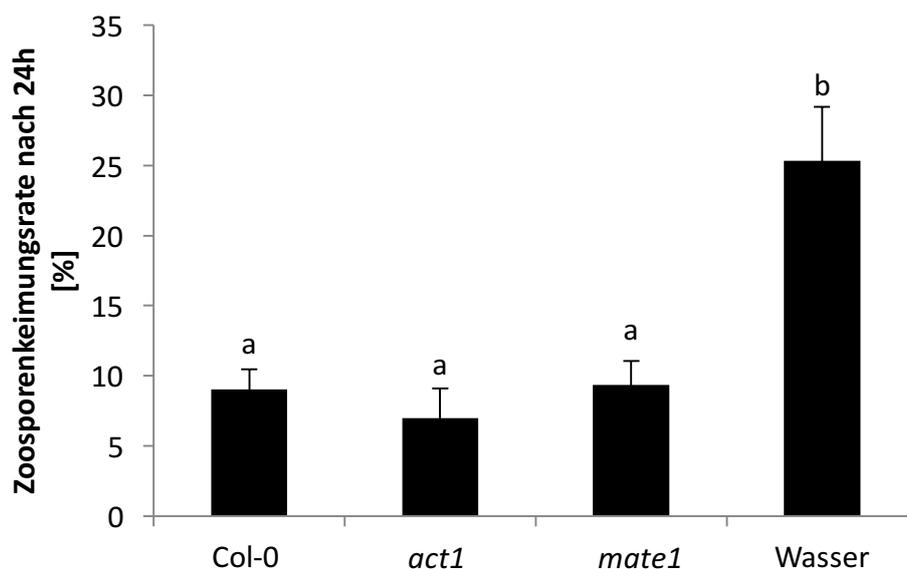


Abbildung 20: *In-vitro*-Inhibierungstest von Inokulum, welches 24 h auf der Blattoberfläche von *A. thaliana* war, auf die *P. infestans*-Zoosporenkeimung. 50 μ l *P. infestans*-Zoosporensuspension (3×10^5 Sporen/ml) und 50 μ l steril filtriertes Inokulum, das 24 h auf *A. thaliana*-Wildtypblättern (Col-0), Blättern von *A. thaliana*-*knock out*-Linien (*act1*; *mate1*) kultiviert worden war oder Wasser, wurden gemischt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 4°C inkubiert. Anschließend

wurden die Proben unter dem Mikroskop und am PC ausgewertet, indem gekeimte Zoosporen und nicht gekeimte Zoosporen gezählt wurden. Als gekeimte Zoospore galt, wenn der Keimschlauch größer als der Durchmesser der Spore war. 3 Experimente: n = 9. Statistik: SEM; Signifikanzen zwischen den einzelnen Behandlungsarten sind mit Kleinbuchstaben dargestellt. P-Wert $\leq 0,05$ b, (one way ANOVA).

3.5. Vergleich *p*-Cumaroylagmatingehalte in *S. tuberosum* (Wildtyp) und *A. thaliana* (Wildtyp)

Nach Betrachtung der Rolle des *p*-Cumaroylagmatins in der für *P. infestans* Nichtwirtspflanze *A. thaliana* wurde ein Vergleich der *p*-Cumaroylagmatingehalte der Wirtspflanze *S. tuberosum* L. cv. Désirée intrazellulär und im Apoplasten bestimmt. Dafür wurden *A. thaliana*- und *S. tuberosum*-Wildtyplinien mit *P.-infestans*-Zoosporensuspensionen inokuliert. Nach 24 Stunden wurde das Inokulum von der Blattoberfläche und Proben des Blattmaterials, das vorher inokuliert war, abgenommen. Dieses Inokulum wurde direkt, das Blattmaterial erst nach methanolischer Extraktion, über QHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. Die methanolischen Extrakte der *S.-tuberosum*-Blattscheiben hatten 3,5-fach ($30 \pm 18,7$ nmol* g^{-1} FG) höhere Mengen an *p*-Cumaroylagmatin als die Extrakte der *A.-thaliana*-Blätter ($8,4 \pm 13$ nmol FG, Abbildung 21 A). Im Inokulum wurden aber 7,5-fach geringere *p*-Cumaroylagmatinkonzentrationen im Inokulum von *S. tuberosum* gemessen (*S. tuberosum*: $0,17 \pm 0,15$ μ M, *A. thaliana*: $1,3 \pm 1,2$ μ M, Abbildung 21 B). Dies lässt darauf schließen, dass der Export von *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten in Kartoffel weniger effizient ist als bei Arabidopsis.

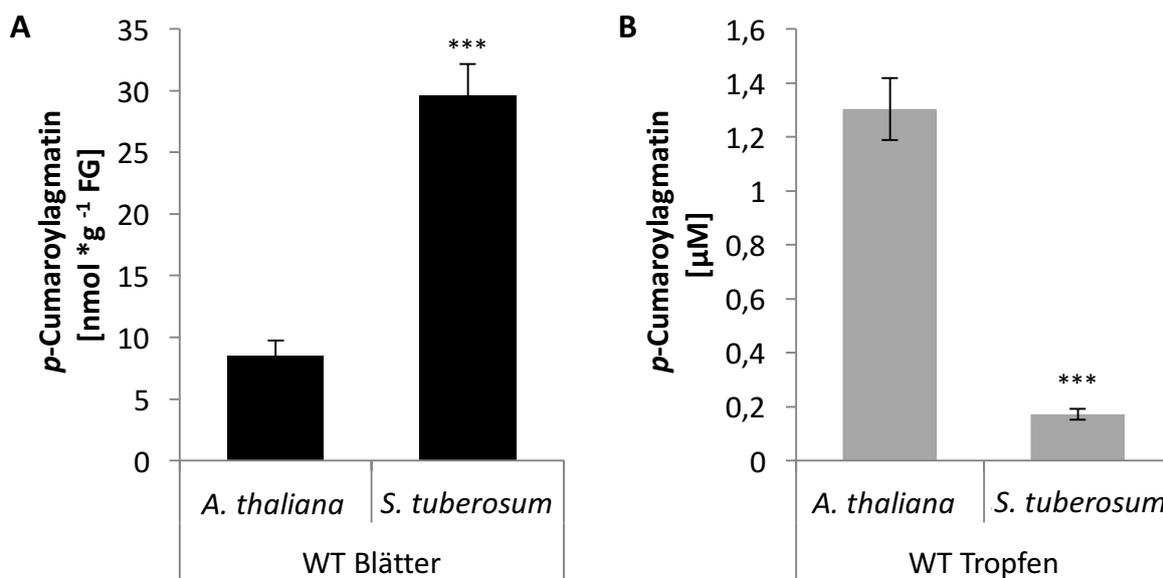


Abbildung 21: A, B) Vergleich der *p*-Cumaroylagmatingehalte von *A. thaliana* und *S. tuberosum* in Wildtyp-Blättern (A) sowie im Inokulum von *A. thaliana* und *S. tuberosum* (B). Die Blätter von Arabidopsis- und Kartoffelpflanzen wurden mit $30 \times 10 \mu$ l *P.-infestans*-Zoosporensuspension inokuliert (5×10^5 Zoosporen/ml (*A. thaliana*); 1×10^5 Zoosporen /ml (*S. tuberosum*)). Nach 24 h wurde das Inokulum und inokuliertes Blattmaterial geerntet. *p*-Cumaroylagmatin wurde im

Inokulum direkt per UPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt und im Blattmaterial nach methanolischer Extraktion. m/z 277.1659 [M+H]⁺; *A. thaliana*-Blätter: 6 Experimente, n = 107 (A); *A. thaliana* Inokulum: 8 Experimente, n = 117 (B); *S. tuberosum*-Blätter: 5 Experimente, n = 56 (A); *S. tuberosum* Tropfen: 6 Experimente, n = 58 (B); Statistik: SEM; Signifikanzen zu *A. thaliana* mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 1 \cdot 10^{-11}$ *** (Studentscher t-Test) (A,B).

3.6. Transgene Expression von *AtACT1* in Kartoffel

Die Expression des *AtACT1*-Gens in der anfälligen Kartoffelsorte *S. tuberosum* L. cv. Désirée sollte die Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin in Kartoffel erhöhen bzw. veränderte Hydroxyzimtsäureamid-Muster generieren, um zu untersuchen, ob hierdurch eine verstärkte Resistenz gegen *P. infestans* in Kartoffel zu beobachten ist. Dafür wurde die *AtACT1*-cDNA hinter einen 35S-Promotor in den binären Vektor pGWB14 kloniert (s. Vektorkarte, 7.2.). Über *A. tumefaciens*-vermittelte Blattscheibentransformation wurde das *AtACT1*-Gen in Kartoffel stabil exprimiert.

3.6.1. Überprüfung auf T-DNA-Einbau von *AtACT1* exprimierenden transgenen Kartoffellinien

Die generierten Pflanzen wurden über eine Southern-Hybridisierung auf den Einbau der T-DNA in deren Genom überprüft. Dafür wurde genomische DNA aus Blattmaterial dieser Pflanzen isoliert und anschließend mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII in einem Doppelverdau gespalten. Als radioaktiv markierte Sonde diente ein 1112 bp großes DNA-Fragment, das nach Doppelverdau der pGWB14-*AtACT1*-Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen XhoI und HindIII entstanden war. Nach der Hybridisierung wurden Banden mit der erwarteten Größe bei den transgenen Linien B, H, M und Z sichtbar (Abbildung 22). Das Ergebnis sprach dafür, dass die Linien *AtACT1* B, H, M und Z transgen sind. Bei den Kontrolllinien Wildtyp und Leervektor wurden keine Banden detektiert (Abbildung 22).

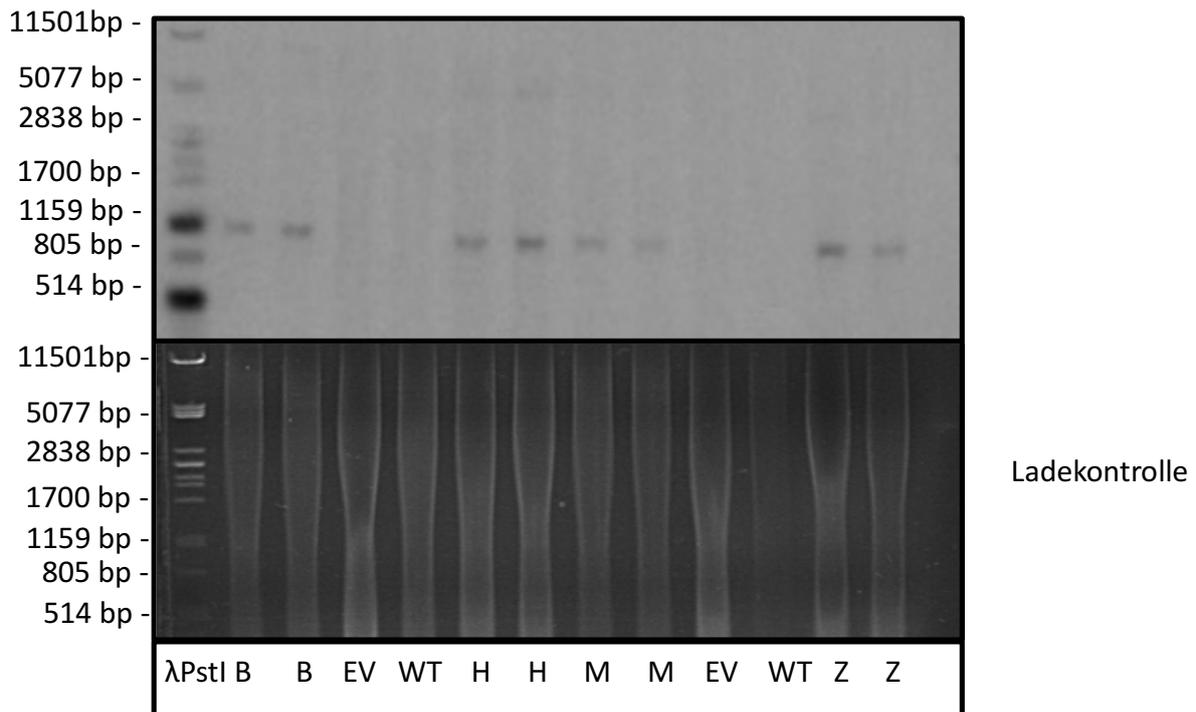


Abbildung 22: Southernblot der transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien (1 Experiment, n = 2). Die Southern-Hybridisierung wurde mit genomischer DNA aus Blattmaterial der Kartoffelpflanzen durchgeführt. Die genomische DNA wurde mit XhoI und HindIII im Doppelverdau gespalten. Die Fragmente wurden nach der Auftrennung über Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen und diese wurde mit einer radioaktiv markierten ³²P-Sonde für *AtACT1*-DNA hybridisiert. Sonde: *AtACT1*-cDNA aus pGWB14-*AtACT1*, mit XhoI/HindIII gespalten (1112 bp, siehe 7.5.). WT = Wildtypkontrolle, EV = Leervektorkontrolle, B, H, M, Z = unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, λPstI = DNA-Größenmarker.

3.6.2. Nachweis der Expression von *AtACT1*-Transkript in transgenen Kartoffellinien

Aus Blättern regenerierter Pflanzen wurde RNA isoliert und in einer Northernblot-Analyse die Menge von *AtACT1*-Transkript überprüft. Als Sonde diente radioaktiv markierte *AtACT1*-DNA (1659 bp, siehe 7.5.), die durch Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen BamHI und EcoRI aus pGWB14-*AtACT1* erhalten wurde. Der Northernblot zeigte ein Signal für *AtACT1*-Transkript bei den unabhängigen transgenen Linien B, H, M und Z. Bei den Kontrolllinien Wildtyp und Leervektor konnten keine Signale auf dem Blot detektiert werden (Abbildung 23).

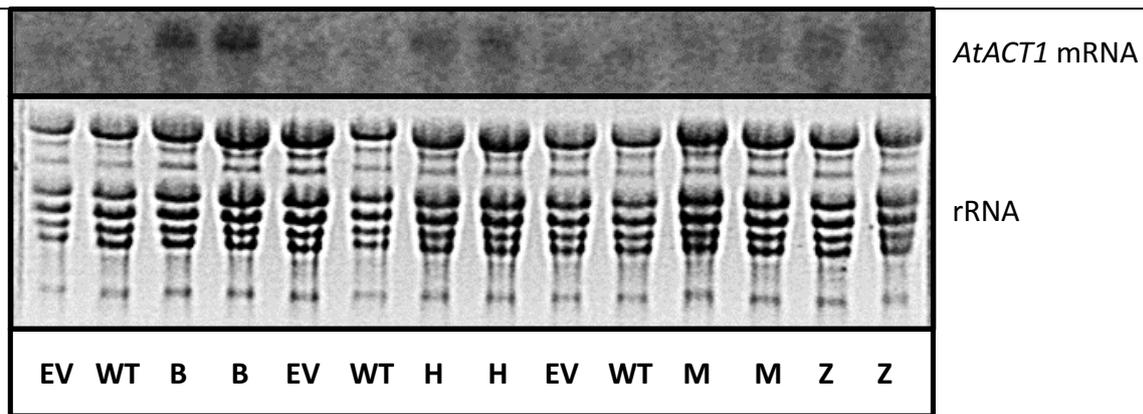


Abbildung 23: Northernblot der transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien (Abbildung stellvertretend für 3 Experimente, n = 6). Northern-Hybridisierung wurde mit RNA aus Blattmaterial der Kartoffelpflanzen durchgeführt. Die RNA wurden nach der Auftrennung über Gelelektrophorese auf eine Nylonmembran übertragen und diese wurde mit einer radioaktiv markierten ^{32}P -Sonde für *AtACT1*-Transkript hybridisiert. Sonde: *AtACT1*-DNA aus pGWB14-*AtACT1*, restriktiert mit BamHI und EcoRI (1659 bp). WT = Wildtypkontrolle, EV = Leervektorkontrolle, B, H, M, Z = unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Linien

3.6.3. Nachweis von *AtACT1* in transgenen Kartoffellinien per qRT-PCR

Da in der Northernblot- und Southernblot-Analyse die Banden der transgenen *AtACT1* exprimierenden Linien M und Z sehr schwach waren (Abbildung 22 und Abbildung 23) wurde die Expression des *AtACT1*-Gens in den transgenen Linien per qRT-PCR überprüft. Die relative Expression von *AtACT1* wurde über qRT-PCR mit einer genspezifischen Sonde gezeigt (Abbildung 24). Dabei wiesen alle transgenen Linien *AtACT1*-Transkripte auf, während die Kontrolllinien Wildtyp und Leervektor keine Expression des *AtACT1*-Gens zeigten.

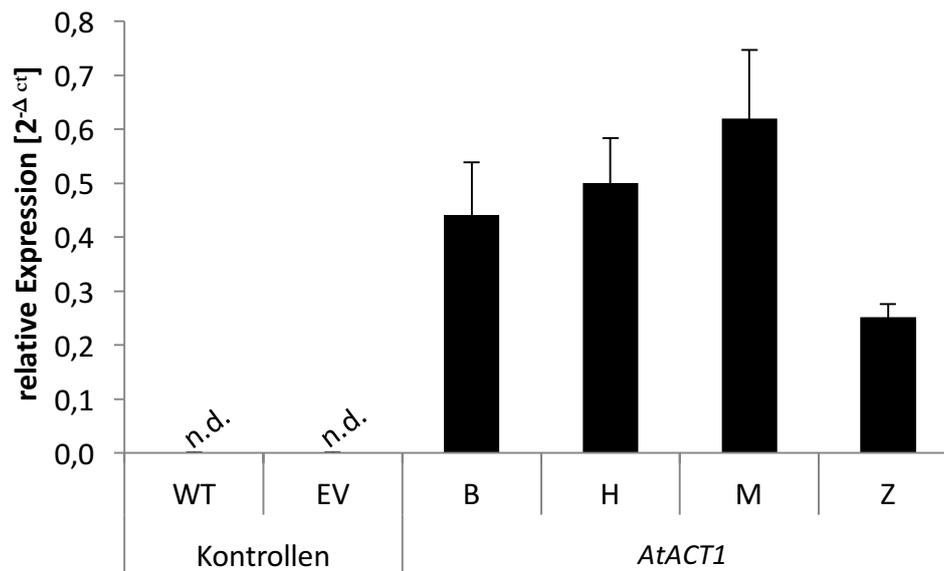


Abbildung 24: Relative Expression des Gens *AtACT1* in transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien durch qRT-PCR.

Die RNA wurde von unbehandelten Kartoffelpflanzen-Blattmaterial isoliert, mit Oligo-d(T)18-Primer revers transkribiert und anschließend mit genspezifischen Primern und genspezifischer Sonde amplifiziert. 2 Experimente: WT = Wildtypkontrolle (n = 7), EV = Leervektorkontrolle (n = 5), B, H, M, Z = unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Linien (je Linie n = 3). N.d. – nicht detektierbar. Statistik: SEM

3.7. Veränderte HCAA-Gehalte in transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien

Um zu untersuchen, ob die Expression der *AtACT1* in Kartoffel zu veränderten Hydroxyzimtsäureamidmustern in den Blättern führte, wurde ein ungerichtetes Metabolitenprofil der methanolische Extrakte von *P.-infestans*-infizierten Blattscheiben der transgenen Linien mittels UHPLC-ESI-QTOF-MS erstellt. Drei Wochen alte transgene *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien sowie Leervektor- und Wildtyp-Kontrolllinien wurden mit einer *P.-infestans* –Zoosporensuspension inokuliert. Drei Tage nach Inokulierung wurden mit einem Korkbohrer Blattscheibenproben der inokulierten Stellen genommen. Mit den Blattscheiben erfolgten methanolische Extraktionen und anschließend eine ungerichtete Metabolitenanalyse. In den methanolischen Blattextrakten wurde in allen transgenen *AtACT1* exprimierenden Linien im Vergleich zu den Kontrolllinien signifikant erhöhte Mengen des HCAAs *p*-Cumaroylputreszin gemessen (Abbildung 25). *p*-Cumaroylputreszin wurde ebenfalls in der Literatur als Produkt der *AtACT1* beschrieben (Muroi *et al.*, 2009, 2012). In Blattextrakten von *A. thaliana* (siehe 3.3) war *p*-Cumaroylputreszin nicht messbar. In transgenen Kartoffellinien war es jedoch in allen drei Experimenten signifikant erhöht gegenüber den Kontrolllinien. In Abbildung 25 ist

stellvertretend das Ergebnis von Experiment 3 zu sehen. Die Ergebnisse von Experiment 1 und 2 befinden sich im Anhang (7.6.4; Abbildung 42, Abbildung 43). Da zwischen den einzelnen Experimenten der Laufmittelgradient angepasst werden musste, um eine bessere Basislinientrennung der *cis*- und *trans*-Isomere der HCAAs zu erreichen, ließen sich die Daten nicht zusammenfassen. Die transgene Linie B zeigte in zwei von drei Experimenten die höchsten *p*-Cumaroylputreszin-Gehalte aller transgenen Linien. Die *p*-Cumaroylputreszingehalte der transgenen Linien waren bis zu 14-fach höher als die Gehalte in den Kontrolllinien (Abbildung 25).

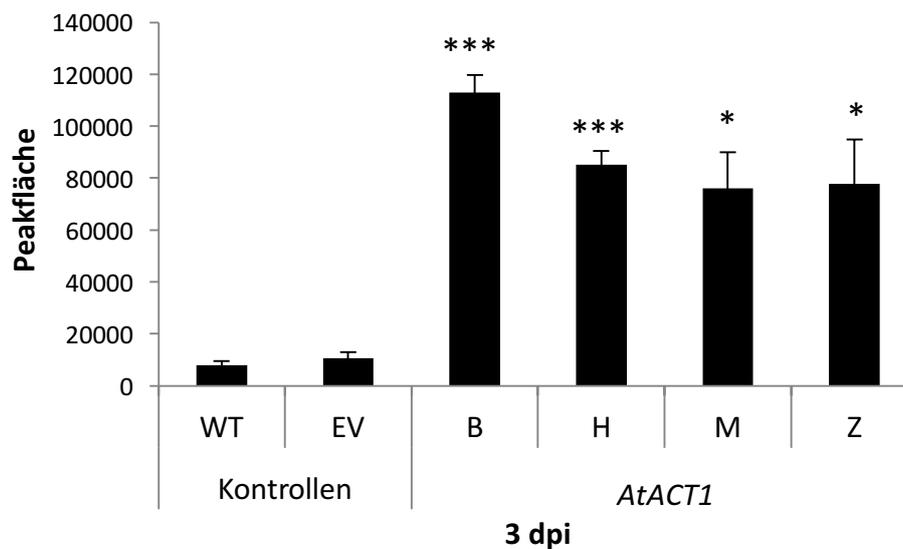


Abbildung 25: *p*-Cumaroylputreszin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 3).

Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: 1×10^5 /ml) inokuliert mit $18 \times 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 235.1441 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); AtACT1 B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1*-exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 8. Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

Eine ebenfalls signifikante, vierfache Erhöhung gegenüber den Kontrolllinien in den genen *AtACT1*-exprimierenden Linien (Linie B) wurde bei *p*-Cumaroylagmatin in lierten Kartoffelblattscheiben gemessen (Abbildung 26). Abbildung 26 zeigt stellvertretend für alle drei Experimente, da auch hier eine Zusammenfassung der Daten aus allen drei Experimenten durch das Modifizieren des Lösungsmittelgradienten zwischen den ten nicht möglich war. Die beiden anderen Experimente befinden sich im Anhang

(Abbildung 44, Abbildung 45) und zeigten ebenfalls signifikant erhöhte *p*-Cumaroylagmatingehalte in den Blattextrakten der transgenen Linien gegenüber den Kontrolllinien. *S. tuberosum* zeigte auch ohne transgene *AtACT1*-Expression Gehalte des boliten *p*-Cumaroylagmatin (Abbildung 26). Im Gegensatz dazu wiesen Wildtyp und Leervektorkontrollen sehr geringe *p*-Cumaroylputreszingehalte auf (Abbildung 25).

In *A. thaliana* konnte *p*-Cumaroylputreszin im Metabolitenprofil nicht gefunden werden. In Kartoffelblättern trat es als zweites Produkt der rekombinanten *AtACT1* in Kartoffel auf. Laut persönlicher Mitteilung von Elke Blum (Mitarbeiterin der Kooperationsarbeitsgruppe von Birgit Dräger, MLU Halle-Wittenberg) kann die *AtACT1* auch Putreszin als Akzeptorsubstrat für die Biosynthese von HCAAs nutzen. Zudem wurden in den Blattextrakten der *AtACT1* exprimierenden transgenen Kartoffellinien signifikant erhöhte Mengen der HCAAs Caffeoylputreszin, *p*-Cumaroylspermidin und Feruloylspermidin gemessen (Dobritzsch *et al.*, 2016). Da *p*-Cumaroylagmatin sowohl in *A. thaliana* und *S. tuberosum* vorkommt, wurde sich in weiteren Untersuchungen vorwiegend auf das *p*-Cumaroylagmatin fokussiert.

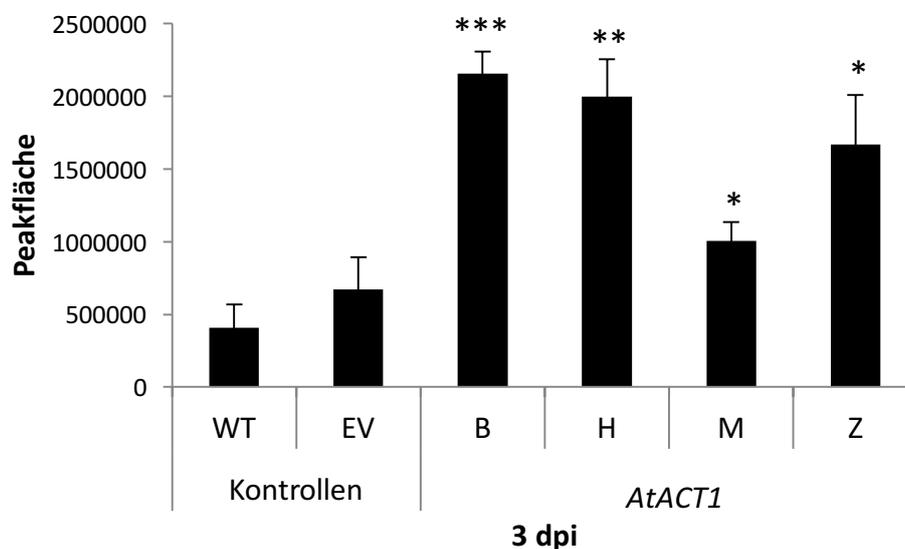


Abbildung 26: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 2).

Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Ausstopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: 1×10^5 /ml) inokuliert mit $18 \times 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, teilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blätter wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS analysiert. m/z 277.1659 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); *AtACT1* B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 4. Statistik: SEM;

zen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,01$ **, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

3.8. Gehalt an sezerniertem *p*-Cumaroylagmatin in transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien

Nachdem gezeigt wurde, dass die transgenen *AtACT1*-exprimierenden Linien hohe *p*-Cumaroylagmtingehalte in den mit *P. infestans* infizierten Blattscheiben aufwiesen (Abbildung 26), war von Interesse zu untersuchen, ob Kartoffel in der Lage ist das *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum zu sezernieren. Dafür wurden Pflanzen mit *P.-infestans*-Zoosporensuspension inokuliert, mit einem Sterilfiltrat der Zoosporensuspension oder mit Wasser. Einen Tag später wurden die Inokulationstropfen vom Blatt wieder abgenommen und die darunter liegenden Blattscheiben geerntet. Im Inokulum wurden die *p*-Cumaroylagmatingehalte per UHPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt und in den Blattscheiben nach methanolischer Extraktion.

3.8.1. *p*-Cumaroylagmatin in Blättern von transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien

Zur besseren Übersicht wurden hier die Kontrollen, Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien, sowie die vier unabhängigen transgenen *AtACT1*-exprimierenden Linien B, H, M und Z zusammengefasst (Abbildung 27). Die Blattscheiben der transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien wiesen im Vergleich zu den Kontrolllinien (46 ± 19 nmol*g⁻¹ FG) bereits einen Tag nach Inokulation signifikant erhöhte *p*-Cumaroylagmatingehalte (105 ± 38 nmol*g⁻¹ FG) auf (Abbildung 27), wie nach drei Tagen ebenfalls zu sehen war (Abbildung 26). Allerdings waren die Unterschiede in den *p*-Cumaroylagmatingehalten in Kartoffelblättern zwischen den verschiedenen Behandlungen, *P. infestans*, Sterilfiltrat oder Wasser, nicht signifikant. Im Gegensatz zu *A. thaliana* (Abbildung 12) war die *p*-Cumaroylagmatin-Biosynthese in Kartoffelblättern durch *P. infestans* nicht induziert.

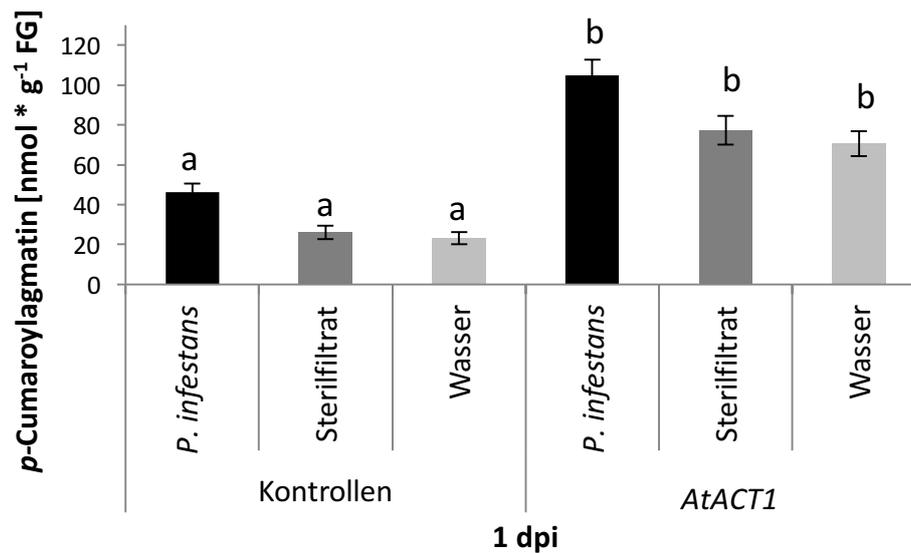


Abbildung 27: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*-Zoosporen (1×10^5 /ml) ■, einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension ■ oder Wasser ■. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: 1×10^5 /ml), einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension oder Wasser inokuliert. Dabei wurden $30 \times 10 \mu\text{l}$ je Inokulierungssubstrat pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4 inokuliert. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach einem Tag, nachdem vorher das Inokulum abgenommen wurde. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; 3 Experimente; Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien zusammengefasst ($n = 20$ je Behandlung); *AtACT1*- unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien B, H, M, Z zusammengefasst ($n = 24$ je Behandlung); quantifiziert wurde über eine *p*-Cumaroylagmatin-Eichgerade, Statistik: SEM; Signifikanzen zu Kontrollen oder Behandlungsart sind mit Kleinbuchstaben dargestellt, P-Wert $\leq 0,001$ b (one way ANOVA)

3.8.2. *p*-Cumaroylagmatin in Tropfen auf transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien

Im Inokulum, das nach Entnahme von der Blattoberfläche direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen wurde, waren einen Tag nach Inokulierung sehr geringe Mengen *p*-Cumaroylagmatin enthalten ($0,01 \pm 0,01 \mu\text{M}$ bis $0,21 \pm 0,14 \mu\text{M}$, Abbildung 28) und dies trotz erhöhter *p*-Cumaroylagmatiningehalte in den Blattscheibenextrakten. In den Tropfen mit *P. infestans*-Zoosporen waren die *p*-Cumaroylagmatiningehalte zwar signifikant höher als in Filtrat- oder Wassertropfen, jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den Kontrollen und den transgenen *AtACT1*-exprimierenden Linien. Das Ergebnis wies, darauf hin, dass in Kartoffelpflanzen nur sehr wenig *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten detektiert wurde. Gleiche Ergebnisse lieferte der unter 3.5. beschriebene Vergleich der *p*-Cumaroylagmatiningehalte zwischen *A. thaliana*- und *S. tuberosum*-Wildtyppflanzen. Es ist also

davon auszugehen, dass der intrazelluläre *p*-Cumaroylagmatin Gehalt anscheinend den Export des Metaboliten in den Apoplasten nicht limitiert.

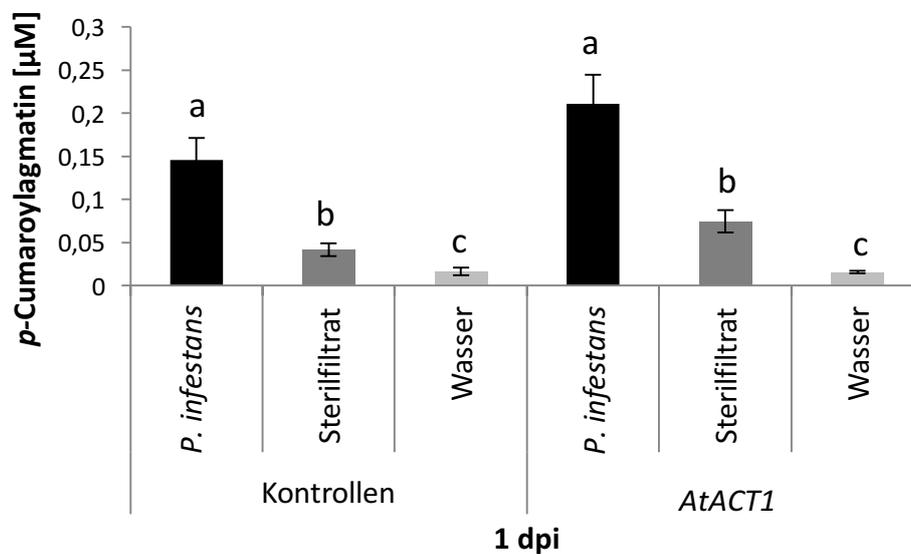


Abbildung 28: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte im Inokulum (*P. infestans*-Zoosporen (1×10^5 /ml) ■, einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension ■ oder Wasser ■) welches einen Tag nach Inokulierung vom Kartoffelblatt abgenommen wurde. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: 1×10^5 /ml), einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension oder Wasser inokuliert. Dabei wurden $30 \times 10 \mu\text{l}$ je Inokulierungssubstrat pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4 inokuliert. Ernte des Inokulum erfolgte nach einem Tag. Nach Abzentrifugation wurde das Inokulum anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; 3 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinie zusammengefasst ($n = 20$ je Behandlung); AtACT1- unabhängige transgene *AtACT1*-exprimierende Kartoffellinien B, H, M, Z zusammengefasst ($n = 24$ je Behandlung); quantifiziert wurde über eine *p*-Cumaroylagmatin-Eichgerade. Signifikanzen zu Kontrollen oder Behandlungsart sind mit Kleinbuchstaben dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ b,c; (one-way ANOVA) Transgene Expression von *AtMATE* in Kartoffel

In *A. thaliana* wurde gezeigt, dass in *AtMATE*-*knock-out*-Linien (*mate*) die Fähigkeit, *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten zu exportieren, nicht mehr besaßen (siehe 3.3.2.). Das ließ darauf schließen, dass das von diesem Gen kodierte Protein AtMATE für den Transport von *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten verantwortlich sein könnte. Da Kartoffel *p*-Cumaroylagmatin schlecht exportiert, bot sich das „Kartoffelsystem“ für eine funktionelle Analyse der Exportfunktion von AtMATE für *p*-Cumaroylagmatin an und das Gen *AtMATE* wurde hierfür in Kartoffel exprimiert.

Für eine Expression von *AtMATE* in Kartoffel wurde *AtMATE*-cDNA in den binären Vektor (pGWB14) kloniert und anschließend über *A. tumefaciens*-vermittelte

Blattscheibentransformation in der anfälligen Kartoffelsorte *S. tuberosum* L. cv. Désirée transferiert. Die Transformation der *E.-coli*-Zellen DH5 α oder TOP10 mit der *AtMATE*-cDNA schien lethal zu sein. Erst die Verwendung von *E.-coli*-Mach1-Zellen führte zu positiven Klonen, in denen die *AtMATE*-cDNA durch Restriktion von isolierter Plasmid-DNA mit unterschiedlichen Enzymen (HindIII, NdeI, SacI, XhoI + StuI) nachgewiesen wurde.

Von zehn potentiell transgenen *AtMATE*-cDNA exprimierende Pflanzen zeigten fünf Kandidatenlinien nach Northernhybridisierung Signale für *AtMATE*-Transkript (siehe 7.6.6., Abbildung 48). In einer später durchgeführten Überprüfung der Expression durch qRT-PCR konnte keine Expression von *AtMATE*-cDNA in den transgenen Pflanzen mehr nachgewiesen werden. Die transgenen Pflanzen zeigten auch keine erhöhten Mengen an *p*-Cumaroylagmatin im Inokulum 24 Stunden nach Inokulierung mit *P. infestans* (siehe 7.6.7, Abbildung 49). Eine veränderte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* zeigten diese Pflanzen ebenfalls nicht (siehe 7.6.9, Abbildung 51).

Da alternatives Splicen bei der Expression von *AtMATE* eine Rolle spielen könnte (Remy *et al.*, 2013), wurde die Transformation von Kartoffel mit der genomischen DNA von *AtMATE* mit allen sechs Introns wiederholt. Hierbei traten keine Probleme mit dem *E.-coli*-Wachstum oder der Kallusbildung bei der *A.-tumefaciens*-vermittelten Transformation in Kartoffelblattscheiben auf. Leider waren generierten Pflanzen zum Ende dieser Arbeit noch nicht so weit entwickelt und vermehrt, als dass noch Experimente hätten durchgeführt werden können.

3.9. Transgene Expression von *AtACT1-AtMATE* in Kartoffel

Trotz erhöhter *p*-Cumaroylagmatinergehalte in den Blattscheiben der transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien konnte kein biochemischer Phänotyp bei den transgenen *AtMATE*-cDNA exprimierenden Kartoffellinien beobachtet werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Arabidopsis-*knock-out*-Linien ließen aber dennoch eine Beteiligung von *AtMATE* am Export von *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten vermuten. Nunmehr sollten beide Gene, *AtACT1* und *AtMATE*, zusammen in *S. tuberosum* exprimiert werden. Als Methode zur Klonierung mehrerer Gene mit speziellen Promotoren und Resistenzen wurde das *Golden-Gate-Cloning*-System verwendet (Engler *et al.*, 2009, Weber *et al.*, 2011). Hierzu wurden zwei Konstrukte kloniert (Abbildung 29). Beide Konstrukte enthielten im Zielvektor pL2-1 eine Kanamycin-Resistenz-Kassette hinter einem NOS-Promotor

(Nopalinsynthese) zur Selektion transgener Pflanzen und die kodierende Sequenz des *AtACT1*-Gens unter Kontrolle des 35S-Promotor (CaMV 35S-Promotor) (Abbildung 29). Um erneute Probleme mit der Expression von *AtMATE*-cDNA zu umgehen, wurde in beiden Konstrukten das erste Intron der genomischen *AtMATE*-Sequenz mitkloniert. In einem Vektor wurde das *AtMATE*-Gen unter 35S-Promotor exprimiert (Abbildung 29 A); im Folgenden als p35S-*ACT*-p35S-*MATE* bezeichnet. Im zweiten Konstrukt wurde das *AtMATE*-Gen unter einem chloroplastidären, blattspezifischen Promotor aus *S. tuberosum* exprimiert (Stockhaus *et al.*, 1989; Abbildung 29 B), nachbezeichnet als p35S-*ACT*-pStLS1-*MATE*.

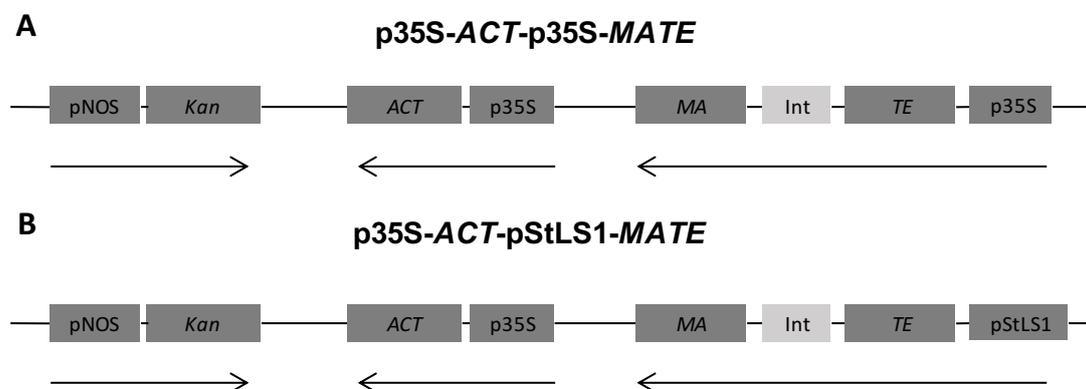


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Genstruktur in den Vektoren p35S-*ACT*-p35S-*MATE* (A) und p35S-*ACT*-pStLS1-*MATE* (B). Die Konstrukte A und B wurden nach dem *Golden-Gate-Cloning*-Protokollen nach (Engler *et al.*, 2009) und (Weber *et al.*, 2011) über Level 0-, Level 1- und Level 2-Modulen in „Eintopf“-Reaktionen mit den Restriktionsenzymen Typ IIS (BpiI und BsaI) und Ligase assembliert. A) Gene *AtACT1* und *AtMATE* werden unter CaMV 35S-Promotor exprimiert. B) Gen *AtACT1* wird unter CaMV 35S-Promotor exprimiert und *AtMATE* unter Kontrolle des blattspezifischer Promotor aus *S. tuberosum* StLS1. *ACT* – *AtACT1*-Gen; *MATE* – *AtMATE*-Gen; *Kan* – Kanamycin-Resistenzkassette; pNos – Nopalinsynthese-Promotor; p35S – CaMV 35S-Promotor; StLS1 – Blattspezifischer Promotor aus *S. tuberosum* (Stockhaus *et al.*, 1989)

3.9.1. Expression von *AtACT1*-*AtMATE* in transgenen Kartoffellinien

Die nach der *A. tumefaciens*-vermittelten Transformation regenerierte Kartoffellinien wurden auf *AtACT1*- und *AtMATE*-Transkript über Northernhybridisierung geprüft. Der Northernblot (Abbildung 30) zeigte bei den unabhängigen Linien D, K, N, und X der transgenen p35S-*AtACT1*-p35S-*AtMATE*-exprimierenden Kartoffelpflanzen, *AtACT1*- und *AtMATE*-Transkripte in unterschiedlichen Bandenstärken. Die unabhängigen Linien A, B, S und V, deren *AtMATE*-Gen unter Kontrolle des StLS1-Promotor exprimiert de, zeigten ebenfalls Signale, nach der Hybridisierung sowohl mit einer *AtACT1*-cDNA-

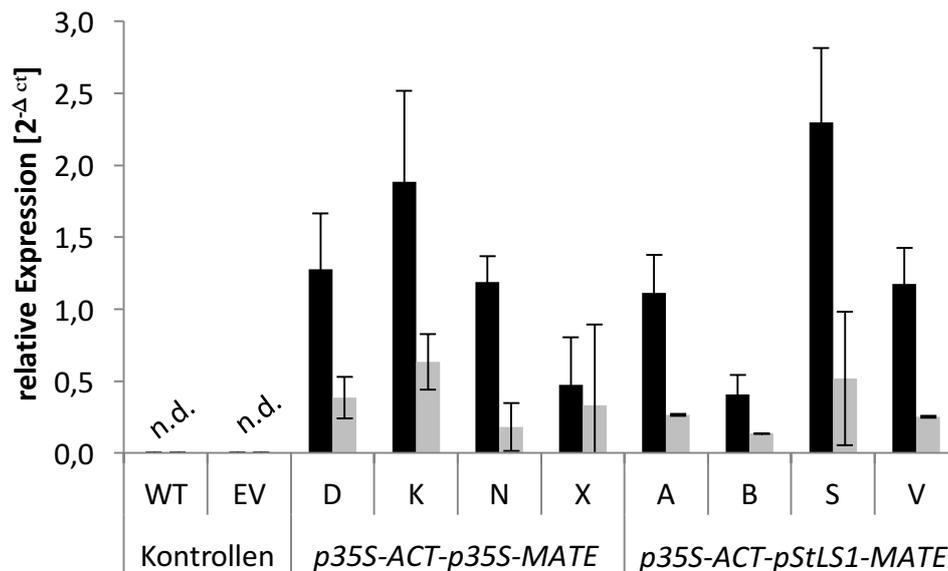


Abbildung 31: Relative Expression der Gene *AtACT1* (■) und *AtMATE* (■) in unbehandelten transgenen *AtACT1*- und *AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien bezogen auf das Gen *EF1a*. Die RNA wurde von unbehandeltem Blattmaterial isoliert und mit Oligo-d(T)18-Primern revers transkribiert und anschließend mit genspezifischen Primern und genspezifischen Sonden amplifiziert. 2 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektor Kontrolllinien (WT, n=8 (*AtACT1*-Sonde), n=7 (*AtMATE*-Sonde), EV, n=6 (*AtACT1*-Sonde), n=5 (*AtMATE*-Sonde); p35S-ACT-p35S-MATE – unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (n=3, je *AtACT1*-Sonde und *AtMATE*-Sonde); p35S-ACT-pSTLS1-MATE - unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (*AtACT1*) und STLS1-Promotor (*AtMATE*) (A, n=3; B, n=3; S, n=3; V, n=3, je *AtACT1*-Sonde und *AtMATE*-Sonde). Signifikanzen zu Kontrollen (WT, EV) sind mit Sternen dargestellt, P-Wert < 0,05 *, P-Wert < 0,01 ** (Student'scher t-Test).

3.10. Morphologischer Phänotyp der transgenen p35S-*AtACT1*-p35S-*AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien

Die transgenen Kartoffellinien, deren *AtACT1*- und *AtMATE*-Gene unter Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert wurden, zeigten morphologische Veränderungen (Abbildung 32) gegenüber Kontrollpflanzen. Die transgenen Linien waren kleiner als die Wildtyp- und Leervektorlinien. Nur bei Linie D war die Standfestigkeit der Pflanzenstängel gegeben. Die Blätter waren kleiner und hatten größtenteils chlorotische und nekrotischen Flecken.

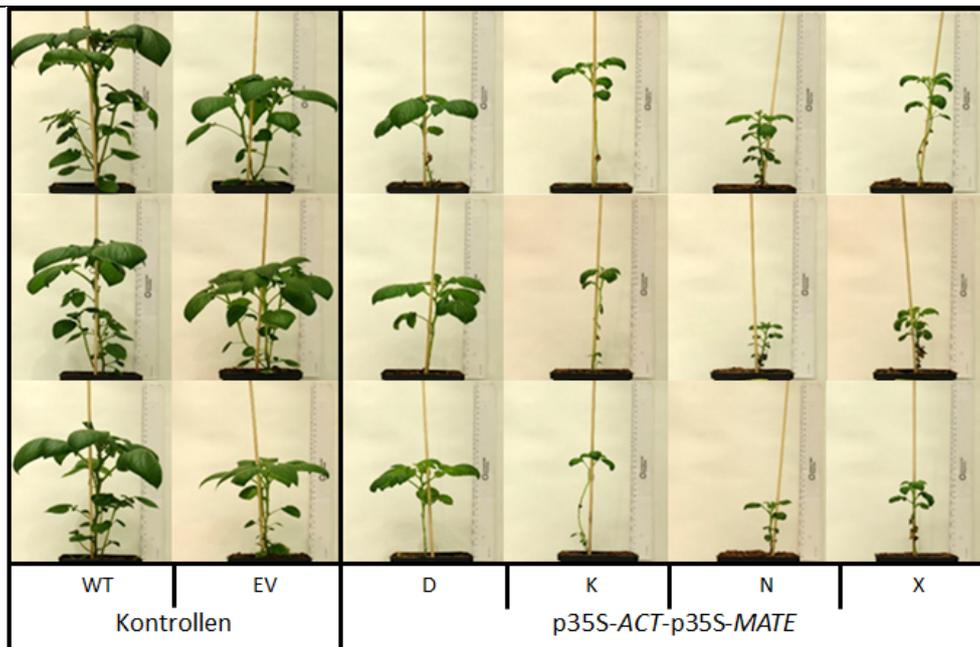


Abbildung 32: Morphologischer Phänotyp von transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien. Die Aufnahmen wurden drei Wochen nach Austopfen von Medium in Erde gemacht. Kontrolllinien: WT = Wildtyp, EV = Leervektorlinie, *p35S-ACT-p35S-MATE* D, K, N, X = transgene *AtACT1-AtMATE*-exprimierende Kartoffellinien mit beiden Genen unter Kontrolle eines 35S-Promotor. Der veränderte morphologische Phänotyp wurde in allen durchgeführten Experimenten beobachtet (10 Experimente, $n \geq 20$ je Linie)

3.11. Gehalt an *p*-Cumaroylagmatin in transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien

Nachdem in den transgenen Kartoffellinien die Expression beider Gene *AtACT1* und *AtMATE* nachgewiesen werden konnte, wurden die *p*-Cumaroylagmatingehalte in den Blattscheiben und im Inokulum nach Infektion mit *P. infestans* bestimmt. Dafür wurden die Blätter der transgenen Linien mit *P. infestans*-Zoosporen inokuliert. Nach einem Tag wurden *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum und in den dazugehörigen Blattscheiben über UHPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt (vergl. Kap. 3.8.).

3.11.1. *p*-Cumaroylagmatin in Blattscheiben transgener *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien

Zur Bestimmung der *p*-Cumaroylagmatingehalte in den Blattscheiben der transgenen *AtACT1*- und *AtMATE*-exprimierenden Linien wurde von inokulierten Blattscheiben thanolische Extrakte hergestellt. Die per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessenen Extrakte zeigten durchweg signifikant erhöhte Mengen an *p*-Cumaroylagmatin im Vergleich zu den

Kontrollextrakten. Bei den Linien K, N und X, bei denen beide Gene konstitutiv unter nem 35S-Promotor exprimiert wurden, waren die *p*-Cumaroylagamingehalte um ein 12- bis 16-faches erhöht ($243 \pm 95 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$; Abbildung 33). Bei Linie D und den transgenen Linien, die den *AtMATE*-Transporter unter Kontrolle des StLS1-Promotors exprimieren, waren die *p*-Cumaroylagamingehalte fünf- bis achtfach gegenüber den Kontrollen erhöht ($120 \pm 49 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} \text{ FG}$). Es wurde auch hier gezeigt, dass die Expression von *AtACT1* zu stark erhöhten Mengen an *p*-Cumaroylagmatin im Blatt führte.

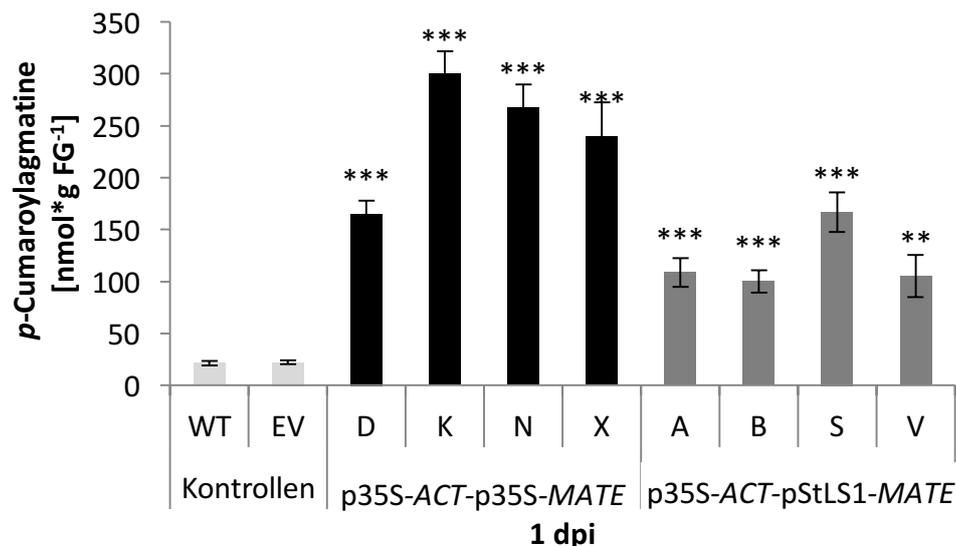


Abbildung 33: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in den Kartoffelblattscheiben einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*-Zoosporen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit der *P. infestans*-Zoosporensuspension inokuiert. Dabei wurden $30 \times 10 \mu\text{l}$ *P. infestans*-Zoosporensuspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4, inokuliert. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach einem Tag, nachdem vorher das Inokulum abgenommen wurde. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; 3 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (■) (WT, $n = 30$, EV, $n = 30$); p35S-*ACT*-p35S-*MATE* (■) – unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (D, $n = 13$; K, $n = 8$; N, $n = 8$; X, $n = 14$); p35S-*ACT*-pStLS1-*MATE* (■) - unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (*AtACT1*) und StLS1-Promotor (*AtMATE*) (A, $n = 7$; B, $n = 6$; S, $n = 7$; V, $n = 7$). Statistik: SEM; Signifikanzen zu Kontrollen mit Sternchen dargestellt, P-Wert $\leq 0,01$ – 0,001 **, P-Wert $\leq 0,0001$ *** (Student'scher t-Test).

3.11.2. Extrazelluläre *p*-Cumaroylagmatin transgener *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien

Es wurden auch im Inokulum der transgenen *AtACT1-AtMATE* Kartoffellinien die *p*-Cumaroylgehalte per UPLC-ESI-QTOF-MS bestimmt. In Abbildung 34 ist zu sehen, dass das in den transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien der Fall war, wenn beide Gene unter einem 35S-Promotor exprimiert wurden. Die höchsten Mengen *p*-Cumaroylagmatin sezernierten die Linien K mit 23 μM ($\pm 14,7 \mu\text{M}$) und die Linie N mit 38 μM ($\pm 25,6 \mu\text{M}$), was 121-fach bis 205-fach höheren Mengen als im Inokulum von Wildtypblättern entsprach. Die Blätter der Linien D und X transportierten weniger *p*-Cumaroylagmatin nach außen, die Werte waren aber dennoch 62-fach (Linie D) und 99-fach (Linie X) erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Von den transgenen Linien, deren *AtMATE*-Gen unter StLS1-Promotor exprimiert wurde, sezernierten nur zwei der vier Linien signifikant höhere Mengen an *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum (Linie S: 16-fach; $2,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$ und Linie V: 3-fach; $0,47 \pm 0,3 \mu\text{M}$). Die Analyse ergab, dass die Expression von *AtMATE* zusätzlich zum *AtACT1*-Gen zu einem Transport von *p*-Cumaroylagmatin aus der Zelle ins Inokulum führte und lässt den Schluss zu, dass der *AtMATE*-Transporter für die Sekretion von *p*-Cumaroylagmatin verantwortlich ist.

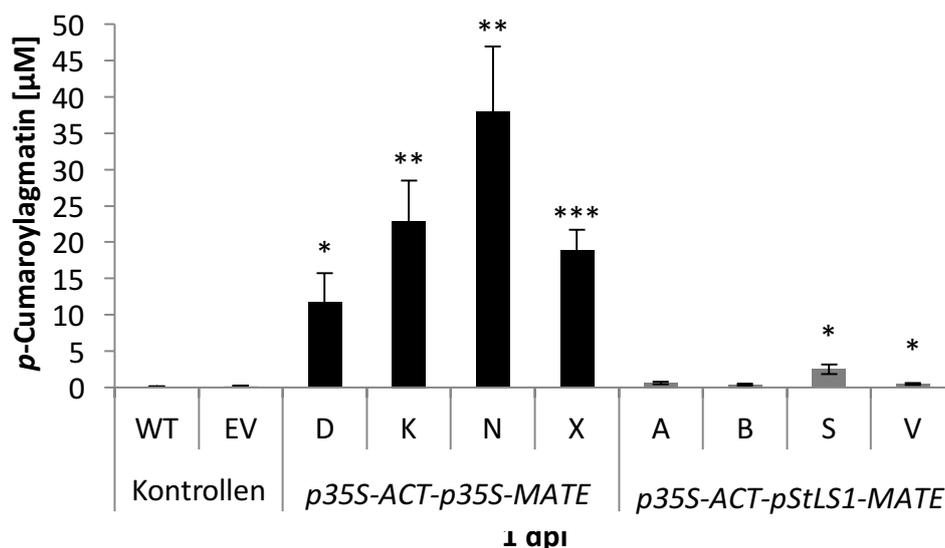


Abbildung 34: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte im Inokulum einen Tag nach Inokulierung von Kartoffelblättern mit *P. infestans* – Zoosporen ($1 \times 10^5/\text{ml}$). Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit der *P. infestans* – Zoosporensuspension inokuliert. Dabei wurden $30 \times 10 \mu\text{l}$ *P. infestans* – Zoosporensuspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4, inokuliert. Ernte des Inokulum erfolgte nach einem Tag. Das

Inokulum anschließend direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 $[M+H]^+$; 3 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (■) (WT, $n = 30$, EV, $n = 30$); p35S-*ACT*-p35S-*MATE* (■) – unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (D, $n = 13$; K, $n = 7$; N, $n = 8$; X, $n = 13$); p35S-*ACT*-pStLS1-*MATE* (■) - unabhängige transgene *AtACT1* und *AtMATE* primierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (*AtACT1*) und StLS1-Promotor (*AtMATE*) (A, $n = 7$; B, $n = 7$; S, $n = 7$; V, $n = 7$). Statistik: SEM; Signifikanzen zu Kontrollen mit Sternchen dargestellt, P-Wert $\leq 0,01$ – 0,001 **, P-Wert $\leq 0,0001$ *** (Student'scher t-Test).

3.12. Relative Quantifizierung von *P. infestans*-Biomasse in transgenen Kartoffelpflanzen

Da gezeigt werden konnte, dass *p*-Cumaroylagmatin die Sporenkeimung von *P. infestans in vitro* inhibiert (Abbildung 17), sollte untersucht werden, ob die erhöhten *p*-Cumaroylagmatingehalte der transgenen *AtACT1* und *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Pflanzen auch *in vivo* einen Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* haben. Die Pflanzen wurden mit *P.-infestans*-Zoosporen inokuliert. Nach drei Tagen wurde die *P.-infestans*-Biomasse auf den inokulierten Blattscheiben über quantitative PCR-Analysen bestimmt. In transgenen Kartoffelpflanzen, die nur *AtACT1* exprimieren, konnte kein Unterschied zwischen den transgenen Linien B, H, M und Z und Kontrollen in der Infektion mit *P. infestans* bestimmt werden (Abbildung 35). Somit wurde durch die alleinige Expression von *AtACT1* in Kartoffel trotz hoher *p*-Cumaroylagmatingehalte keine erhöhte Resistenz gegenüber *P. infestans* erzielt.

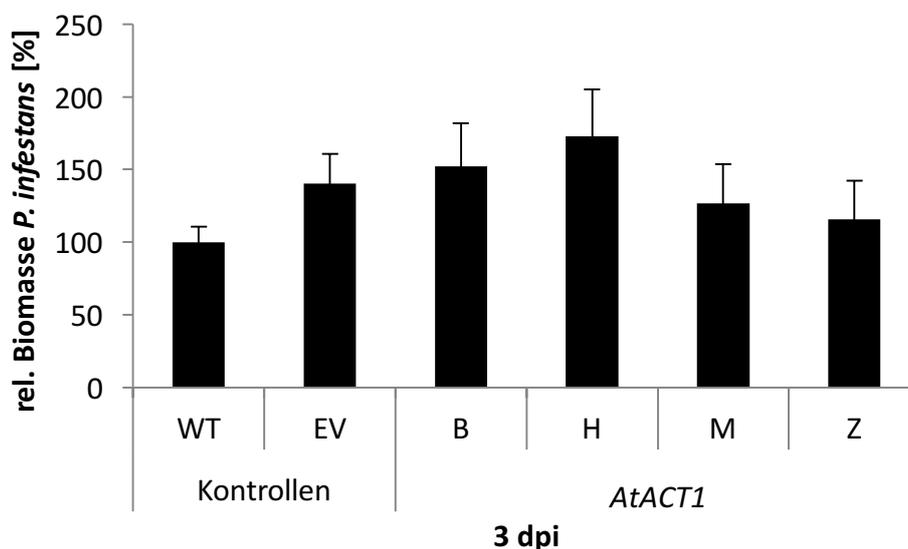


Abbildung 35: *P. infestans*-Infektion von transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien. Die Kartoffellinien den drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit *P.-infestans*-Zoosporensuspension inokuliert ($18 \times 10 \mu\text{l}$ *P. infestans* -Zoosporensuspension ($1 \times 10^5/\text{ml}$) pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4), okuliert. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die *P.-infestans*-Biomasse wurde durch qPCR, nach Isolierung der genomischen DNA aus den infizierten Blattscheiben, bestimmt. 3 Experimente:

Kontrolllinien (WT – Wildtyp, n = 24 und EV – Leervektorlinie, n = 24). *AtACT1* B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 12; Statistik: SEM, Signifikanzen zu WT- und EV-Kontrolllinien: keine (Student'scher t-Test).

Drei der vier unabhängigen transgenen Linien, die *AtACT1* und *AtMATE* unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimierten, zeigten weniger *P. infestans*-Biomasse im Vergleich zu den Kontrolllinien (Wildtyp und Leervektorkontrolllinie, Abbildung 36) drei Tage nach Inokulierung. Die Linie D und X zeigten eine vierfach höhere Resistenz gegen *P. infestans* im Vergleich zu den Kontrollen und Linie K 1,5-fach geringeres Wachstum von *P. infestans*. Bei den transgenen Linien A, B, S, und V, die das *AtMATE*-Gen unter Kontrolle des StLS1-Promotors exprimierten, zeigte nur Linie A eine geringe, aber signifikante, 1,9-fache Verringerung der *P. infestans*-Biomasse gegenüber den Kontrollen. Kartoffelpflanzen, die beide Gene exprimierten, zeigten einen Effekt auf die *P. infestans*-Infektion.

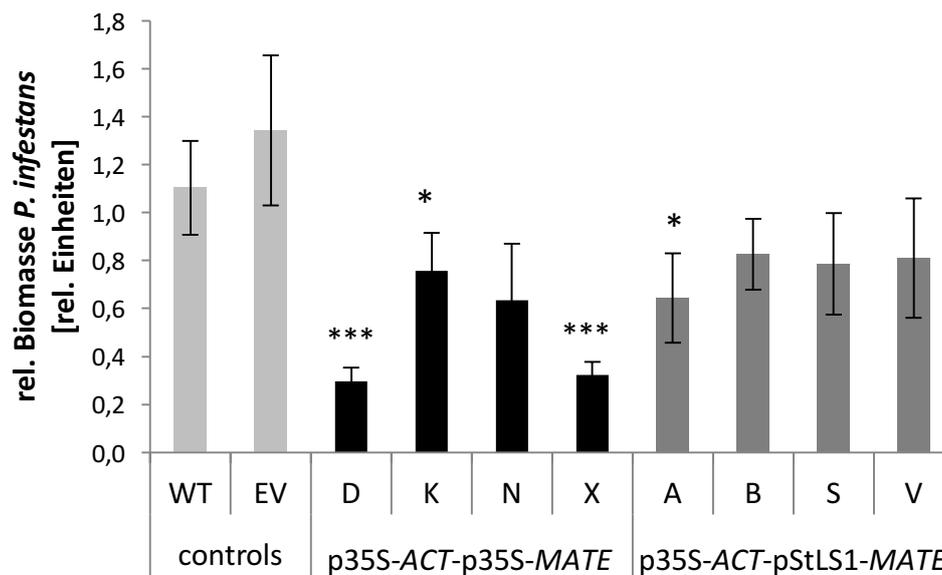


Abbildung 36: *P. infestans*-Infektion von transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Ausstopfen aus der Sterilkultur in Erde mit *P. infestans*-Zoosporensuspension inokuiert ($18 \times 10 \mu\text{l}$ *P. infestans*-Zoosporensuspension ($1 \times 10^5/\text{ml}$) pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blättag 3-4), liert. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die *P. infestans*-Biomasse wurde durch qPCR, nach Isolierung der genomischen DNA aus den infizierten Blattscheiben, bestimmt. 3 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (■) (WT, n = 32, EV, n = 39); p35S-ACT-p35S-MATE (■) – unabhängige transgene *AtACT1*- und *AtMATE*-exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (D, n = 15; K, n = 13; N, n = 10; X, n = 16); p35S-ACT-pStLS1-MATE (■) - unabhängige transgene *AtACT1*- und *AtMATE*-exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (*AtACT1*) und StLS1-Promotor (*AtMATE*) (A, n = 9; B, n = 9; S, n = 10; V, n = 9). Statistik: SEM, Signifikanzen zu Kontrollen mit Sternchen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05^*$, P-Wert $\leq 1 \times 10^{-5}$ *** (Student'scher t-Test).

3.13. *In-vitro*-Inhibierungstest von *p*-Cumaroylagmatin auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans*

Da *p*-Cumaroylagmatin einen Einfluss auf die Sporenkeimung von *P. infestans* hat (3.4.2, Abbildung 18), sollte untersucht werden, ob erhöhte Mengen *p*-Cumaroylagmatin im Inokulum ausreichend sind, um die *P. infestans*-Zoosporenkeimung zu inhibieren. Dafür wurde von *P. infestans*-inokulierten Kontrolllinien, *AtACT1* und *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden transgenen Kartoffellinien das Inokulum nach 24 Stunden vom Blatt genommen, anschließend steril filtriert und zu einer neuen *P. infestans*-Zoosporensuspension gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Sporenkeimungsrate unter dem Mikroskop bestimmt. Das Inokulum aller vier unabhängigen transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien zeigte eine signifikante Inhibierung der *P. infestans*-Zoosporenkeimung gegenüber der steril filtrierten Tropfen der Kontrolllinien (Wildtyp- und Leervektorlinien) sowie transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffelpflanzen. Insgesamt waren die Sporen mit dem Inokulum der *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffelpflanzen um 17,3% ($\pm 1,7\%$) weniger gekeimt als die Sporen mit Inokulum der Kontrollen und 13% ($\pm 1,8\%$) geringer als die Sporen mit Inokulum von Pflanzen die *AtACT1* allein exprimieren. Die Sporenkeimungsrate mit Inokulum der *AtACT1* exprimierenden Kartoffelpflanzen zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der mit Inokuli der Kontrollpflanzen. Der *in vitro*-Versuch korreliert, mit Ausnahme der Linie p35S-*ACT-p35S-MATE* N, mit den Ergebnissen der Resistenzuntersuchungen (3.12., Abbildung 35, Abbi

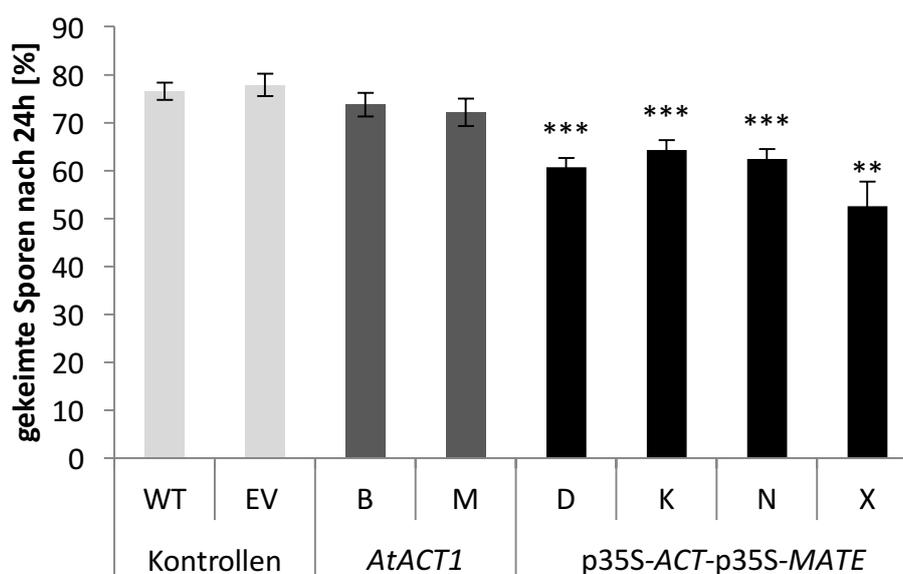


Abbildung 37: *In-vitro*-Inhibierungstest von Inokulum, welches 24 h auf der Blattoberfläche von Kartoffelpflanzen war, auf *P. infestans* -Zoosporenkeimung. 50 μ l *P. infestans*-Zoosporensuspension (3×10^5 Sporen/ml) und 50 μ l steril filtriertes

Inokulum, das vorher 24 h auf Kontrollpflanzen (Wildtyp- und Leervektorkontrollblättern), Blättern von *AtACT1*- oder *AtACT1-AtMATE* (p35S-*ACT*-p35S-*MATE*) exprimierenden Kartoffelblättern war, wurden gemischt. Die Ansätze wurden für 24 h bei 15°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben unter dem Mikroskop fotografiert (10 Bilder pro Probe). Später wurden die Fotos am PC ausgewertet, indem gekeimte Zoosporen und nicht gekeimte Zoosporen gezählt wurden. Als gekeimte Zoospore galt, wenn der Keimschlauch länger als der Durchmesser der Spore war. Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (■) (WT, n = 9, EV, n = 9); *AtACT1*(■) - hängige transgene *AtACT1*-exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (B, n = 9; M, n = 9); p35S-*ACT*-p35S-*MATE* (■) – unabhängige transgene *AtACT1*- und *AtMATE*-exprimierende Kartoffellinien unter 35S-Promotor (D, n = 9; K, n = 8; N, n = 9; X, n = 9). Statistik: SEM, Signifikanzen zu Kontrollen sind mit Sternchen dargestellt, P-Wert ≤ 0,01 – 0,001 **, P-Wert ≤ 0,0001*** (Student'scher t-Test).

Die Untersuchungen zeigten, dass *AtMATE* für den Export von *p*-Cumaroylagamtin verantwortlich ist und dass die Erhöhung der extrazellulären HCAAs mit einer verstärkten Inhibierung des *P.-infestans*-Wachstums korreliert.

4. Diskussion

4.1. Expression von *AtACT1* und *AtMATE* in *A. thaliana* unter Stress

Die Gene *AtACT1* und *AtMATE* sind laut Expressionsdatenbank Genevestigator (genevestigator.com) nur nach sehr wenigen Behandlungen bzw. unter wenigen Bedingungen aktiviert, hauptsächlich nach Pathogenbefall. Sechs Stunden nach *P. infestans*-Inokulierung war die Aktivierung beider Gene am höchsten und nahm dann bis 24 h nach Inokulierung wieder ab (3.1.; Abbildung 9B). Laut des Coexpressionsnetzwerks AttedII (www.atted.jp) waren *AtACT1* und *AtMATE* stark coexprimierte Gene (3.1Abbildung 9A). So zeigten Rowe *et al.* (2010) eine 30-fach stärkere Expression von *AtACT1* und *AtMATE* nach Infektion von *A. thaliana* mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea*, im Vergleich zum nicht aktivierten Zustand. Mit *P. infestans* wurde eine 53-fache Induktion der Expression von *AtACT1* gezeigt. Eine Inokulierung mit dem nekrotrophen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* ergab die höchste Aktivierung (210-fach höher im Vergleich zur Expression des Gens ohne Pathogenstress, genevestigator.com) (Zhu *et al.*, 2013). Silberionen, in Form von AgNO₃, riefen eine fast ebenso starke Aktivierung des Gens hervor wie *P. infestans* (Zhu *et al.*, 2013). Eine schwache Aktivierung wurde auch bei der Behandlung mit verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gezeigt. Sowohl pilzliche Pathogene als auch Metallionen könnten zu ROS in der pflanzlichen Zelle und dem Apoplasten führen (Sharma *et al.*, 2012; Lehmann *et al.*, 2014), was die ähnlichen Aktivierungsraten unter verschiedenen Stressarten erklären könnte.

Das Gen *AtMATE* (*A. thaliana multdrug und toxic compound extrusion*) war unter fast allen Behandlungen, die auch *AtACT1* aktivierten, hochreguliert (www.genevestigator.com). *S. sclerotiorum* bewirkte auch bei *AtMATE* die höchste Aktivierung, mit einer 120-fachen Induktion der Genexpression. Allerdings war bei *AtMATE* die Aktivierung des Gens durch AgNO₃ doppelt so hoch (28-fach) wie durch *P. infestans* (14-fach). Nur ein sehr geringer Teil der annotierten MATEs in *A. thaliana* konnte bisher charakterisiert werden. Die beiden bekanntesten sind ALF5 (*aberrant lateral root formation 5*) und EDS5 (*enhanced disease susceptibility 5*). ALF5 vermittelte in *A. thaliana*-Wurzeln Resistenz gegen Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Pyrrolidon. Wurde ALF5 in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* exprimiert, zierte es Tetramethylammoniumchlorid (TMACl) (Diener *et al.*, 2001). Welche Substanz ALF5 transportiert, ist bis heute nicht bekannt. EDS5 ist ein in die Immunantwort auf

abiotischen und biotischen Stress involvierter MATE-Transporter (Nawrath *et al.*, 2002). So vermittelte EDS5 den Salicylsäureexport aus dem Chloroplasten, dem o-Hydroxybenzoesäure-Syntheseort, sowohl nach Pathogenbefall mit *P. syringae* als auch nach UV-C-Behandlung (Nawrath *et al.*, 2002; Serrano *et al.*, 2013; Yamasaki *et al.*, 2013). falls zu den ersten entdeckten MATEs in *Arabidopsis* zählte DTX1 (*detoxification 1*). Anders als bei vielen anderen pflanzlichen MATE-Transportern sind DTX1-Substrate bekannt. So wurden antibiotisches Norfloxacin, Ethidiumbromid, das Alkaloid Berberin, Palmiat und Cd^{2+} über die Plasmamembran nach außen transportiert, um Resistenz gegen die genannten Agentien zu vermitteln (Li *et al.*, 2002; Remy und Duque, 2014).

Nach Sharma *et al.* (2012) und Lehmann *et al.* (2014) wurde *AtMATE* am höchsten in Schließzellen der Spaltöffnungen exprimiert. Bei *AtACT1* war die Expression in den Schließzellen ebenfalls hoch, allerdings auch in Trichomen und Blattstiel-Epidermis-Zellen. Die hohe Expression beider Gene in den Schließzellen könnte darin begründet sein, dass *P. infestans*-Zoosporen die Pflanze über Stomata, Lentizellen oder Wunden besiedeln (Judelson und Blanco, 2005).

Die MATE-Transporter-Familie ist eine von fünf *multidrug*-Transporter-Proteinfamilien. Entdeckt wurde die Transporterfamilie durch die Identifizierung des bakteriellen MATE-Transporters NorM (*norflaxacin multidrug efflux system*) aus *Vibrio parahaemolyticus* und seinem Homologen in *E. coli*, ydhE (*multidrug efflux protein* NorA, Morita *et al.*, 1998), deren Sequenzen zu keiner bekannten anderen vier *multidrug*-Transporterfamilie (ABC- (*ATP-binding cassette*), MFS- (*major facilitator superfamily*), SMR- (*small multidrug resistance*) und RND-Transporter (*resistance-nodulation cell division*) passten, Paulsen, 2003). Mittlerweile ist bekannt, dass MATE-Transporter ubiquitär in allen Lebewesen verbreitet sind (Omote *et al.*, 2006). Generell besitzen Pflanzen neben ABC- auch eine große Anzahl an MATE-Transportern. So waren beispielsweise im *Arabidopsis*-Genom ca. 130 ABC- und ca. 60 MATE-Transporter-Gene annotiert (Omote *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu den ATP-getriebenen ABC-Transportern sind MATEs sekundäre Transporter, die die Substrattranslokation über Membranen mittels elektrochemischen Gradienten von H^+ - oder Na^+ -Ionen energetisierten (Krulwich *et al.*, 2005; Omote *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2011; Shoji, 2014), wobei man bei Pflanzen nur von H^+ -Ionen gekoppelten Gradienten ausgeht (Remy und Duque, 2014). Gewöhnlich bestehen MATE-Transporter aus zwölf Transmembran- α -Helices mit einer hohen Sequenzähnlichkeit über diese Region, wobei keine einzelnen Sequenzen und Motive in allen Mitgliedern der Proteinfamilie konserviert

sind (Shoji, 2014). Viele MATE-Proteine wiesen eine Sequenzsimilarität von 40% auf (Diener *et al.*, 2001; Omote *et al.*, 2006; He *et al.*, 2010). Pflanzliche MATEs sind laut Annotationen in der Plasmamembran oder im Tonoplast lokalisiert und in der Detoxifikation endogener chemischer Verbindungen wie Sekundärmetaboliten und Xenobiotika involviert (Omote *et al.*, 2006; Shoji, 2014).

4.2. Subzelluläre Lokalisation von AtACT1 und AtMATE in *Arabidopsis thaliana*

Über die Expression von pUBC-*AtACT1*-YFP in *N.-benthamiana*- (3.2.1.; Abbildung 10) und *A.-thaliana*-Zellkulturprotoplasten (3.2.2, Abbildung 11) wurde gezeigt, dass die Agmatin-Cumaroyl-CoA-Transferase AtACT1 im Zytoplasma lokalisiert ist. Die AtACT1 gehörte zu den BAHD-Enzymen. Diese sind nach D'Auria (2006) im Zytosol lokalisiert. Obwohl N-terminale, Stamm-spezifische Proteinmotive bei den BAHD-Enzymen gefunden wurden, wie bspw. ein LTFFD-Motiv bei AtACT1, konnte *in silico* keine Verbindung zwischen diesem N-Terminus-nahen Motiv und vorhergesagter subzellulärer Lokalisierung hergestellt werden (Tuominen *et al.*, 2011). Moglia *et al.* (2014) führte subzelluläre Lokalisierungsstudien mit einer ebenfalls zu den BAHD-Enzymen gehörenden Hydroxycinnamoyl-CoA:Chinat-Hydroxycinnamoyltransferase (SIHQT) aus *S. lycopersicum* durch. In bomardierten Zwiebelepidermiszellen war mit EYFP fusionierte SIHQT (35S-SIHQT-EYFP) im Zytoplasma lokalisiert. Im Gegensatz dazu zeigte mit mRFP fusioniertes SIHQT (35S-SIHQT-mRFP, mRFP ist bei saurem pH stabiler als EYFP) auch eine geringe Expression von SIHQT in der Vakuole. Moglia *et al.* (2014) vermuteten, dass Chlorogensäure (CGA) im Zytoplasma synthetisiert und in die Vakuole zur Speicherung transportiert wird. SIHQT wäre dann sekundär in der Vakuole an der Biosynthese von Dicaffeoyl-Chinat (diCQA) beteiligt. Generell jedoch scheinen Acyltransferasen, die Hydroxycinnamoyl-CoA-Derivate übertragen, vorwiegend im Zytosol lokalisiert zu sein, unabhängig davon, welcher Enzymfamilie sie angehören. So ist bspw. die zur GNAT-Enzymfamilie gehörende Tyramin-N-Hydroxycinnamoyltransferase aus Paprika (Kang *et al.*, 2006) ebenfalls im Zytosol lokalisiert (Facchini *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2007).

Bei der Bestimmung der subzellulären Lokalisation von AtMATE im Rahmen dieser Arbeit war kein Signal des Fusionsproteins YFP zu beobachten. Eine Ursache dafür könnte die Verwendung der *AtMATE*-cDNA zur Fusionierung von *AtMATE* mit YFP in pUBC-*AtMATE*-YFP gewesen sein. Es gab Hinweise darauf, dass viele Transporter erst durch

alternatives Spleißen der prä-mRNA ihre spezifische Lokalisierung in der Zelle erhalten (Remy *et al.*, 2013; Staiger und Brown, 2013). Remy *et al.*, (2013) beschrieben alternatives Spleißen, das zu zwei Isoformen führte, bei einem AtMFS-Transporter (*major facilitator family*), der wie AtMATE zu den Multidrug-Transportern gehörte (Omote *et al.*, 2006). Eine Isoform ist im Tonoplast von Wurzelzellen lokalisiert und die andere Isoform in der Plasmamembran von Blatt-Stomata-Schließzellen. Beide Isoformen transportieren Auxin. Die Volllängen-Isoform war für Auxin-vermittelte Prozesse verantwortlich, die kürzere Isoform vermittelte Trockenstresstoleranz. Es besteht somit die Möglichkeit, dass die *AtMATE*-prä-mRNA in der Pflanzenzelle verschiedene Spleiß-Varianten und damit auch verschiedene subzelluläre Lokalisierungen hat. Pflanzliche MATE-Transporter scheinen entweder in der Plasmamembran oder im Tonoplast lokalisiert zu sein, wofür auch die postulierten zwölf Transmembranhelices sprechen (Omote *et al.*, 2006).

4.3. Funktionelle Analyse von *AtACT1* und *AtMATE* in *A. thaliana*

Im Vorfeld der Arbeit konnte in der AG Rosahl in Kooperation mit der AG Dräger (MLU Halle) über die Expression von *AtACT1* in *E. coli* und anschließenden Enzymassays mit dem rekombinanten AtACT1-Protein, gezeigt werden, dass AtACT1 für die Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin mit *p*-Cumaroyl-CoA oder Feruloyl-CoA und Agmatin als Ausgangssubstrate verantwortlich ist (Jakobitz, 2009). Im gleichen Jahr zeigten Muroi *et al.* ebenfalls die AtACT1-vermittelte Synthese von *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin. Außerdem beschrieben sie, dass nach Infektion mit *A. brassicicola* die Akkumulation von *p*-Cumaroylagmatin, Feruloylagmatin, *p*-Cumaroylputreszin und Feruloylputreszin in den Blättern der *AtACT1-knock-out*-Mutante nicht mehr stattfand. Damit war die Annotierung von Nagata *et al.* (2005), wonach *At5g61160* für eine Anthocyanin-5-aromatische Acyltransferase (AAT) kodiert, widerlegt. Bereits 2007 stellten Luo *et al.* in Frage, dass *At5g61160* für eine AAT kodiert, da *At5g61160* unter Behandlung mit erhöhten Saccharose-Konzentrationen, die zu einer erhöhten Anthocyaninbildung in *A. thaliana* führt, nicht aktiviert wurde. Das Fehlen der Akkumulation von *p*-Cumaroylagmatin nach *P. infestans*-Inokulierung in den Blattscheiben der *AtACT1*-Mutante (*act1*), wurde in dieser Arbeit gezeigt (Abbildung 12). Ebenso wie reduzierte Mengen an Feruloylagmatin (Dobritzsch *et al.*, 2016). Die erniedrigten *p*-Cumaroyl- und Feruloylputreszingehalte wie bei Muroi *et al.* (2009) konnten in dieser Arbeit nach Inokulierung mit *P. infestans* allerdings

nicht bestätigt werden. Das kann daran liegen, dass zum einen Muroi *et al.* (2009) mit *A. brassicicola*, einem Wirtspathogen von *A. thaliana*, infizierten und hier mit *P. infestans*, einem Nichtwirtspathogen von *A. thaliana*, gearbeitet wurde. Zum anderen haben Muroi *et al.* erst nach 72 Stunden Blattmaterial geerntet, während in dieser Arbeit das bereits nach 24 Stunden erfolgte. Vielleicht werden *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin auch durch andere Enzyme während der längeren Inkubation zu *p*-Cumaroylputreszin und Feruloylputreszin umgewandelt. Eine solche Konvertierung von HCA-Agmatin zu HCA-Putreszin ist in der Literatur bisher jedoch nicht beschrieben, wohl aber die enzymatische Umwandlung von Agmatin zu Putreszin, z.B. durch die Putreszinsynthase in Keimlingen der Saat-Platterbse (*Lathyrus sativus*) und Agmatinase in anderen Pflanzen wie *S. tuberosum* (Srivenugopal und Adiga, 1981; Macoy *et al.*, 2015). In ihren Enzymassays beschreiben Muroi *et al.* (2009), dass die Anwesenheit von Agmatin neben Putreszin die Synthese von *p*-Cumaroylputreszin hemmt. Dies könnte der Grund sein für die sehr viel niedrigeren Gehalte an *p*-Cumaroylputreszin und Feruloylputreszin im Vergleich zu *p*-Cumaroylagmatin und Feruloylagmatin. Es sei noch erwähnt, dass Muroi *et al.* (2009) keine Aussage darüber machten, mit welcher T-DNA-Insertionslinie gearbeitet wurde (Alonso *et al.*, 2003).

Die *At3g23550*-Mutante *mate1* zeigte 24 Stunden nach Inokulierung mit *P. infestans* annähernd *p*-Cumaroylagmatin-Wildtypgehalt in Blättern (Abbildung 12), aber eine fast vollständige Reduktion von *p*-Cumaroylagmatin im Inokulum (Abbildung 14). Daraus wird postuliert, dass der AtMATE-Transporter für die Sekretion von *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten zur Penetrationsstelle des Pathogens verantwortlich ist. Die *p*-Cumaroylagmatinergehalte in den Blättern von *mate2* erreichten nicht das Wildtypniveau, was an einer negativen Rückkopplungshemmung liegen könnte. Dabei findet wahrscheinlich eine *p*-Cumaroylagmatin-Akkumulation im Zytosol statt. Durch das Unvermögen, *p*-Cumaroylagmatin nach draußen zu transportieren, hemmt das Produkt die AtACT1 um so eine Störung von Homöostasen anderer Metaboliten in der Zelle zu vermeiden. Solch eine negative Produkthemmung wurde auch von Serrano *et al.* (2013) beschrieben. Hierbei wird die ICS1 (Isochorismatsynthase1) in der MATE-Transporter-Mutante *eds5* (*enhanced disease susceptibility 5*) durch die stressinduzierte Akkumulation von Salicylsäure gehemmt.

Die *p*-Cumaroylagmatinergehalte der *pen2*-Mutante, die in der chemischen Abwehr über die Indole eingeschränkt ist, wurden in dieser Arbeit mitbestimmt, da Christoph Böttcher (Julius-Kühn-Institut, Berlin) mündlich mitteilte, dass er sehr hohe *p*-Cumaroylagmatinlevel in *pen2*-Blättern nach Behandlung mit *P. infestans* beobachtet

hat (unveröffentlichte Daten). Dies wurde in dieser Arbeit bestätigt (Abbildung 13). Die *p*-Cumaroylagmatingehalte der *pen2*-Mutanten waren drei- bis fünffach erhöht in Blättern und Inokulum im Vergleich zu Wildtyp-Arabidopsispflanzen. Die Doppelmutanten *act1 pen2* und *mate1 pen2*, die nach persönlicher Mitteilung von Andreas Matern (AG Rosahl, IPB Halle) eine erhöhte Penetrationshäufigkeit durch *P. infestans* aufweisen, zeigten die gleichen Gehalte an *p*-Cumaroylagmatin in Blättern und Inokulum nach *P.-infestans*-Behandlung wie die Einzelmutanten *act1* und *mate1* (Abbildung 12 - Abbildung 16). Dies bestärkte die Annahme, dass AtMATE für den Transport von *p*-Cumaroylagmatin verantwortlich ist. Die erhöhten *p*-Cumaroylagmatingehalte der *pen2*- Mutanten (Abbildung 13, Abbildung 16) könnten durch die erhöhte Penetration von *P. infestans* in den *pen2*-Mutanten und damit verbundener verstärkter Abwehrantwort durch *AtACT1* auftreten. Ebenfalls denkbar wäre, dass *pen2*-Pflanzen durch das Fehlen der Indolglucosinolathydrolyse-Aktivität ihrer defekten PEN2-Myrosinase, die postulierten Produkte Indol-3-ylmethylamin (I3A) und Raphanusamsäure (RA) nicht mehr bilden können (Bednarek *et al.*, 2009) und nun über erhöhte *p*-Cumaroylagmatinbiosynthese das Fehlen der Indole in der chemischen Pathogenabwehr kompensieren.

4.4. Die Rolle von *AtACT1* und *AtMATE* in der Abwehr gegen *P. infestans*

HCAAs, wie *p*-Cumaroylagmatin werden antimikrobielle Eigenschaften zugesprochen (Stoessl, 1967; Röpenack *et al.*, 1998; Muroi *et al.*, 2009; Bassard *et al.*, 2010; Muroi *et al.*, 2012). Gab man *p*-Cumaroylagmatin zum *P.-infestans*-Myzel, konnte kein Einfluss auf das Wachstum von *P. infestans* gemessen werden (Abbildung 17). Das steril filtrierte Inokulum, welches nach 24 Stunden von *A. thaliana*-Wildtyp-Blättern und Blättern der Mutanten *act1*, *mate1*, *act1 mate1* oder *pen2* geerntet wurde, zeigte ebenfalls keinen inhibitorischen Effekt auf das Myzelwachstum von *P. infestans* (Abbildung 19). Eine Wirkung auf das Myzelwachstum von *P. infestans* hatte nur das als Positivkontrolle eingesetzte Oxocrotonat (Abbildung 17). Seine antimykotischen Eigenschaften beschrieben Eschen-Lippold *et al.* (2009). Dabei wurde eine Inhibierung sowohl auf die Zoosporenkeimung als auch auf das Myzelwachstum von *P. infestans* durch die aus dem Elfenbein-Schneckling (*Hygrophorus eburneus*) isolierte Fettsäurederivat Oxocrotonat nachgewiesen. Schon die Zugabe von geringen 3,7 μ M reichte aus, um eine vollständige Inhibierung der Zoosporenkeimung *in*

in vitro zu erreichen. Für eine signifikante Hemmung des Myzelwachstums musste aber eine nicht physiologische, hohe Konzentration von 1 mM eingesetzt werden. Ebenfalls in Kooperation mit der AG Rosahl zeigten Prost *et al.* (2005), dass auch andere Fettsäurederivate aus Pflanzen, die Oxylipine, inhibitorische Effekte auf Myzelwachstum und Sporenkeimung eukaryotischer Mikroorganismen haben. Bei einer Konzentration von 100 μ M hatten 22 von 43 Oxylipinderivate einen Effekt auf die Zoosporenkeimung von *P. infestans*, acht davon zeigten eine fast vollständige Hemmung der Zoosporenkeimung. Sechs Oxylipinderivate inhibierten auch das Myzelwachstum *in vitro*, die IC₅₀-Werte für natürlich Oxylipine lagen bei über 150 μ M, bei synthetischen Oxylipinen bei 100 μ M. Die Autoren zeigten auch, dass es eine Rolle spielt, wie chemisch stabil die jeweiligen Oxylipine unter den Wachstumsbedingungen des jeweiligen Organismus sind. Einige Substanzen werden durch Enzyme der Organismen abgebaut oder maskiert (Doehlemann und Hemetsberger, 2013). Dies könnte auch in dieser Arbeit der Grund sein, warum kein Effekt durch *p*-Cumaroylagmatin auf das Myzelwachstum *in vitro* von *P. infestans* zu sehen war (Abbildung 17). Da eine Extraktion der *p*-Cumaroylagmatinlösungen aus dem Roggenmedium äußerst schwierig wäre, wurde diese Kontrolle, ob *p*-Cumaroylagmatin im *in-vitro*-Myzelwachstumsassay durch *P. infestans* abgebaut wird, nicht durchgeführt.

Andere HCAAs wie bspw. *N*-Feruloyltyramin führen zu einer verstärkten Verzweigung von Myzel, aber Hemmung des linearen Wachstums der vesikular-arbuskulären Pilze *Glomus intraradix* und *Glomus versiforme* (Grandmaison *et al.* (1993). Fattorusso *et al.* (1999) zeigten *in vitro* eine antifungale Aktivität gegen das Myzelwachstum von *Fusarium culmorum* durch *N*-Feruloyltyrosin (ED₅₀ = 20 μ g/ml (56 μ M)) und *N*-Feruloyltyramine (ED₅₀ = 22 μ g/ml (70 μ M)).

Bei den *in-vitro*-Untersuchungen des Einflusses von *p*-Cumaroylagmatin auf die Zoosporenkeimungsrate konnte eine signifikante Inhibierung der Keimung nachgewiesen werden. Bereits bei 0,01 mM *p*-Cumaroylagmatin sind ca. 50% weniger gekeimte Sporen zu beobachten (Abbildung 18). Eine noch stärkere Inhibierung der *P.-infestans*-Zoosporenkeimung wurde mit steril filtrierten Inokulum von sowohl *A. thaliana*-Wildtyppflanzen als auch von Mutanten *act1* und *mate1* erreicht. Und dies, obwohl diese kein *p*-Cumaroylagmatin (*act1*, *mate1*) bzw. maximal Gehalte von 0,0013 mM (Wildtyp) aufwiesen (Abbildung 14). Zusätzlich wurden diese Konzentrationen dann durch Zugabe der Sporensuspension nochmals 1:1 verdünnt (Abbildung 20). Ein Grund dafür kann sein, das steril filtrierte Inokulum noch sehr viele andere Abwehrmetaboliten (wie Indolderivate,

Glucosinolate, etc.) und Effektorproteine aus *A. thaliana* enthält. *p*-Cumaroylagmatin ist nur eine Teilkomponente der chemischen Abwehr von *A. thaliana* im Apoplasten. 2009 zeigten Muroi *et al.* eine 50%ige Inhibierung der Sporenkeimung und Hyphenlänge von *A. brassicicola* nach Behandlung mit hohen *p*-Cumaroylagmatin-Konzentrationen von mehr als 1 mM. Muroi *et al.* (2012) beschrieben nach Zugabe von 180 μ M und 1800 μ M *p*-Cumaroylagmatin einen geringen Effekt von 20-30% kürzeren Keimschlauchlängen bei der Sporenkeimung von *B. cinerea*.

Die ersten Untersuchungen mit dem Dimer von *p*-Cumaroylagmatin, Hordatol A, durch Stoessl, (1967) zeigten eine 80%ige Inhibierung der Keimung von *Monilinia fructicola* bereits bei 5 ppm, mit *p*-Cumaroylagmatin konnte jedoch kein inhibitorischer Effekt gezeigt werden.

Im *in-vitro*-Sporenkeimungsassay wurde in zwei Experimenten durch LC-MS-Messungen gezeigt, dass *p*-Cumaroylagmatin durch *P. infestans* während der 24 Stunden *P.-infestans*-Zoosporenkeimung nicht abgebaut wird (Daten nicht gezeigt). Die frühe Aktivierung der Gene *AtACT1* und *AtMATE*, wenige Stunden nach Behandlung von *A. thaliana* mit *P. infestans* (Abbildung 9B) korrelierte mit der Inhibierung der Zoosporenkeimung von *P. infestans*, die auch wenige Stunden nach Inokulierung auf der Blattoberfläche beginnt.

4.5. Vergleich der *p*-Cumaroylagmatingehalte in *S. tuberosum* (Wildtyp) und *A. thaliana* (Wildtyp)

Der Vergleich der *p*-Cumaroylagmatingehalte in *A. thaliana*- und Kartoffel-Wildtyp-Pflanzen nach Inokulierung mit *P. infestans* zeigte deutliche Unterschiede. Kartoffel-Blattscheiben akkumulierten 3,5-fach höhere Mengen *p*-Cumaroylagmatin als *A. thaliana*-Blätter, konnten aber 7,5-fach weniger ins Inokulum sezernieren (Abbildung 21). Daraus ließ sich schließen, dass Kartoffel zwar hohe Mengen *p*-Cumaroylagmatin in der Zelle akkumuliert, aber keinen effektiven Transporter besitzt, der die Substanz in den Apoplasten sezerniert.

Die *p*-Cumaroylagmatingehalte lagen im Kartoffelinokulum bei ca. 0,17 μ M. *P.-infestans*-Zoosporenkeimung *in vitro* werden aber erst bei ca. 10 μ M um 15% ($\pm 7,6\%$) inhibiert (Abbildung 18). Im *A.-thaliana*-Inokulum fand sich eine *p*-Cumaroylagmatinkonzentration von 1,3 μ M (Abbildung 21), das entsprach zwar auch nicht dem *in vitro* ermittelten Wert, aber die Konzentration direkt an der Penetrationsstelle von *P. infestans* könnte natürlich viel

höher sein. Wie bereits in dieser Arbeit erläutert, handelt es sich bei *p*-Cumaroylagmatin um eine Komponente unter vielen in der chemischen Abwehr von *P. infestans* bei *A. thaliana*. Die ersten Untersuchungen, welche Metaboliten ins Inokulum auf *A. thaliana* sezerniert werden, führten Böttcher *et al.* (2009) durch. Die Autoren untersuchten Inokuli von *A. thaliana*-Wildtyppflanzen und Camalexin-Biosynthese-Mutanten (PHYTOALEXIN DEFICIENT3, *pad3*), um die Rolle des Enzyms CYP71B15 in der chemischen Abwehr aufzuklären. Dabei fanden sie über ungerichtete Metabolitenanalysen in den Tropfen 65 *features* abwärts und 57 *features* aufwärts der Camalexinbiosynthese, welche mit den ten Metaboliten im PAD3-Stoffwechselweg assoziiert sind. Es konnten acht Camalexin- und Indolderivate im Inokulum mit *P. infestans* identifiziert werden. In der Literatur finden sich nur sehr wenige Untersuchungen zu sekretierten Metaboliten auf dem Blatt. Schmidt *et al.* (1999) identifizierten fünf HCAAs (Feruloyloctopamin, -3'-methoxyoctopamin, -tyramin sowie *p*-Cumaroyltyramin und -octopamin) in Zellwänden und Medium von Zellkultur-Kartoffelzellen nach *P. infestans*-Elizitorbehandlung. Die meisten Forschungsansätze zentrierten sich auf die Metabolitenanalyse von Wurzelexudaten. Vikram *et al.* (2004) ten, dass nach Inokulierung der Früchte der Apfelsorte McIntosh mit den Pilzen *B. cinerea*, *Penicillium expansum*, *Mucor piriformis* oder *Monolinia* sp. über 498 verschiedene flüchtige taboliten vom Apfel abgegeben werden, an denen man die Pathogene unterscheiden kann oder ob der Apfel infiziert ist oder nicht.

4.6. Veränderte HCAA-Gehalte in transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien

Durch die Expression von *AtACT1* in Kartoffel (Abbildung 23, Abbildung 24) konnten veränderte HCAA-Gehalte und Muster im Metabolitenprofil beobachtet werden. Einen visuellen Phänotyp zeigten die transgenen Pflanzen gegenüber Wildtypkartoffellinien nicht. Auffällig im Metabolitenprofil der Blattscheiben der vier ausgewählten unabhängigen genen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien war, dass neben *p*-Cumaroylagmatin (Abbildung 26), *p*-Cumaroylspermidin und Feruloylspermidin (Dobritsch *et al.*, 2016), auch *p*-Cumaroylputreszin (Abbildung 25) signifikant erhöht war. Gegenüber *A. thaliana*-Blattextrakten, in denen kein *p*-Cumaroylputreszin detektiert wurde, führte die Expression der *AtACT1* in Kartoffel zu einem neuen HCAA-Muster. Es widersprach der Annahme von Muroi *et al.* (2009), dass bei gleichzeitiger Anwesenheit von Agmatin und Putreszin die Biosynthese von *p*-Cumaroylputreszin fast vollständig gehemmt ist. Eine Erklärung für

sen Widerspruch wäre, dass Agmatin und Putreszin in Kartoffelzellen nicht gleichzeitig oder räumlich getrennt vorliegen. Eine weitere These wäre, dass der starke Abzug von Agmatin aus dem Zellstoffwechsel durch die konstitutive Expression von *AtACT1* in den transgenen Pflanzen zur vollständigen Erschöpfung der Agmatinvorräte in der Zelle führte und dadurch keine Hemmung der Biosynthese von *p*-Cumaroylputreszin mehr bestand. Dies könnte über kinetische Metabolitenprofile geklärt werden. Muroi *et al.* (2012) exprimierten *AtACT1* in der Torenienart *Torenia hybrida* cv. Summerwave Blue (Balkon- und Pflanze). Sie stellten in drei von vier transgenen Linien stark erhöhte *p*-Cumaroylagmatinergehalte (ca. 32 nmol*g⁻¹ FG) und in der vierten Linie leicht erhöhte Gehalte (ca. 2,5 nmol*g⁻¹ FG) fest. Das gleiche Ergebnis zeigten sie bei den Kontrollen, mit dem höchsten Gehalt von 6,8 nmol*g⁻¹ FG bei einer Linie. Stark erhöhte *p*-Cumaroylputreszingehalte (8,3 nmol*g⁻¹ FG) wurden jedoch nur bei einer Linie gemessen. Zusätzlich beschrieben sie erhöhte Feruloylputreszingehalte (0,1-0,2 nmol*g⁻¹ FG) bei zwei der vier transgenen Linien. Muroi *et al.* (2012) trafen keinerlei Aussage über die Art der Quantifizierung der HCAA-Gehalte. Außerdem unterschieden sie in ihren Darstellungen der HCAA-Gehalte zwischen *cis*- und *trans*-Isomere des jeweiligen HCAA. Sollte die Quantifizierung über Standard-Eichgeraden erfolgt sein, wären die berechneten Werte der *cis*- und *trans*-Isomere sehr anzuzweifeln, da bei den HCAA eine *cis-trans*-Isomerisierung durch Licht erfolgt und es sehr schwierig wäre, den Standard und die zu untersuchenden Pflanzen über den gesamten Zeitraum eines Experimentes den gleichen Lichtbedingungen auszusetzen. So sind HCAA-Gehalte der Pflanze nicht mit dem Standard vergleichbar. Die Quantifizierung ist nur möglich, wenn die Peaks der *cis*- und *trans*-Isomere addiert werden. Campos *et al.* (2014) haben die für die Biosynthese von HCAAs in *S. lycopersicum* verantwortliche roxyzimtsäure-CoA-Tyramin-*N*-Hydroxyzimtsäure-Transferase (THT) in Tomate exprimiert. Dabei zeigte sich ebenfalls ein biochemischer Phänotyp. In den Blüten einer transgenen Linie fanden sich erhöhte Feruloyltyraminergehalte, in einer anderen nur geringfügig erhöhte Mengen. In den Früchten waren wieder in nur einer transgenen Linie stark erhöhte Feruloyltyramin- und *p*-Cumaroyltyraminergehalte, in einer anderen transgenen Linie leicht erhöhte *p*-Cumaroyltyraminergehalte nachweisbar. Die Blätter der beiden transgenen Linien zeigten nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* erhöhte Mengen Tyramin und *p*-Cumaroyltyramin im Vergleich zu Wildtyplinien. Die Erhöhung war zwar signifikant, aber überstieg die doppelte Menge im Vergleich zum Wildtyp nicht. Diese Ergebnisse der Messung von Octopamin- und Noradrenalinderivaten (*p*-Cumaroyl- und Feruloyl-

octopamingehalte sowie *p*-Cumaroyl- und Feruloylnoradrenalingehalte) in infizierten tern waren im Vergleich zum Wildtyp mit Ausnahme von Feruloyloctopamin jeweils nur in einer transgenen Linie signifikant erhöht. Insgesamt waren die Unterschiede im HCAA-Muster und Gehalten in den transgenen *SHT*-überexprimierenden Tomatenpflanzen nicht so stark wie in den transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffelblättern in dieser Arbeit. Durch Expression der Hydroxyzimtsäure-CoA-Serotonin-*N*-Hydroxyzimtsäure-Transferase (SHT) aus *C. annuum* in *O. sativa* wurde ein neues HCAA-Muster generiert, nachdem Amine oder phenolische Säuren gefüttert wurden (Jang *et al.* 2004). Unter be von 50 μ M Tyramine im Medium konnte in den Blättern von sechs transgenen Linien sehr stark erhöhte Mengen von *p*-Cumaroylserotonin und Feruloylserotonin gemessen den, die in Wildtypblättern kaum vorhanden waren. Drei Jahre später, hatte diese gruppe dann die THT aus *C. annuum* in *O. sativa* exprimiert (Lee *et al.*, 2007). Der Anteil von *p*-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin war in jungen Blättern sehr gering, unterschied sich aber zwischen den transgenen Pflanzenlinien und Wildtyp. In seneszenten Blättern wies die effektivste transgene Linie 32-fach höhere Mengen als der Wildtyp auf. Exogenes Tyramin wurde auch hier wieder gefüttert. Damit ist gezeigt, dass die Biosynthese von *p*-Cumaroyltyramin und Feruloyltyramin über die Anwesenheit von Tyramin als Substrat guliert und an selbige gekoppelt ist. Zu Untersuchungen der THT ließen sich in der tur noch einige Beispiele finden. So exprimierten Hagel und Facchini, (2005) in *Nicotiana tabacum* THT und die Tyrosindecaboxylase (TYDC) aus *Papaver somniferum* konstitutiv und kreuzten anschließend die T1-Linien um transgene Pflanzen mit erhöhter THT- und TYDC-Aktivität zu erhalten. Erhöhte Expression von TYDC erhöhte die Tyramingehalte in Blättern während induzierte Expression von THT selbige verringerte, jeweils im gleich zu Wildtypblättern. In verwundeten Blättern stiegen Feruloyltyramin- und *p*-Cumaroyltyramingehalte nach zwölf Stunden signifikant an. In den transgenen Linien TYDC×THT sogar vierfach. In den transgenen Linien, deren THT und TYDC einzeln überexprimiert wurde, sind die Feruloyl- und *p*-Cumaroyltyramingehalte ca. doppelt so hoch wie in Wildtypblättern. Überraschenderweise stiegen die HCAAs beim Wildtyp über weitere Stunden konstant an, die der transgenen Linien THT und TYCD bleiben jedoch auf dem Niveau von zwölf Stunden und die von TYDC×THT sanken. So waren bei alle Linien die HCAA-Gehalte nach 24 Stunden auf dem gleichen Niveau.

Aus den Untersuchungen der HCAA-Gehalte in den transgenen *THT*- oder *AtACT1*-exprimierenden Pflanzen lässt sich schließen, dass Tyramin wahrscheinlich für die THT

limitierend ist und Agmatin bzw. andere Aminosubstrate der AtACT1 nicht limitierend für die Acyltransferase sind.

4.7. Sezernierte *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien

Erhöhte *p*-Cumaroylagmatiningehalte in den Blattscheiben der transgenen, konstitutiv *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien wurden sowohl einen Tag (Abbildung 27) nach Inokulierung mit *P. infestans* gemessen, als auch nach drei Tagen (Abbildung 25). Die Gehalte in den Blattscheiben, die mit *P. infestans* inokuliert wurden, waren etwas höher, als die von Blättern welche mit Sterilfiltrat oder Wasser inokuliert wurden. Es waren aber keine signifikanten Unterschiede in den *p*-Cumaroylagmatiningehalten innerhalb der Kontrollen oder der transgenen Linien messbar. Somit kann man daraus schließen, dass in Kartoffel zwar *p*-Cumaroylagmatin synthetisiert wird, dies aber nicht, wie bei *A. thaliana*, durch *P. infestans* induziert wird (Abbildung 12). In diesen Experimenten fanden sich in den transgenen Linien *p*-Cumaroylagmatiningehalte von ca. 100 nmol*g⁻¹ FG. Das waren drei- bis vierfach höhere Gehalte als Muroi *et al.* (2012) in transgenen *AtACT1* exprimierenden Torenia-Pflanzen erzielten. Die Begründung dafür könnte darin liegen, dass Wildtypkartoffelblätter schon ein Grundlevel von ca. 30 nmol*g⁻¹ FG *p*-Cumaroylagmatin haben, während in Torenia-Wildtypblätter kein *p*-Cumaroylagmatin detektierbar war.

In dem nach 24 Stunden geernteten Inokulum der Kartoffelpflanzen fanden sich nur sehr geringe Mengen *p*-Cumaroylagmatin (Abbildung 28). Anders als in den Blattscheiben scheint der noch nicht geklärte Transport dieser geringen Mengen ins Inokulum, *P. infestans*-induziert zu sein. Die *p*-Cumaroylagmatiningehalte im Inokulum mit *P. infestans* waren signifikant höher als in den Kontrollinokuli Sterilfiltrat und Wasser. Dabei gab es keinen Unterschied zwischen den Kontrollpflanzen und den transgenen *AtACT1* exprimierenden Kartoffellinien. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine erhöhte Akkumulation von *p*-Cumaroylagmatin in der Zelle nicht zu einem verstärkten Transport in den Apoplasten führt, weil Kartoffel keinen effektiven *p*-Cumaroylagmatintransporter besitzt.

4.8. Transgene Expression von AtMATE in Kartoffel

Wie bereits unter Abschnitt 4.2. erläutert, könnten die vielen Probleme, die es bei der Generierung der transgenen *AtMATE*-exprimierenden Kartoffelpflanzen gab, vermutlich darin begründet sein, dass zur Transformation die cDNA des *AtMATE*-Genes eingesetzt wurde (Remy *et al.*, 2013; Staiger und Brown, 2013). Andreas Matern (AG Rosahl) konnte allerdings durch Sequenzierung von DNA aus *P. infestans* inokulierten *A. thaliana*-Blättern nachweisen (Daten nicht gezeigt), dass die *AtMATE*-cDNA ohne Introns vorliegt. Die zur Klonierung verwendete *AtMATE*-cDNA zeigte bei den Überprüfungen mit Restriktionsenzymen und Sequenzierungen keine Mutationen. Somit können auch Mutationen in der cDNA als Ursache der fehlenden Expression der *AtMATE*-cDNA ausgeschlossen werden.

Wenn die Experimente mit den transgenen *AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien, die mit der genomischen DNA von *AtMATE* transformiert wurden, auch keinen Transport von *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum zeigen, obwohl in den Zellen höhere *p*-Cumaroylagmatingehalte vorliegen als in *A. thaliana*, könnte es sein, dass AtACT1 und AtMATE für einen funktionierenden Transport assoziiert sein müssen. Ein Beispiel für eine solche notwendige Proteininteraktion zeigten Lok *et al.* (2012). Die gemeinsame Expression des Säugetierproteins *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP1) und Glutathion-*S*-Transferase P1-1 (GST P1-1) führte zu signifikant höherer Resistenz gegen cytotoxische Effekte des *S*-Nirtoso-Glutathion (GSNO) im Vergleich zur einzelnen Expression beider Proteine in der Zelle.

4.9. Morphologischer Phänotyp der transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien unter Kontrolle des 35S-Promotor

Im Vergleich zu den Wildtyp-Kartoffelpflanzen und den Leervektorkontrolllinien zeigten die transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Kartoffellinien mit beiden Genen unter Kontrolle eines 35S-Promoter, einen Zwergwuchs-Phänotyp (Abbildung 32) mit weniger, unebenen und kleineren Blättern. Die Pflanzen mussten größtenteils schon sehr zeitig nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde durch einen Holzstab gestützt werden. Dieser Phänotyp ist vermutlich damit zu begründen, dass den transgenen Pflanzen, durch die konstitutive Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin und extrazellulären Transport, viele Ausgangssubstrate für die Biosynthese anderer Metaboliten fehlten. Bspw. stellen Tyrosin und Phenylalanin Ausgangssubstrate für die Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL)

(Hahlbrock und Scheel, 1989; Dixon *et al.*, 2002; Edahiro und Seki, 2006; Payyavula *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013b) und somit Ausgangsverbindungen für *p*-Cumaroyl-CoA und alle anderen Metabolite im Phenylpropanstoffwechsel dar. Zusätzlich ist Arginin die Ausgangsverbindung für die Agmatinbiosynthese (Fuell *et al.*, 2010). Transgenen Tabakpflanzen (*N. tabacum* cv. *Xanthi*) bei denen eine PAL aus Bohnen exprimiert wurde, zeigten einen ähnlichen Phänotyp (Elkind *et al.* (1990). Einige Transformanten hatten einen gedrungenen Phänotyp mit ebenfalls unebenen Blättern mit löffelartigem Erscheinungsbild und einer rauhen Textur. Diese Blätter entwickelten lokale UV-fluoreszierende Läsionen, die Wände der Stamm-Xylemzellen waren dünner und die Pflanzen blühten nicht. In diesen transgenen Linien wurden mehrere Kopien des *PAL*-Gens gefunden. Dies führte zu einer verminderten *PAL*-Aktivität und somit zu verringerten Gehalten an Phenylpropanstoffwechselprodukten. Es könnte demzufolge sein, dass durch den Abzug fast aller Vorstufen des Phenylpropanstoffwechselweges in die *p*-Cumaroylagmatin-Biosynthese viele andere Produkte dieses Pfades fehlten und es so zu den beschriebenen Symptomen kam. Insbesondere das Fehlen von Lignin, Lignan, Flavonoiden und anderen HCAAs, die die Zellwand normalerweise stärken, könnte zur Instabilität der Pflanzen führen.

4.10. *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien

In den Blattscheiben aller transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien fanden sich signifikant erhöhte *p*-Cumaroylagmatiningehalte im Vergleich zu den Kontrolllinien nach Inokulierung mit *P. infestans* (Abbildung 33), ähnlich den transgenen Linien, die nur *AtACT1* allein exprimierten (Abbildung 27). Die *p*-Cumaroylagmatiningehalte korrelierten zudem mit dem visuellen Phänotyp. Die Linien K, N und X mit den stärksten Mangelsymptomen, hatten die höchsten *p*-Cumaroylagmatiningehalte in den Blattextrakten. Auffällig war, dass die *p*-Cumaroylagmatiningehalte in den Blattscheiben der transgenen Linien K, N und X, deren *AtACT1* und *AtMATE* unter Kontrolle des 35S-Promoters waren, 1,5- bis dreifach höher waren als die aller transgenen Linien deren *AtMATE*- unter StLS1-Promoter exprimiert wurden. Die *p*-Cumaroylagmatiningehalte der Linie D waren auf dem selben Niveau wie die der transgenen *AtACT1* exprimierenden Linien und der Linien p35S-*AtACT1*-pStLS1-*AtMATE* A, B, S und V (Abbildung 33). Ein Grund dafür könnte sein, dass die Linien K, N, X und in geringerer Weise auch D *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum sezernierten (Abbildung 34). Durch den Transport von *p*-Cumaroylagmatin über

den konstitutiv exprimierten AtMATE-Transporter aus der Zelle ins Inokulum, kam es wahrscheinlich nicht zu einer Endprodukthemmung der AtACT1. So enthielten die Blattextrakte dieser transgenen Linien *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte bis zu 330 nmol*g⁻¹ FG⁻¹ (Abbildung 33).

Die *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum der transgenen *AtACT1-AtMATE*-Linien unter Kontrolle von 35S-Promotoren überstieg die von *A. thaliana*-Wiltypen um das vier- (Linie D) bis 40-fache (Line N). Dass die sezernierten *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum der transgenen Linien A, B, S und V mit *AtMATE* unter Kontrolle des chloroplastidären StLS1-Promotors nur unwesentlich bis nicht signifikant erhöht waren, unterstützt die Annahme, dass *AtMATE* in *A. thaliana* epidermal in Schließzellen von Spaltöffnungen exprimiert wird. Schließzellen besitzen zwar Chloroplasten. Diese unterschieden sich jedoch von denen in Mesophyllzellen. In Schließzellen haben Chloroplasten eine lineare Elektronentransportkette und sind nicht für die Fixierung von CO₂ verantwortlich, sondern ausschließlich für die Bildung des Ionengradienten, um Stomata zu öffnen oder zu schließen (Zeiger *et al.*, 1981). Der StLS1-Promoter aus *S. tuberosum* ist aber ein lichtinduzierbarer Promoter, der nur in photosynthetisch aktiven Gewebe exprimiert wird (Stockhaus *et al.*, 1987). Andere Epidermiszellen haben fast keine Chloroplasten und somit ist die Expression von AtMATE unter Kontrolle des StLS1-Promotors nicht ausreichend, um hohe Mengen *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum zu sezernieren. Durch die konstitutive Expression von AtMATE in Kartoffel über den 35S-Promotor konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass AtMATE der Transporter von *p*-Cumaroylagmatin vom Zytosol in den Apoplasten ist. Neben den erhöhten *p*-Cumaroylagmatinleveln in den Blattscheiben und Inokuli der transgenen Linien *AtACT1-AtMATE* D, K, N, X wurden, wie bei den transgenen *AtACT1* auch, erhöhte Gehalte anderer HCAAs gemessen. In den Blattextrakten und in Inokuli waren die Agmatin- und Putreszin-HCAAs Caffeoylagmatin, *p*-Cumaroyl-, Caffeoyl- und Feruloylputreszin sowie *p*-Cumaroyl- und Feruloylspermidin signifikant erhöht (Dobritsch *et al.*, 2016). Im Inokulum waren alle Agmatin- und Putreszin-HCAAs die in den Blattextrakten erhöht waren auch signifikant erhöht. Im Inokulum nicht detektierbar waren die Spermidinderivate. *p*-Cumaroyltyramin war im Inokulum der transgenen Linien tendenziell erniedrigt und im Vergleich zum Inokulum der Kontrollen, war Feruloyltyramin signifikant in geringeren Mengen zu finden (Dobritsch *et al.*, 2016). Dies ließ vermuten, dass AtMATE HCAAs transportiert, die Agmatin oder Putreszin als Aminakzeptor besitzen. Dass der ebenfalls zu

den Multidrug-Transportern gehörende Transporter AtABCG29 für die Sekretion von *p*-Cumaroylalkohol aus dem Zytosol in die Zellwand verantwortlich ist, wurde zum einen über die AtABCG29-Expression und Vesikelisolation in Hefe und zum anderen über geringere Ligninbestandteile in den Zellwänden von *A. thaliana-knock-out*-Mutanten gezeigt (. Untersuchungen zu Metaboliten, die an die Blattoberfläche transportiert werden, sind in der Literatur nur wenig zu finden. Die meisten Arbeiten beschränken sich auf Wachs- und Metabolitenuntersuchungen der Kutikula. Yu und Luca (2013) beschrieben einen Monoterpen-Indol-Alkaloid- (MIAs)-Transporter in der Immergrün-Art *Catharanthus roseus*. In diesen Studien ist der ABC-Transporter CrTPT2 für die Sekretion von Catharantin über die Plasmamembran auf die Blattoberfläche verantwortlich. Die Autoren beschrieben zwar ausführlich die Transporter-Analysen in Hefe und die Virus-induzierte Reduktion der Genexpression, nicht aber, wie sie Blattoberfläche von Blattinneren separiert haben, um tatsächlich nur die Catharantin-Gehalte auf der Blattoberfläche analysieren zu können. Landgraf *et al.* (2014) fanden ebenfalls einen ABCG-Transporter, der für den Transport von Suberin-Vorstufen im Periderm der Kartoffelknolle verantwortlich ist. Die RNAi-Pflanzen des ABCG-Transporters zeigten im Knollenperiderm signifikant veränderte ω -Hydroxyfettsäuren, α,ω -Dicarboxylsäuren, Fettsäuren, Fettsäurealkohole und signifikant niedrigere Ferulasäurelevel. Das Metabolitenmuster der RNAi-Pflanzen lässt auf die Beteiligung des Transporters an der Suberin-Biosynthese schließen, da z.B. Cutin keine Ferulasäure enthält und Ferulasäure in den RNAi-Periderm signifikant niedriger war, als im Kontrollperiderm.

4.11. Untersuchungen zur Resistenz gegen *P. infestans* der transgenen Kartoffelpflanzen

Die in ihren *p*-Cumaroylagmatin-Gehalten veränderten transgenen *AtACT1* und *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffelpflanzen zeigten nach Inokulierung mit *P. infestans*, dass die alleinige Expression der *AtACT1* in Kartoffel nicht ausreichte, um die Pflanzen resistenter gegen den Oomyzeten werden zu lassen. Die relative Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse zeigte drei Tage nach Inokulierung keine Unterschiede zwischen den Kontrolllinien und den transgenen Linien (Abbildung 35). Wie in vorherigen Kapiteln bereits diskutiert, waren die transgenen *AtACT1*-exprimierenden Pflanzen nicht in der Lage, *p*-Cumaroylagmatin ins Inokulum sezernieren (4.7.). Die *in-vitro*-Bioassays lassen den Schluss zu, dass *p*-Cumaroylagmatin zwar die Zoosporenkeimung inhibiert, aber nicht das

Myzelwachstum (Abbildung 17, Abbildung 18). Somit führt die verstärkte Akkumulation von *p*-Cumaroylagmatin in Zellen der *AtACT1*-exprimierenden Linien nicht zu einer Erhöhung der Resistenz, da die Sporenkeimung zum Zeitpunkt, wenn *P. infestans* das Zellinnere erreicht, bereits abgeschlossen ist. Auch das Inokulieren dieser Linien mit einer niedrigeren Zoosporenkonzentration von 1×10^4 /ml (Daten nicht gezeigt) führte ebenfalls zu keinen Unterschieden in der Infektion zwischen transgenen und Kontrolllinien. Muroi *et al.*, (2012) zeigten, dass eine von vier transgenen *AtACT1*-exprimierenden *T. hybrida*-Pflanzenlinien geringere Läsionsgrößen nach Infektion mit *B. cinerea* besaß (nicht signifikant für die restlichen Linien). Die Expression von Stilben-Biosynthesegenen aus *Vitis vinifera* in *N. tabacum* SR1 führt ebenfalls zur Resistenz gegen *B. cinerea* (Hain *et al.*, 1993). Campos *et al.* (2014) berichteten ebenfalls bei zwei von vier transgenen *THT*-überexprimierenden Tomatenlinien von einem signifikant verringertem Wachstum von *P. syringae* auf den Blättern.

Bei den transgenen *AtACT1-AtMATE*-Kartoffelpflanzen, die *AtACT1* unter der 35S-Kontrolle und *AtMATE* unter StLS1-Promoter exprimieren, ergab sich keine signifikant erhöhte Resistenz gegen *P. infestans* (Abbildung 36). Diese transgenen Linien sezernierten auch nur geringe Mengen *p*-Cumaroylagmatin in das Inokulum (Abbildung 34). Was der Grund für die kaum veränderte Resistenz gegen *P. infestans* der transgenen Linien A, B, S und V gegenüber den Kontrolllinien WT und EV sein kann. Drei der vier unabhängigen transgenen Kartoffellinien mit beiden Genen unter 35S-Kontrolle zeigten eine um den Faktor zwei (Linie K) oder 4 (Linien D und X) verringerte *P.-infestans*-Biomasse (Abbildung 36). Bei den transgenen Linien D und X könnten die erhöhten Mengen *p*-Cumaroylagmatin, die ins Inokulum sezerniert wurden, in einem ähnlichen Maße wie *in vitro*, zu einer Inhibierung der Zoosporenkeimung führen (Abbildung 18). Die *p*-Cumaroylagmatin-Konzentrationen waren *in vitro* (10 und 100 μ M, Abbildung 18) und *in vivo* (15 bis 50 μ M, Abbildung 34) annähernd gleich. Die Linie N zeigte tendenziell eine Verringerung der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* im Vergleich zu den Kontrolllinien. Durch große Schwankungen in der *P. infestans*-Biomasse bei Linie N, war die Erhöhung der Resistenz aber nicht signifikant, obwohl das Inokulum dieser Linie sehr viel höhere Mengen *p*-Cumaroylagmatin enthielt, als das der Linien D und X (Abbildung 34). Eine Erklärung dafür wäre, dass eine noch stärkere konstitutive Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin und dessen Transport ins Inokulum bei Linie D und X zu einem so großen Mangel an anderen Metaboliten im Phenylpropanoidstoffwechselweg führte, dass die Zellwände bei den

transgenen Linien K und N nach Pathogenbefall weniger verstärkt wurden, da Ausgangssubstanzen für Flavonoide, Lignan, Lignin und HCAAs fehlten (Gunnaiyah *et al.*, 2012). Zudem waren die Ergebnisse der *P. infestans*-Biomasse-Bestimmung schwer zu beurteilen, da bedacht werden muss, dass die erhöhte Resistenz der Linien D, K, N und X im Vergleich zu den Kontrolllinien auch durch den veränderten morphologischen Phänotyp verursacht sein könnte. Die transgenen Linien zeigten teilweise Nekrosen auf der Blattoberfläche, wie unter 3.10. beschrieben. Diese Nekrosen könnten dazu geführt haben, dass der hemibiotrophe *P. infestans* die biotrophe Phase auf diesen Pflanzen nicht abschließen kann, wie es z.B. auch bei den *StSYR1*-RNAi-Kartoffellinien von Eschen-Lippold *et al.* (2012) beschrieben ist.

Die schon im vorherigen Kapitel diskutierte Publikation von Yu und Luca (2013) zu Wachszusammensetzungen auf *C. roseus*-Blattoberflächen und ABC-Transporter katalysiertem Catharantin-Transport an die Blattoberfläche, zeigte eine interessante Möglichkeit, wie durch Veränderung des Gleichgewichtes von Metaboliten in einem Stoffwechselweg, Pflanzen industriell nutzbar gemacht werden können. Die Autoren erhielten nach Virus-induzierte Genrepression des Transporters doppelte Mengen der Metabolite Vinblastin und Vindolin, die in der Anti-Krebs-Therapie eingesetzt werden. Leider fehlt eine Einschätzung, ob die geringeren Mengen des Monoterpenoid-Indol-Alkaloid Catharantin auf der Blattoberfläche dieser Pflanzen zu einer veränderten Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber Pathogenen führte.

Das Inokulum der transgenen *AtACT1*-exprimierenden Kartoffellinien B und M mit nahezu keinem *p*-Cumaroylagmatin zeigte ebenso wie die Inokuli der Wildtyp- und Leervektorkontrollpflanzen ohne *p*-Cumaroylagmatin auch keine Inhibierung der Sporenkeimung *in vitro* (Abbildung 37). Das Inokulum der *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Pflanzenlinien D, K, N und X hingegen inhibierte die Zoosporenkeimung von *P. infestans* signifikant, um 10-20% (Abbildung 37). Dieses Ergebnis zeigte, dass die Sekretion von *p*-Cumaroylagmatin und anderen Sekundärmetaboliten einen Einfluss auf die frühe Pathogenentwicklung hat. Allerdings stellte sich hier die Frage, warum 10-100 μ M reines *p*-Cumaroylagmatin die *P.-infestans*-Zoosporenkeimung *in vitro* um ca. 50% hemmen (Abbildung 18) und 15-50 μ M *p*-Cumaroylagmatin im Inokulum der *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Linien nur um ca. 15 % (Abbildung 37)? Wahrscheinlich liegt ein Grund darin, dass die *in-vitro*-Sporenkeimungsassays mit reinem *p*-Cumaroylagmatin bei 4°C, wie bei Eschen-Lippold *et al.* (2009) beschrieben, die Assays mit Kartoffelinokulum aber bei

physiologischen 15°C durchgeführt wurden. Außerdem ist reines *p*-Cumaroylagmatin in Wasser gelöst und die Inokuli enthielten Reste des Hafer-Bohne-Medium die die *P.-infestans*-Zoosporenkeimung fördern.

Letztendlich hatten aber alle vier transgenen *p*-Cumaroylagmatin sekretierenden Kartoffellinien *in vitro* einen inhibitorischen Effekt auf die *P.-infestans*-Zoosporenkeimung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Wichtigkeit von sezernierten Sekundärmetaboliten der Pflanzen um Pathogeneintritte in die Pflanzenzelle zu kontrollieren und die frühe Pathogenentwicklung zu inhibieren.

5. Zusammenfassung

Phytophthora infestans ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule in Kartoffel (*Solanum tuberosum*). *Arabidopsis thaliana* ist keine Wirts-Pflanze für *P. infestans*. Nach Kontakt mit *P. infestans* sind in *Arabidopsis* dennoch mehr als 700 Gene aktiviert. Zwei dieser Gene sind *AtACT1* und *AtMATE*. Die koexprimierten Gene kodieren für die BAHD-Acyltransferase *AtACT1* und den MATE-Transporter *AtMATE*. Die Agmatine *N*⁴-*p*-Cumaroyl-Transferase und der *multidrug-and-toxic-compounds-extrusion*-Transporter spielen eine Rolle in der apoplastidären Abwehr von *A. thaliana* gegen *P. infestans*. *AtACT1* katalysiert die Kondensation des biogenen Amin Agmatin mit dem Hydroxycinnamoyl-CoA-Ester *p*-Cumaroyl-CoA zu dem Hydroxyzimtsäureamid *p*-Cumaroylagmatin. *AtMATE* bewerkstelligt den Transport von *p*-Cumaroylagmatin in den Apoplasten. *In vitro* inhibiert *p*-Cumaroylagmatin die Zoosporenkeimung von *P. infestans*. Auf das Myzelwachstum hat *p*-Cumaroylagmatin keinen wachstumshemmenden Einfluss.

Die konstitutive Expression des Gens *AtACT1* in Kartoffel führt zu erhöhten Mengen *p*-Cumaroylagmatin, *p*-Cumaroylputreszin und anderen HCAAs in der Zelle, nicht jedoch extrazellulär. Kartoffelpflanzen synthetisieren auch ohne die Expression von *AtACT1* *p*-Cumaroylagmatin, höhere Mengen an *p*-Cumaroylagmatin als *A. thaliana*, haben aber keinen effektiven Transporter für die Sekretion von *p*-Cumaroylagmatin aus der Zelle in den Apoplasten. Erst die Expression beider Gene, *AtACT1* und *AtMATE* führt zu einem Transport des durch *AtACT1* synthetisierten *p*-Cumaroylagmatins nach außen. Dies führt zu einer gesteigerten Resistenz der transgenen *AtACT1-AtMATE*-exprimierenden Pflanzen gegenüber Kontrollpflanzen und zu einem morphologischen Phänotyp. Die Pflanzen sind kleiner als der Wildtyp und haben chlorotische, teilweise nekrotische Flecken auf den Blättern.

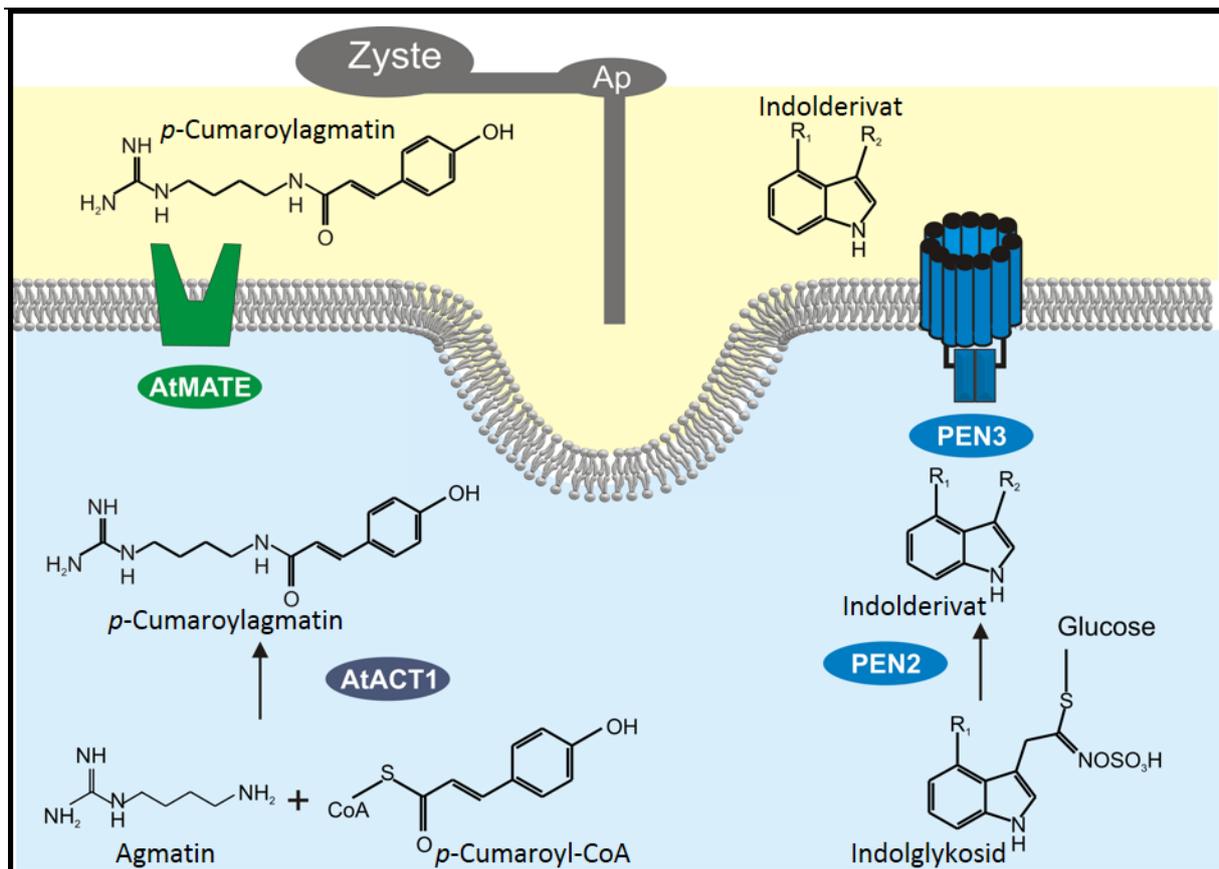


Abbildung 38: Modell der Funktionsweise von AtACT1 und AtMATE an der Zellperipherie neben der PEN2/PEN3-vermittelten Abwehr in *A. thaliana* nach *P. infestans*-Kontakt. AtACT1 katalysiert die Biosynthese von *p*-Cumaroylagmatin durch die Kondensation von Agmatin mit *p*-Cumaroyl-CoA im Zellinneren. Anschließend wird das *p*-Cumaroylagmatin durch AtMATE in den Apoplasten zur Penetrationsstelle von *P. infestans* transportiert. PEN2 katalysiert die Spaltung von Indolglykosiden in Glucose und Indolderivate. Die Indolderivate werden PEN3-vermittelt in den Apoplasten zur Penetrationsstelle von *P. infestans* transportiert. Ap – Apressorium. Abbildung ist inspiriert durch Ellis (2006)

6. Literaturverzeichnis

- Aist, J.R. (1976). Papillae and Related Wound Plugs of Plant Cells. *Annu. Rev. Phytopathol.* *14*, 145–163.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* *124*, 783–801.
- Alcázar, R., Altabella, T., Marco, F., Bortolotti, C., Reymond, M., Koncz, C., Carrasco, P., and Tiburcio, A.F. (2010). Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* *231*, 1237–1249.
- Ali, A., Alexandersson, E., Sandin, M., Resjö, S., Lenman, M., Hedley, P., Levander, F., and Andreasson, E. (2014). Quantitative proteomics and transcriptomics of potato in response to *Phytophthora infestans* in compatible and incompatible interactions. *BMC Genomics* *15*, 497.
- 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., et al. (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* *301*, 653–657.
- Ames, M., and Spooner, D.M. (2008). DNA from herbarium specimens settles a controversy about origins of the European potato. *Am. J. Bot.* *95*, 252–257.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* *55*, 373–399.
- Assaad, F.F., Qiu, J.-L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S.C., Edwards, H., Ramonell, K., et al. (2004). The PEN1 Syntaxin Defines a Novel Cellular Compartment upon Fungal Attack and Is Required for the Timely Assembly of Papillae. *Mol. Biol. Cell* *15*, 5118–5129.
- Ausubel, F.M. (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat. Immunol.* *6*, 973–979.
- Back, K., Jang, S.M., Lee, B.-C., Schmidt, A., Strack, D., and Kim, K.-M. (2001). Cloning and Characterization of a Hydroxycinnamoyl-CoA:Tyramine N-(Hydroxycinnamoyl)Transferase Induced in Response to UV-C and Wounding from *Capsicum annuum*. *Plant Cell Physiol.* *42*, 475–481.
- de Bary, A. (1861). *Recherches s. le développement de quelques champignons parasites.*
- Bassard, J.-E., Ullmann, P., Bernier, F., and Werck-Reichhart, D. (2010). Phenolamides:

- Bridging polyamines to the phenolic metabolism. *Phytochemistry* 71, 1808–1824.
- Becker, A., and Lange, M. (2010). VIGS – genomics goes functional. *Trends Plant Sci.* 15, 1–4.
- Bednarek, P. (2012a). Sulfur-Containing Secondary Metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with Function in Plant Immunity. *ChemBioChem* 13, 1846–1859.
- Bednarek, P. (2012b). Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 407–414.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Svatoš, A., Schneider, B., Doubský, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., et al. (2009). A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science* 323, 101–106.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Ver Loren van Themaat, E., Maddula, R.K., Svatoš, A., and Schulze-Lefert, P. (2011). Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. *New Phytol.* 192, 713–726.
- Bent, A.F., and Mackey, D. (2007). Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 399–436.
- Berglund, G.I., Carlsson, G.H., Smith, A.T., Szöke, H., Henriksen, A., and Hajdu, J. (2002). The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 417, 463–468.
- Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.-D., Young, C., Kamoun, S., and Haldar, K. (2006). The Malarial Host-Targeting Signal Is Conserved in the Irish Potato Famine Pathogen. *PLoS Pathog.* 2.
- Bimboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513–1523.
- Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839–841.
- Boller, T., and He, S.Y. (2009). Innate Immunity in Plants: An Arms Race Between Pattern Recognition Receptors in Plants and Effectors in Microbial Pathogens. *Science* 324, 742–744.
- Bones, A.M., and Rossiter, J.T. (2006). The enzymic and chemically induced

sition of glucosinolates. *Phytochemistry* 67, 1053–1067.

Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D., and Glawischnig, E. (2009). The Multifunctional Enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) Converts Cysteine-Indole-3-Acetonitrile to Camalexin in the Indole-3-Acetonitrile Metabolic Network of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Online* 21, 1830–1845.

Bowyer, P., Clarke, B.R., Lunness, P., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E. (1995). Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme. *Science* 267, 371–374.

Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J., and Kamoun, S. (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 483–492.

Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nürnberger, T. (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* 21, 6681–6688.

Buist, G., Steen, A., Kok, J., and Kuipers, O.P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol. Microbiol.* 68, 838–847.

Büttner, D., and Bonas, U. (2003). Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 312–319.

Büttner, D., and Bonas, U. (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 193–200.

Campos, L., Lisón, P., López-Gresa, M.P., Rodrigo, I., Zacarés, L., Conejero, V., and Bellés, J.M. (2014). Transgenic Tomato Plants Overexpressing Tyramine N-Hydroxycinnamoyltransferase Exhibit Elevated Hydroxycinnamic Acid Amide Levels and Enhanced Resistance to *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 27, 1159–1169.

Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Ve, T., Kobe, B., Ellis, J.G., and Staskawicz, B.J. (2010). The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 23, 49–57.

Chapman, S., Stevens, L.J., Boevink, P.C., Engelhardt, S., Alexander, C.J., Harrower, B., Champouret, N., McGeachy, K., Van Weymers, P.S.M., Chen, X., et al. (2014). Detection of the Virulent Form of AVR3a from *Phytophthora infestans* following Artificial Evolution of Potato Resistance Gene R3a. *PLoS ONE* 9.

- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., and Staskawicz, B.J. (2006). Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell* 124, 803–814.
- Choi, H.W., Kim, Y.J., Lee, S.C., Hong, J.K., and Hwang, B.K. (2007). Hydrogen Peroxide Generation by the Pepper Extracellular Peroxidase CaPO2 Activates Local and Systemic Cell Death and Defense Response to Bacterial Pathogens. *Plant Physiol.* 145, 890–904.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G., and Ausubel, F.M. (2009). Glucosinolate Metabolites Required for an Arabidopsis Innate Immune Response. *Science* 323, 95–101.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.-L., Hückelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C., et al. (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* 425, 973–977.
- Consortium, T.P.G.S. (2011). Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475, 189–195.
- Crouzet, J., Trombik, T., Frayse, Å.S., and Boutry, M. (2006). Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett.* 580, 1123–1130.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826–833.
- Datenreport 2014 der Stiftung Weltbevölkerung Datenreport_2014_Stiftung_Weltbevoelkerung.pdf.
- Daudi, A., Cheng, Z., O'Brien, J.A., Mammarella, N., Khan, S., Ausubel, F.M., and Bolwell, G.P. (2012). The Apoplastic Oxidative Burst Peroxidase in Arabidopsis Is a Major Component of Pattern-Triggered Immunity[W][OA]. *Plant Cell* 24, 275–287.
- D'Auria, J.C. (2006). Acyltransferases in plants: a good time to be BAHD. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 331–340.
- D'Auria, J.C., and Gershenzon, J. (2005). The secondary metabolism of Arabidopsis thaliana: growing like a weed. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 308–316.
- Davin, L.B., and Lewis, N.G. (2005). Lignin primary structures and dirigent sites. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 407–415.

- Debeaujon, I., Nesi, N., Perez, P., Devic, M., Grandjean, O., Caboche, M., and Lepiniec, L. (2003). Proanthocyanidin-Accumulating Cells in Arabidopsis Testa: Regulation of Differentiation and Role in Seed Development. *Plant Cell* 15, 2514–2531.
- Deininger, P. (1990). *Molecular cloning: A laboratory manual*: 2nd ed. Edited by J. Sambrook, E. F. Fritsch, and T. Maniatis. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989 (in 3 volumes). *Anal. Biochem.* 186, 182–183.
- Deslandes, L., and Rivas, S. (2012). Catch me if you can: bacterial effectors and plant targets. *Trends Plant Sci.* 17, 644–655.
- Diao, J., Su, Z., Ishitsuka, Y., Lu, B., Lee, K.S., Lai, Y., Shin, Y.-K., and Ha, T. (2010). A single-vesicle content mixing assay for SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Commun.* 1, 54.
- Diener, A.C., Gaxiola, R.A., and Fink, G.R. (2001). Arabidopsis ALF5, a Multidrug Efflux Transporter Gene Family Member, Confers Resistance to Toxins. *Plant Cell Online* 13, 1625–1638.
- Dixon, R.A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* 411, 843–847.
- Dixon, M.S., Golstein, C., Thomas, C.M., Biezen, E.A. van der, and Jones, J.D.G. (2000). Genetic complexity of pathogen perception by plants: The example of Rcr3, a tomato gene required specifically by Cf-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 8807–8814.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S.S., and Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3, 371–390.
- Dobritzsch, M., Lübken, T., Eschen-Lippold, L., Gorzolka, K., Blum, E., Matern, A., Marillonnet, S., Böttcher, C., Dräger, B., and Rosahl, S. (2016). MATE Transporter-Dependent Export of Hydroxycinnamic Acid Amides. *Plant Cell* 28, 583–596.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548.
- Doehlemann, G., and Hemetsberger, C. (2013). Apoplastic immunity and its suppression by filamentous plant pathogens. *New Phytol.* 198, 1001–1016.
- Dudler, R. (2013). Manipulation of Host Proteasomes as a Virulence Mechanism of Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 51, 521–542.
- Dyda, F., Klein, D.C., and Hickman, A.B. (2000). GCN5-RELATED N-ACETYLTRANSFERASES: A Structural Overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol.*

Struct. 29, 81–103.

Edahiro, J., and Seki, M. (2006). Phenylpropanoid metabolite supports cell aggregate formation in strawberry cell suspension culture. *J. Biosci. Bioeng.* 102, 8–13.

Egusa, M., Miwa, T., Kaminaka, H., Takano, Y., and Kodama, M. (2013). Nonhost Resistance of *Arabidopsis thaliana* Against *Alternaria alternata* Involves both Pre- and Postinvasive Defenses but Is Collapsed by AAL-Toxin in the Absence of LOH2. *Phytopathology* 103, 733–740.

El Gueddari, N.E., Rauchhaus, U., Moerschbacher, B.M., and Deising, H.B. (2002). Developmentally regulated conversion of surface-exposed chitin to chitosan in cell walls of plant pathogenic fungi. *New Phytol.* 156, 103–112.

Elkind, Y., Edwards, R., Mavandad, M., Hedrick, S.A., Ribak, O., Dixon, R.A., and Lamb, C.J. (1990). Abnormal plant development and down-regulation of phenylpropanoid biosynthesis in transgenic tobacco containing a heterologous phenylalanine ammonia-lyase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 9057–9061.

Ellis, J. (2006). Insights into Nonhost Disease Resistance: Can They Assist Disease Control in Agriculture? *Plant Cell Online* 18, 523–528.

Engelhardt, S., Boevink, P.C., Armstrong, M.R., Ramos, M.B., Hein, I., and Birch, P.R.J. (2012). Relocalization of Late Blight Resistance Protein R3a to Endosomal Compartments Is Associated with Effector Recognition and Required for the Immune Response. *Plant Cell Online* tpc.112.104992.

Engler, C., Gruetzner, R., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2009). Golden Gate Shuffling: A One-Pot DNA Shuffling Method Based on Type II Restriction Enzymes. *PLoS ONE* 4, e5553.

Eschen-Lippold, L., Rothe, G., Stumpe, M., Göbel, C., Feussner, I., and Rosahl, S. (2007). Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochemistry* 68, 797–801.

Eschen-Lippold, L., Draeger, T., Teichert, A., Wessjohann, L., Westermann, B., Rosahl, S., and Arnold, N. (2009). Antioomycete Activity of γ -Oxocrotonate Fatty Acids against *P. infestans*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 9607–9612.

Eschen-Lippold, L., Landgraf, R., Smolka, U., Schulze, S., Heilmann, M., Heilmann, I., Hause, G., and Rosahl, S. (2012). Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression. *New Phytol.* 193, 985–996.

- Facchini, P.J., Hagel, J., and Zulak, K.G. (2002). Hydroxycinnamic acid amide metabolism: physiology and biochemistry. *Can. J. Bot.* *80*, 577–589.
- Fattorusso, E., Lanzotti, V., and Tagliatalata-Scafati, O. (1999). Antifungal *N*-feruloyl amides from roots of two *Allium* species. *Plant Biosyst. - Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.* *133*, 199–203.
- Fauth, M., Schweizer, P., Buchala, A., Markstädter, C., Riederer, M., Kato, T., and Kaus, H. (1998). Cutin Monomers and Surface Wax Constituents Elicit H₂O₂ in Conditioned Cucumber Hypocotyl Segments and Enhance the Activity of Other H₂O₂Elicitors. *Plant Physiol.* *117*, 1373–1380.
- Fellenberg, C., and Vogt, T. (2015). Evolutionarily conserved phenylpropanoid pattern on angiosperm pollen. *Trends Plant Sci.* *20*, 212–218.
- Fellenberg, C., Ohlen, M., Handrick, V., and Vogt, T. (2012). The role of CCoAOMT1 and COMT1 in Arabidopsis anthers. *Planta* *236*, 51–61.
- Feltkamp, D., Baumann, E., Schmalenbach, W., Masterson, R., and Rosahl, S. (1995). Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the mas elements and correlates with high transcript levels of mas-binding factor. *Plant Sci.* *109*, 57–65.
- Foley, J.A., Ramankutty, N., Brauman, K.A., Cassidy, E.S., Gerber, J.S., Johnston, M., Mueller, N.D., O’Connell, C., Ray, D.K., West, P.C., et al. (2011). Solutions for a cultivated planet. *Nature* *478*, 337–342.
- Fry, W. (2008). *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol. Plant Pathol.* *9*, 385–402.
- Fry, W.E., and Goodwin, S.B. (1997). Resurgence of the Irish Potato Famine Fungus. *BioScience* *47*, 363–371.
- Fuell, C., Elliott, K.A., Hanfrey, C.C., Franceschetti, M., and Michael, A.J. (2010). Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol. Biochem.* *48*, 513–520.
- Fujikawa, T., Kuga, Y., Yano, S., Yoshimi, A., Tachiki, T., Abe, K., and Nishimura, M. (2009). Dynamics of cell wall components of *Magnaporthe grisea* during infectious structure development. *Mol. Microbiol.* *73*, 553–570.
- Fujikawa, T., Sakaguchi, A., Nishizawa, Y., Kouzai, Y., Minami, E., Yano, S., Koga, H., Meshi, T., and Nishimura, M. (2012). Surface α -1,3-Glucan Facilitates Fungal Stealth Infection by Interfering with Innate Immunity in Plants. *PLoS Pathog.* *8*.

- Geerts, A., Feltkamp, D., and Rosahl, S. (1994). Expression of Lipoxygenase in Wounded Tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol.* *105*, 269–277.
- Gilroy, E.M., Taylor, R.M., Hein, I., Boevink, P., Sadanandom, A., and Birch, P.R.J. (2011). CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma membrane and is suppressed by *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a. *New Phytol.* *190*, 653–666.
- Göhre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 189–215.
- Gómez-Alpizar, L., Carbone, I., and Ristaino, J.B. (2007). An Andean origin of *Phytophthora infestans* inferred from mitochondrial and nuclear gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 3306–3311.
- Goss, E.M., Tabima, J.F., Cooke, D.E.L., Restrepo, S., Fry, W.E., Forbes, G.A., Fieland, V.J., Cardenas, M., and Grünwald, N.J. (2014). The Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* originated in central Mexico rather than the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201401884.
- Gráda, C.Ó., and Eiríksson, A. (2006). *Ireland's Great Famine: Interdisciplinary Perspectives* (University College Dublin Press).
- Grandmaison, J., Olah, G.M., Calsteren, M.-R.V., and Furlan, V. (1993). Characterization and localization of plant phenolics likely involved in the pathogen resistance expressed by endomycorrhizal roots. *Mycorrhiza* *3*, 155–164.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., and Blatt, M.R. (2010). A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J.* *64*, 355–365.
- Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., Duggavathi, R., Fox, S., and Somers, D.J. (2012). Integrated Metabolo-Proteomic Approach to Decipher the Mechanisms by Which Wheat QTL (Fhb1) Contributes to Resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* *7*, e34717.
- Hague, J.M., and Facchini, P.J. (2005). Elevated tyrosine decarboxylase and tyramine hydroxycinnamoyltransferase levels increase wound-induced tyramine-derived hydroxycinnamic acid amide accumulation in transgenic tobacco leaves. *Planta* *221*, 904–914.
- Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1989). *Physiology and Molecular Biology of*

- panoid Metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *40*, 347–369.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., and Stöcker, R.H. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* *361*, 153–156.
- Handrick, V., Vogt, T., and Frolov, A. (2010). Profiling of hydroxycinnamic acid amides in *Arabidopsis thaliana* pollen by tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* *398*, 2789–2801.
- Haverkort, A.J., Boonekamp, P.M., Hutten, R., Jacobsen, E., Lotz, L. a. P., Kessel, G.J.T., Visser, R.G.F., and Vossen, E.A.G. van der (2008). Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. *Potato Res.* *51*, 47–57.
- Hayashi, T., Read, S.M., Bussell, J., Thelen, M., Lin, F.-C., Brown, R.M., and Delmer, D.P. (1987). UDP-Glucose: (1→3)- β -Glucan Synthases from Mung Bean and Cotton Differential Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on Enzyme Properties and on Macromolecular Structure of the Glucan Product. *Plant Physiol.* *83*, 1054–1062.
- He, X., Szewczyk, P., Karyakin, A., Evin, M., Hong, W.-X., Zhang, Q., and Chang, G. (2010). Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature* *467*, 991–994.
- Heath, M.C. (2000a). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol. Biol.* *44*, 321–334.
- Heath, M.C. (2000b). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* *3*, 315–319.
- Heath, M.C. (2001). Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *58*, 53–54.
- Henriquez, M.A., Adam, L.R., and Daayf, F. (2012). Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol. Biochem.* *57*, 8–14.
- Hickman, A.B., Namboodiri, M.A.A., Klein, D.C., and Dyda, F. (1999). The Structural Basis of Ordered Substrate Binding by Serotonin N-Acetyltransferase: Enzyme Complex at 1.8 Å Resolution with a Bisubstrate Analog. *Cell* *97*, 361–369.
- Hirsch, C.D., Hamilton, J.P., Childs, K.L., Cepela, J., Crisovan, E., Vaillancourt, B., Hirsch, C.N., Habermann, M., Neal, B., and Buell, C.R. (2014). Spud DB: A Resource

- for Mining Sequences, Genotypes, and Phenotypes to Accelerate Potato Breeding. *Plant Genome* 7, 0.
- Hiruma, K., Fukunaga, S., Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Watanabe, S., Narusaka, Y., Shirasu, K., and Takano, Y. (2013). Glutathione and tryptophan metabolism are required for Arabidopsis immunity during the hypersensitive response to hemibiotrophs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9589–9594.
- Hofgen, R., and Willmitzer, L. (1988). Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res.* 16, 9877.
- Hohlfeld, H., Schurmann, W., Scheel, D., and Strack, D. (1995). Partial Purification and Characterization of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:Tyramine Hydroxycinnamoyltransferase from Cell Suspension Cultures of *Solanum tuberosum*. *Plant Physiol.* 107, 545–552.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101–127.
- Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A., Francis, D.M., and Kamoun, S. (2003). Active defence responses associated with non-host resistance of Arabidopsis thaliana to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant Pathol.* 4, 487–500.
- Iiyama, K., Lam, T., and Stone, B.A. (1994). Covalent Cross-Links in the Cell Wall. *Plant Physiol.* 104, 315–320.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B. (2003). An Arabidopsis Callose Synthase, *GSL5*, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* 15, 2503–2513.
- Jakobitz, A. (2009).
- Jang, S.-M., Ishihara, A., and Back, K. (2004). Production of Coumaroylserotonin and Feruloylserotonin in Transgenic Rice Expressing Pepper Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A:Serotonin N-(Hydroxycinnamoyl)transferase. *Plant Physiol.* 135, 346–356.
- Jansohn, M. (2007). *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor* (Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag).
- Johansson, O.N., Fantozzi, E., Fahlberg, P., Nilsson, A.K., Buhot, N., Tör, M., and Andersson, M.X. (2014). Role of the penetration-resistance genes *PEN1*, *PEN2* and *PEN3* in the hypersensitive response and race-specific resistance in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 79, 466–476.

- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329.
- Judelson, H.S. (1997). The Genetics and Biology of *Phytophthora infestans*: Modern Approaches to a Historical Challenge. *Fungal Genet. Biol.* 22, 65–76.
- Judelson, H.S., and Blanco, F.A. (2005). The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 47–58.
- Kale, S.D., and Tyler, B.M. (2011). Entry of oomycete and fungal effectors into plant and animal host cells. *Cell. Microbiol.* 13, 1839–1848.
- Kamoun, S. (2001). Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4, 295–300.
- Kamoun, S., and Smart, C.D. (2005). Late Blight of Potato and Tomato in the Genomics Era. *Plant Dis.* 89, 692–699.
- Kamoun, S., Furzer, O., Jones, J.D.G., Judelson, H.S., Ali, G.S., Dalio, R.J.D., Roy, S.G., Schena, L., Zambounis, A., Panabières, F., et al. (2015). The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* n/a-n/a.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *Arab. Book* e0153.
- Kang, S., Kang, K., Chung, G.C., Choi, D., Ishihara, A., Lee, D.-S., and Back, K. (2006). Functional Analysis of the Amine Substrate Specificity Domain of Pepper Tyramine and Serotonin N-Hydroxycinnamoyltransferases. *Plant Physiol.* 140, 704–715.
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., and Hoorn, R.A.L. van der (2010). An Effector-Targeted Protease Contributes to Defense against *Phytophthora infestans* and Is under Diversifying Selection in Natural Hosts. *Plant Physiol.* 154, 1794–1804.
- Kaur, H., Heinzl, N., Schöttner, M., Baldwin, I.T., and Gális, I. (2010). R2R3-NaMYB8 Regulates the Accumulation of Phenylpropanoid-Polyamine Conjugates, Which Are Essential for Local and Systemic Defense against Insect Herbivores in *Nicotiana attenuata* [W][OA]. *Plant Physiol.* 152, 1731–1747.
- Keller, H., Hohlfeld, H., Wray, V., Hahlbrock, K., Scheel, D., and Strack, D. (1996). Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* 42, 389–396.
- Keukens, E.A.J., de Vrije, T., van den Boom, C., de Waard, P., Plasman, H.H., Thiel, F.,

- Chupin, V., Jongen, W.M.F., and de Kruijff, B. (1995). Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1240*, 216–228.
- Kikot, G.E., Hours, R.A., and Alconada, T.M. (2009). Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. *J. Basic Microbiol.* *49*, 231–241.
- Kinealy, C. (1994). *This Great Calamity: The Irish Famine, 1845-52* (Gill & Macmillan).
- KISHIDA, K.T., and KLANN, E. (2007). Sources and Targets of Reactive Oxygen Species in Synaptic Plasticity and Memory. *Antioxid. Redox Signal.* *9*, 233–244.
- Kitsios, G., and Doonan, J.H. (2011). Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant Signal. Behav.* *6*, 204–209.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., and Kunoh, H. (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J.* *11*, 525–537.
- Kohen, R., and Nyska, A. (2002). Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. *Toxicol. Pathol.* *30*, 620–650.
- Krulwich, T.A., Lewinson, O., Padan, E., and Bibi, E. (2005). Do physiological roles foster persistence of drug/multidrug-efflux transporters? A case study. *Nat. Rev. Microbiol.* *3*, 566–572.
- Kuc, J. (1995). Phytoalexins, Stress Metabolism, and Disease Resistance in Plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *33*, 275–297.
- Kuhn, M.L., Majorek, K.A., Minor, W., and Anderson, W.F. (2013). Broad-substrate screen as a tool to identify substrates for bacterial Gcn5-related N-acetyltransferases with unknown substrate specificity. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *22*, 222–230.
- Kwon, C., Bednarek, P., and Schulze-Lefert, P. (2008). Secretory Pathways in Plant Immune Responses. *Plant Physiol.* *147*, 1575–1583.
- Landgraf, R., Smolka, U., Altmann, S., Eschen-Lippold, L., Senning, M., Sonnewald, S., Weigel, B., Frolova, N., Strehmel, N., Hause, G., et al. (2014). The ABC Transporter ABCG1 Is Required for Suberin Formation in Potato Tuber Periderm. *Plant Cell Online* *26*, 3403–3415.

- Landtag, J. (2006). "Untersuchung des Pathosystems *Arabidopsis thaliana* (L.)-*Phytophthora infestans* und Charakterisierung von Mutanten mit veränderten Nicht-wirtsresistenz-Phänotyp. Dissertation. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Lazo, G.R., Stein, P.A., and Ludwig, R.A. (1991). A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnol. Nat. Publ. Co.* 9, 963–967.
- Lee, D.E., Kang, K., Lee, S.-G., and Back, K. (2007). Enhanced synthesis of feruloyltyramine and 4-coumaroyltyramine is associated with tyramine availability in transgenic rice expressing pepper tyramine N-hydroxycinnamoyltransferase. *Plant Sci.* 172, 57–63.
- Lehmann, S., Serrano, M., L'Haridon, F., Tjamos, S.E., and Metraux, J.-P. (2014). Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. *Phytochemistry*.
- Leubner-Metzger, G., and Amrhein, N. (1993). The distribution of hydroxycinnamoylputrescines in different organs of *Solanum tuberosum* and other solanaceous species. *Phytochemistry* 32, 551–556.
- Li, L., He, Z., Pandey, G.K., Tsuchiya, T., and Luan, S. (2002). Functional Cloning and Characterization of a Plant Efflux Carrier for Multidrug and Heavy Metal Detoxification. *J. Biol. Chem.* 277, 5360–5368.
- Lipka, U., Fuchs, R., and Lipka, V. (2008). *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11, 404–411.
- Lipka, U., Fuchs, R., Kuhns, C., Petutschnig, E., and Lipka, V. (2010). Live and let die – *Arabidopsis* nonhost resistance to powdery mildews. *Eur. J. Cell Biol.* 89, 194–199.
- Lipka, V., Dittgen, J., Bednarek, P., Bhat, R., Wiermer, M., Stein, M., Landtag, J., Brandt, W., Rosahl, S., Scheel, D., et al. (2005). Pre- and Postinvasion Defenses Both Contribute to Nonhost Resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310, 1180–1183.
- Lipka, V., Kwon, C., and Panstruga, R. (2007). SNARE-Ware: The Role of SNARE-Domain Proteins in Plant Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 147–174.
- Lok, H.C., Rahmanto, Y.S., Hawkins, C.L., Kalinowski, D.S., Morrow, C.S., Townsend, A.J., Ponka, P., and Richardson, D.R. (2012). Nitric Oxide Storage and Transport in Cells Are Mediated by Glutathione S-Transferase P1-1 and Multidrug Resistance Protein 1 via Dinitrosyl Iron Complexes. *J. Biol. Chem.* 287, 607–618.
- Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C.S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S.-C., Maier, C.S., and Wolpert, T.J. (2012). Tricking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. *Science* 338, 659–662.

- Lovat, C., Nassar, A.M.K., Kubow, S., Li, X., and Donnelly, D.J. (2015). Metabolic Biosynthesis of Potato (*Solanum tuberosum* L.) Antioxidants and Implications for Human Health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* *0*, 00–00.
- Lu, L., Berkey, K.A., and Casero, R.A. (1996). RGFGLGS Is an Amino Acid Sequence Required for Acetyl Coenzyme A Binding and Activity of Human Spermidine/Spermine N1Acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* *271*, 18920–18924.
- Luo, J., Nishiyama, Y., Fuell, C., Taguchi, G., Elliott, K., Hill, L., Tanaka, Y., Kitayama, M., Yamazaki, M., Bailey, P., et al. (2007). Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *50*, 678–695.
- Luo, J., Fuell, C., Parr, A., Hill, L., Bailey, P., Elliott, K., Fairhurst, S.A., Martin, C., and Michael, A.J. (2009). A Novel Polyamine Acyltransferase Responsible for the Accumulation of Spermidine Conjugates in *Arabidopsis* Seed. *Plant Cell Online* *21*, 318–333.
- Ma, X., Koepke, J., Panjikar, S., Fritzsche, G., and Stöckigt, J. (2005). Crystal Structure of Vinorine Synthase, the First Representative of the BAHD Superfamily. *J. Biol. Chem.* *280*, 13576–13583.
- Ma, Z., Song, T., Zhu, L., Ye, W., Wang, Y., Shao, Y., Dong, S., Zhang, Z., Dou, D., Zheng, X., et al. (2015). A *Phytophthora sojae* Glycoside Hydrolase 12 Protein Is a Major Virulence Factor during Soybean Infection and Is Recognized as a PAMP. *Plant Cell* tpc.15.00390.
- Machado, T.B., Pinto, A.V., Pinto, M.C.F.R., Leal, I.C.R., Silva, M.G., Amaral, A.C.F., Kuster, R.M., and Netto-dosSantos, K.R. (2003). In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphthoquinones and their analogues, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Agents* *21*, 279–284.
- Macho, A.P., and Zipfel, C. (2014). Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Mol. Cell* *54*, 263–272.
- Macoy, D.M., Kim, W.-Y., Lee, S.Y., and Kim, M.G. (2015). Biotic stress related functions of hydroxycinnamic acid amide in plants. *J. Plant Biol.* *58*, 156–163.
- Maeda, K., Houjyou, Y., Komatsu, T., Hori, H., Kodaira, T., and Ishikawa, A. (2009). AGB1 and PMR5 Contribute to PEN2-Mediated Preinvasion Resistance to *Magnaporthe oryzae* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *22*, 1331–1340.

- Marois, E., Van den Ackerveken, G., and Bonas, U. (2002). The Xanthomonas Type III Effector Protein AvrBs3 Modulates Plant Gene Expression and Induces Cell Hypertrophy in the Susceptible Host. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *15*, 637–646.
- Martin-Tanguy, J., Cabanne, F., Perdriquet, E., and Martin, C. (1978). The distribution of hydroxycinnamic acid amides in flowering plants. *Phytochemistry* *17*, 1927–1928.
- Mauch-Mani, B., and Mauch, F. (2005). The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 409–414.
- Mehdy, M.C. (1994). Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* *105*, 467–472.
- Melton, R.E., Flegg, L.M., Brown, J.K.M., Oliver, R.P., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E. (1998). Heterologous Expression of *Septoria lycopersici* Tomatinase in *Cladosporium fulvum*: Effects on Compatible and Incompatible Interactions with Tomato Seedlings. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *11*, 228–236.
- Mock, H.-P., and Strack, D. (1993). Energetics of the uridine 5'-diphosphoglucose: Hydroxycinnamic acid acyl-glucosyltransferase reaction. *Phytochemistry* *32*, 575–579.
- Moglia, A., Lanteri, S., Comino, C., Hill, L., Knevitt, D., Cagliero, C., Rubiolo, P., Bornemann, S., and Martin, C. (2014). Dual Catalytic Activity of Hydroxycinnamoyl-Coenzyme A Quinate Transferase from Tomato Allows It to Moonlight in the Synthesis of Both Mono- and Dicafeoylquinic Acids. *Plant Physiol.* *166*, 1777–1787.
- Monastirioti, M., Charles E. Linn, J., and White, K. (1996). Characterization of *Drosophila* Tyramine β -Hydroxylase Gene and Isolation of Mutant Flies Lacking Octopamine. *J. Neurosci.* *16*, 3900–3911.
- Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S., Mine, T., Kataoka, A., Mizushima, T., and Tsuchiya, T. (1998). NorM, a Putative Multidrug Efflux Protein, of *Vibrio parahaemolyticus* and Its Homolog in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *42*, 1778–1782.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* *15*, 473–497.
- Muroi, A., Ishihara, A., Tanaka, C., Ishizuka, A., Takabayashi, J., Miyoshi, H., and Nishioka, T. (2009). Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* *230*, 517–527.
- Muroi, A., Matsui, K., Shimoda, T., Kihara, H., Ozawa, R., Ishihara, A., Nishihara, M.,

- and Arimura, G. (2012). Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests. *Sci. Rep.* 2.
- Mysore, K.S., and Ryu, C.-M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci.* 9, 97–104.
- Nagata, T., Yamada, H., Du, Z., Todoriki, S., and Kikuchi, S. (2005). Microarray Analysis of Genes that Respond to γ -Irradiation in Arabidopsis. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1022–1030.
- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Métraux, J.-P. (2002). EDS5, an Essential Component of Salicylic Acid-Dependent Signaling for Disease Resistance in Arabidopsis, Is a Member of the MATE Transporter Family. *Plant Cell* 14, 275–286.
- Negrel, J., Javelle, F., and Paynot, M. (1993). Wound-Induced Tyramine Hydroxycinnamoyl Transferase in Potato (*Solanum tuberosum*) Tuber discs. *J. Plant Physiol.* 142, 518–524.
- Negrel, J., Pollet, B., and Lapierre, C. (1996). Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber. *Phytochemistry* 43, 1195–1199.
- Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenführ, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* 51, 1126–1136.
- Niklaus (2010). Introduction to Oomycetes. *Plant Health Instr.*
- Nowicki, M., Foolad, M.R., Nowakowska, M., and Kozik, E.U. (2012). Potato and Tomato Late Blight Caused by *Phytophthora infestans* : An Overview of Pathology and Resistance Breeding. *Plant Dis.* 96, 4–17.
- Nürnbergger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78, 449–460.
- Ökmen, B., Etalo, D.W., Joosten, M.H.A.J., Bouwmeester, H.J., de Vos, R.C.H., Collemare, J., and de Wit, P.J.G.M. (2013). Detoxification of α -tomatine by *Cladosporium fulvum* is required for full virulence on tomato. *New Phytol.* 198, 1203–1214.
- Ohnishi, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., and Moriyama, Y. (2006). The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations. *Trends Pharmacol. Sci.* 27, 587–593.
- Onkokesung, N., Gaquerel, E., Kotkar, H., Kaur, H., Baldwin, I.T., and Galis, I. (2012).

- MYB8 Controls Inducible Phenolamide Levels by Activating Three Novel droxycinnamoyl-Coenzyme A:Polyamine Transferases in *Nicotiana attenuata*. *Plant Physiol.* *158*, 389–407.
- Osbourn, A. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *Plant Cell* *8*, 1821–1831.
- Pajonk, S., Kwon, C., Clemens, N., Panstruga, R., and Schulze-Lefert, P. (2008). Activity Determinants and Functional Specialization of Arabidopsis PEN1 Syntaxin in Innate Immunity. *J. Biol. Chem.* *283*, 26974–26984.
- Panstruga, R., and Dodds, P.N. (2009). Terrific Protein Traffic: The Mystery of Effector Protein Delivery by Filamentous Plant Pathogens. *Science* *324*, 748–750.
- Paulsen, I.T. (2003). Multidrug efflux pumps and resistance: regulation and evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 446–451.
- Paynot, M., Perennec, P., Martin-Tanguy, J., Vernoy, R., and Javelle, F. (1983). Photopériodisme, tubérisation et phénolamides. *Comptes Rendus Séances Académie Sci. Sér. 3 Sci. Vie* *297*, 87–90.
- Payyavula, R.S., Navarre, D.A., Kuhl, J.C., Pantoja, A., and Pillai, S.S. (2012). Differential effects of environment on potato phenylpropanoid and carotenoid expression. *BMC Plant Biol.* *12*, 39.
- Pearce, G., Marchand, P.A., Griswold, J., Lewis, N.G., and Ryan, C.A. (1998). Accumulation of feruloyltyramine and p-coumaroyltyramine in tomato leaves in response to wounding. *Phytochemistry* *47*, 659–664.
- Pegg, A.E. (2008). Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* *294*, E995–E1010.
- Petre, B., and Kamoun, S. (2014). How Do Filamentous Pathogens Deliver Effector Proteins into Plant Cells? *PLoS Biol.* *12*.
- Pfalz, M., Mikkelsen, M.D., Bednarek, P., Olsen, C.E., Halkier, B.A., and Kroymann, J. (2011). Metabolic Engineering in *Nicotiana benthamiana* Reveals Key Enzyme Functions in Arabidopsis Indole Glucosinolate Modification. *Plant Cell* *23*, 716–729.
- Pichorner, H., Couperus, A., Korori, S.A.A., and Ebermann, R. (1992). Plant peroxidase has a thiol oxidase function. *Phytochemistry* *31*, 3371–3376.
- Prince, D.C., Drurey, C., Zipfel, C., and Hogenhout, S.A. (2014). The Leucine-Rich peat Receptor-Like Kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED

- KINASE1 and the Cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 Contribute to Innate Immunity to Aphids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *164*, 2207–2219.
- Pritchard, L., and Birch, P.R.J. (2014). The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on? *Mol. Plant Pathol.* *15*, 865–870.
- Prost, I., Dhondt, S., Rothe, G., Vicente, J., Rodriguez, M.J., Kift, N., Carbonne, F., Griffiths, G., Esquerré-Tugayé, M.-T., Rosahl, S., et al. (2005). Evaluation of the Antimicrobial Activities of Plant Oxylipins Supports Their Involvement in Defense against Pathogens. *Plant Physiol.* *139*, 1902–1913.
- Pushpa, D., Yogendra, K.N., Gunnaiah, R., Kushalappa, A.C., and Murphy, A. (2013). Identification of Late Blight Resistance-Related Metabolites and Genes in Potato through Nontargeted Metabolomics. *Plant Mol. Biol. Report.* *32*, 584–595.
- Qiao, Y., Shi, J., Zhai, Y., Hou, Y., and Ma, W. (2015). Phytophthora effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201421475.
- Rakwal, R., Hasegawa, M., and Kodama, O. (1996). A Methyltransferase for Synthesis of the Flavanone Phytoalexin Sakuranetin in Rice Leaves. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *222*, 732–735.
- Reader, J. (2008). The Fungus That Conquered Europe. *N. Y. Times*.
- Remy, E., and Duque, P. (2014). Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. *Membr. Physiol. Membr. Biophys.* *5*, 201.
- Remy, E., Cabrito, T.R., Baster, P., Batista, R.A., Teixeira, M.C., Friml, J., Sá-Correia, I., and Duque, P. (2013). A Major Facilitator Superfamily Transporter Plays a Dual Role in Polar Auxin Transport and Drought Stress Tolerance in Arabidopsis[W]. *Plant Cell* *25*, 901–926.
- Rocha-Sosa, M., Sonnewald, U., Frommer, W., Stratmann, M., Schell, J., and Willmitzer, L. (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* *8*, 23–29.
- Romeo, F.V., Ballistreri, G., Fabroni, S., Pangallo, S., Nicosia, M.G.L.D., Schena, L., and Rapisarda, P. (2015). Chemical Characterization of Different Sumac and Pomegranate Extracts Effective against Botrytis cinerea Rots. *Molecules* *20*, 11941–11958.
- Rose, H.C.E., Klooster, J.W. van't, Hoorn, R.A.L. van der, Joosten, M.H.A.J., Jones,

- J.D.G., and Wit, P.J.G.M. de (2005). Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* 308, 1783–1786.
- Röpenack, E. von, Parr, A., and Schulze-Lefert, P. (1998). Structural Analyses and Dynamics of Soluble and Cell Wall-bound Phenolics in a Broad Spectrum Resistance to the Powdery Mildew Fungus in Barley. *J. Biol. Chem.* 273, 9013–9022.
- Rose, J.K.C., Ham, K.-S., Darvill, A.G., and Albersheim, P. (2002). Molecular Cloning and Characterization of Glucanase Inhibitor Proteins. *Plant Cell* 14, 1329–1345.
- Rowe, H.C., Walley, J.W., Corwin, J., Chan, E.K.-F., Dehesh, K., and Kliebenstein, D.J. (2010). Deficiencies in Jasmonate-Mediated Plant Defense Reveal Quantitative Variation in Botrytis cinerea Pathogenesis. *PLoS Pathog.* 6.
- Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., and Molina, A. (2010). Tryptophan-derived secondary metabolites in Arabidopsis thaliana confer non-host resistance to necrotrophic Plectosphaerella cucumerina fungi. *Plant J.* 63, 115–127.
- Sawyer, D.T., Gibian, M.J., Morrison, M.M., and Seo, E.T. (1978). On the chemical reactivity of superoxide ion. *J. Am. Chem. Soc.* 100, 627–628.
- Schlaeppli, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A., and Mauch, F. (2010). Disease resistance of Arabidopsis to Phytophthora brassicae is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *Plant J.* 62, 840–851.
- Schmidt, A. (1998). Hydroxyzimtsäureamide in Zellkulturen von Kartoffel: Isolierung und Charakterisierung eines THT cDNA-Klons aus Solanum tuberosum. Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D., and Rosahl, S. (1999). Cloning and Expression of a Potato cDNA Encoding Hydroxycinnamoyl-CoA:TyramineN-(Hydroxycinnamoyl)transferase. *J. Biol. Chem.* 274, 4273–4280.
- Schöber-Butin, B. (2001). Die Kraut- und Braunfäule der Kartoffel und ihr Erreger Phytophthora infestans (Mont.) de Bary = Late blight of the potato and its causal agent Phytophthora infestans (Mont.) de Bary / Bärbel Schöber-Butin. Hrsg. von der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Berlin und Braunschweig (Berlin: **Bahn**).
- Schulze-Lefert, P. (2004). Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 377–383.
- Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R. (2011). A molecular evolutionary concept

- ing nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation. *Trends Plant Sci.* *16*, 117–125.
- Schumann, G.L., and D'Arcy, C.J. (2000). Late blight of potato and tomato. *Plant Health Instr.*
- Schwessinger, B., and Zipfel, C. (2008). News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *11*, 389–395.
- Serra, O., Hohn, C., Franke, R., Prat, S., Molinas, M., and Figueras, M. (2010). A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm. *Plant J.* *62*, 277–290.
- Sofrono, M., Wang, B., Aryal, B., Garcion, C., Abou-Mansour, E., Heck, S., Geisler, M., Mauch, F., Nawrath, C., and Mettraux, J.-P. (2013). Export of Salicylic Acid from the Chloroplast Requires the Multidrug and Toxin Extrusion-Like Transporter EDS51[W][OPEN]. *Plant Physiol.* *162*, 1815–1821.
- Shan, L., He, P., and Sheen, J. (2007). Endless Hide-and-Seek: Dynamic Co-evolution in Plant-Bacterium Warfare. *J. Integr. Plant Biol.* *49*, 105–111.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P.P., Khanna, P.K., and Arora, S. (2012). Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *167*, 2225–2233.
- Shoji, T. (2014). Chapter Six - ATP-Binding Cassette and Multidrug and Toxic Compound Extrusion Transporters in Plants: A Common Theme Among Diverse Detoxification Mechanisms. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, K.W. Jeon, ed. (Academic Press), pp. 303–346.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B., and Mauch, F. (2003). Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: β -aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection. *Mol. Plant Pathol.* *4*, 237–248.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., Hoorn, R.A.L. van der, and Kamoun, S. (2009). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 1654–1659.
- Song, X.J., Kuroha, T., Ayano, M., Furuta, T., Nagai, K., Komeda, N., Segami, S., Miura, K., Ogawa, D., Kamura, T., et al. (2015). Rare allele of a previously unidentified

- histone H4 acetyltransferase enhances grain weight, yield, and plant biomass in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 76–81.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* *98*, 503–517.
- Srivastava, P., Khandokar, Y.B., Swarbrick, C.M.D., Roman, N., Himiari, Z., Sarker, S., Raidal, S.R., and Forwood, J.K. (2014). Structural Characterization of a Gcn5-Related N-Acetyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE* *9*, e102348.
- Srivenugopal, K.S., and Adiga, P.R. (1981). Enzymic conversion of agmatine to putrescine in *Lathyrus sativus* seedlings. Purification and properties of a multifunctional enzyme (putrescine synthase). *J. Biol. Chem.* *256*, 9532–9541.
- Staiger, D., and Brown, J.W.S. (2013). Alternative Splicing at the Intersection of Biological Timing, Development, and Stress Responses. *Plant Cell Online* *25*, 1138–1140.
- Steel, C.C., and Drysdale, R.B. (1988). Electrolyte leakage from plant and fungal tissues and disruption of liposome membranes by α -tomatine. *Phytochemistry* *27*, 1025–1030.
- Steffens, J.C. (2000). Acyltransferases in Protease's Clothing. *Plant Cell Online* *12*, 1253–1255.
- Stein, M., Dittgen, J., Sánchez-Rodríguez, C., Hou, B.-H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V., and Somerville, S. (2006). Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP Binding Cassette Transporter, Contributes to Nonhost Resistance to Inappropriate Pathogens That Enter by Direct Penetration. *Plant Cell Online* *18*, 731–746.
- Stockhaus, J., Eckes, P., Rocha-Sosa, M., Schell, J., and Willmitzer, L. (1987). Analysis of cis-active sequences involved in the leaf-specific expression of a potato gene in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 7943–7947.
- Stockhaus, J., Schell, J., and Willmitzer, L. (1989). Identification of enhancer elements in the upstream region of the nuclear photosynthetic gene ST-LS1. *Plant Cell Online* *1*, 805–813.
- Stoessl, A. (1967). The antifungal factors in barley. IV. Isolation, structure, and synthesis of the hordatines. *Can. J. Chem.* *45*, 1745–1760.
- Stotz, H.U., Sawada, Y., Shimada, Y., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Krischke, M., Brown, P.D., Saito, K., and Kamiya, Y. (2011). Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant J.* *67*, 81–93.

- St-Pierre, B., and Luca, V.D. (2000). Chapter Nine Evolution of acyltransferase genes: Origin and diversification for the BAHD superfamily of acyltransferases involved in secondary metabolism. In *Recent Advances in Phytochemistry*, R.I. John T. Romeo Luc Varin and Vincenzo De Luca, ed. (Elsevier), pp. 285–315.
- Sun, X., Gilroy, E.M., Chini, A., Nurnberg, P.L., Hein, I., Lacomme, C., Birch, P.R.J., Hussain, A., Yun, B.-W., and Loake, G.J. (2011). ADS1 encodes a MATE-transporter that negatively regulates plant disease resistance. *New Phytol.* *192*, 471–482.
- Sutherland, M.W. (1991). The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *39*, 79–93.
- Takano, A., Kakehi, J.-I., and Takahashi, T. (2012). Thermospermine is Not a Minor Polyamine in the Plant Kingdom. *Plant Cell Physiol.* *53*, 606–616.
- Takken, F.L.W., and Tameling, W.I.L. (2009). To Nibble at Plant Resistance Proteins. *Science* *324*, 744–746.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 351–357.
- Tian, M., Huitema, E., Cunha, L. da, Torto-Alalibo, T., and Kamoun, S. (2004). A Kazal-like Extracellular Serine Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Targets the Tomato Pathogenesis-related Protease P69B. *J. Biol. Chem.* *279*, 26370–26377.
- Tian, M., Benedetti, B., and Kamoun, S. (2005). A Second Kazal-Like Protease Inhibitor from *Phytophthora infestans* Inhibits and Interacts with the Apoplastic Pathogenesis-Related Protease P69B of Tomato. *Plant Physiol.* *138*, 1785–1793.
- Tian, M., Win, J., Song, J., Hoorn, R. van der, Knaap, E. van der, and Kamoun, S. (2007). A *Phytophthora infestans* Cystatin-Like Protein Targets a Novel Tomato Papain-Like Apoplastic Protease. *Plant Physiol.* *143*, 364–377.
- Tripathy, B.C., and Oelmüller, R. (2012). Reactive oxygen species generation and signaling in plants. *Plant Signal. Behav.* *7*, 1621–1633.
- Tuominen, L.K., Johnson, V.E., and Tsai, C.-J. (2011). Differential phylogenetic expansions in BAHD acyltransferases across five angiosperm taxa and evidence of divergent expression among *Populus* paralogues. *BMC Genomics* *12*, 236.
- Underwood, W., and Somerville, S.C. (2013). Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the Arabidopsis PEN3 transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201218701.

- Van den Ackerveken, G., Marois, E., and Bonas, U. (1996). Recognition of the Bacterial Avirulence Protein AvrBs3 Occurs inside the Host Plant. *Cell* 87, 1307–1316.
- VanEtten, H.D., Mansfield, J.W., Bailey, J.A., and Farmer, E.E. (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus “Phytoanticipins.” *Plant Cell* 6, 1191–1192.
- Vetting, M.W., S. de Carvalho, L.P., Yu, M., Hegde, S.S., Magnet, S., Roderick, S.L., and Blanchard, J.S. (2005). Structure and functions of the GNAT superfamily of acetyltransferases. *Arch. Biochem. Biophys.* 433, 212–226.
- Vikram, A., Prithiviraj, B., Hamzehzarghani, H., and Kushalappa, A. (2004). Volatile metabolite profiling to discriminate diseases of McIntosh apple inoculated with fungal pathogens. *J. Sci. Food Agric.* 84, 1333–1340.
- Voigt, C.A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Plant-Microbe Interact.* 5, 168.
- Walker, A.M., Hayes, R.P., Youn, B., Vermerris, W., Sattler, S.E., and Kang, C. (2013). Elucidation of the Structure and Reaction Mechanism of Sorghum Hydroxycinnamoyltransferase and Its Structural Relationship to Other Coenzyme A-Dependent Transferases and Synthases. *Plant Physiol.* 162, 640–651.
- Wang, X., Boevink, P., McLellan, H., Armstrong, M., Bukharova, T., Qin, Z., and Birch, P.R.J. (2015). A Host KH RNA-Binding Protein Is a Susceptibility Factor Targeted by an RXLR Effector to Promote Late Blight Disease. *Mol. Plant*.
- Weber, E., Engler, C., Gruetzner, R., Werner, S., and Marillonnet, S. (2011). A Modular Cloning System for Standardized Assembly of Multigene Constructs. *PLoS ONE* 6, e16765.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: Minimal Machinery for Membrane Fusion. *Cell* 92, 759–772.
- Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis: A Laboratory Manual* (CSHL Press).
- Werner, S., Sugui, J.A., Steinberg, G., and Deising, H.B. (2007). A Chitin Synthase with a Myosin-Like Motor Domain Is Essential for Hyphal Growth, Appressorium Differentiation, and Pathogenicity of the Maize Anthracnose Fungus *Colletotrichum graminicola*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 20, 1555–1567.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M.,

- Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al. (2007). A tation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450, 115–118.
- Wick, P., Gansel, X., Oulevey, C., Page, V., Studer, I., Dürst, M., and Sticher, L. (2003). The Expression of the t-SNARE AtSNAP33 Is Induced by Pathogens and Mechanical Stimulation. *Plant Physiol.* 132, 343–351.
- Willmann, R., and Nürnberger, T. (2012). How plant lysin motif receptors get activated: lessons learned from structural biology. *Sci. Signal.* 5, pe28.
- Yaeno, T., and Shirasu, K. (2013). The RXLR motif of oomycete effectors is not a sufficient element for binding to phosphatidylinositol monophosphates. *Plant Signal. Behav.* 8, e23865.
- Yamasaki, K., Motomura, Y., Yagi, Y., Nomura, H., Kikuchi, S., Nakai, M., and Shiina, T. (2013). Chloroplast envelope localization of EDS5, an essential factor for salicylic acid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 8, e23603.
- Yoo, S.-D., Cho, Y.-H., and Sheen, J. (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* 2, 1565–1572.
- Yoshida, K., Schuenemann, V.J., Cano, L.M., Pais, M., Mishra, B., Sharma, R., Lanz, C., Martin, F.N., Kamoun, S., Krause, J., et al. (2013). The rise and fall of the *Phytophthora infestans* lineage that triggered the Irish potato famine. *eLife* 2, e00731.
- Yu, F., and Luca, V.D. (2013). ATP-binding cassette transporter controls leaf surface secretion of anticancer drug components in *Catharanthus roseus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201307504.
- Zeiger, E., Armond, P., and Melis, A. (1981). Fluorescence Properties of Guard Cell Chloroplasts. *Plant Physiol.* 67, 17–20.
- Zellner, M., and Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) (2013). Kartoffelkrankheiten.
- Zhang, J., Lu, H., Li, X., Li, Y., Cui, H., Wen, C.-K., Tang, X., Su, Z., and Zhou, J.-M. (2010). Effector-Triggered and Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity Differentially Contribute to Basal Resistance to *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 23, 940–948.
- Zhang, W., Fraiture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F.F.G., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A.A., and Brunner, F. (2013a). *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE

- PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi[W][OPEN]. *Plant Cell* 25, 4227–4241.
- Zhang, X., Gou, M., and Liu, C.-J. (2013b). Arabidopsis Kelch Repeat F-Box Proteins Regulate Phenylpropanoid Biosynthesis via Controlling the Turnover of Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Cell Online* tpc.113.119644.
- Zheng, X., McLellan, H., Fraiture, M., Liu, X., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Chen, Y., Kandel, K., Sessa, G., Birch, P.R.J., et al. (2014). Functionally Redundant RXLR Effectors from *Phytophthora infestans* Act at Different Steps to Suppress Early flg22-Triggered Immunity. *PLoS Pathog.* 10.
- Zhu, W., Wei, W., Fu, Y., Cheng, J., Xie, J., Li, G., Yi, X., Kang, Z., Dickman, M.B., and Jiang, D. (2013). A Secretory Protein of Necrotrophic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* That Suppresses Host Resistance. *PLoS ONE* 8, e53901.
- Zipfel, C. (2014). Plant pattern-recognition receptors. *Trends Immunol.* 35, 345–351.
- Zook, M.N., Rush, J.S., and Kuć, J.A. (1987). A Role for Ca²⁺ in the Elicitation of Rishitin and Lubimin Accumulation in Potato Tuber Tissue. *Plant Physiol.* 84, 520–525.

7. Anhang

7.1. Gensequenzen

7.1.1. AtACT1 – At5g61160 cDNA

ATGGCGTTAAAGGTGATCAAGATCTCCCGAGTCAGCCCTGCAACCGCCTCCGTGACCCG
 CTCATTGTCCCCTCTCGTTCTTTGATTTACAGTGGCTTAAACTCAACCTACCGAGCAA
 GTCTTCTTTTACAACTCACCGAATCATCATCTCGCGACGTTTTCTACTCCTCCATC
 CTCCCAAGCTCGAGCGATCTCTTTCCTCATCTCACTCACTTTTCGCCTATTCACGGGT
 CACCTTAAGTGGGATTACAAGATCCAAAGCCGATTTAGTTGTTCTCTCAGGAGACACA
 CTCTCTCTCACAGTGGCTGAGACTGATGCGGATTTCTCACGTATCTCTGGCAGAGGGCTT
 CGTCCAGAGCTAGAGTTACGCCCTCTAATACCCGAGCTACCGATTTATTCTGACTCGGGG
 GCTGTTGTATCTCTGCAAGTCACTTTGTTCCCGAAACAAGGCTTCTGCATTGGAACCACA
 GCCCACCATGTGCTCTTGGACGGCAAAACGGCTGAAAAATTTAACAAAGCATGGGCTCAC
 ACTTGTAACATGGCACCATAACGAAAATTCTACCAACGGTTTTAGATCGTTCTGTGCGTC
 AATGTTCCAGCCGGACTTGAACAAAAGATGCTCGAACTTCTGCCGTATCTTACGGAGGAC
 GACAAAGAGAACGGAAGAACCCTAAAGCTACCTCCAGTCAAAGAGATTAACGCTAAAGAC
 AACGTCCTCCGAATCACCATCGAGATAAGTCTGAAAACATTGAGAACTCAAGGAGAGA
 GCCAAGAAAGAGTCAACACGCGCTGAGCTTCACTTGTCAACGTTTCGTAGTCACGTTTCGCC
 CATGTGTGGACATGCATGGTGAAGGCACGTAGTGGTGACCCAAACCGACCGGTTTCGTTTC
 ATGTACGCTGCTGATTTTAGGAACCGGTTAGAACCACCAGTCCCTGTGACATACTTCGGG
 ACTTGTGTCTTAGCCATGGATTTCTATAAATACAAAGCTAAGGAGTTTATGGGAGAAGAT
 GGATTTGTCAACACCGTCGAGATTCTCAGTGATTCGGTCAAACGTTTGGCTTCACAAGGG
 GTAGAGTCAACTTGGAAAGTGTATGAGGAAGGAACAAAGACAATGAAATGGGGTACACAG
 TTGTTGGTCGTAAACGGGTCGAACCAGATTGGGATGTACGAAACGGACTTCGGGTGGGGA
 AGACCCATTCACACTGAGACAATGTCTATCTACAAGAACGATGAGTTCTCTATGTCCAAG
 AGGAGAGATGGTATCGGTGGCGTCGAGATTGGCATCTCTTTGAAGAAACTTGAGATGGAT
 ACTTTTCTGTCTTTATTTTACAAATGGATTGGAACTGA

7.1.2. AtMATE – At3g23550 cDNA

ATGGCTGATCCCACGTCCAAAGATGACCATGATGGTGAAGGAGGAAGAGACAAATCATCA
 ACTTTTGTTCAAAACCTTATTGACGTTGAAGAAGCAAAGACTCAAATCATTTACTCTCTA
 CCAATGATATTCACCAATCTTTTCTATTATTGTATCCCTTTAACCTCTGTGATGTTTCGCT
 TCTCAACTCGGCCAACTCGAGCTCGCCGGTGCTACCCTAGCCAATTCTTGGGCTACCGTC
 ACCGGTTTTGCCTTCATGACAGGGTTAAGTGGAGCACTTGAACATTTGTGTGGACAAGGC
 TTTGGTGCAAAAAGCTATAGAATGTTGGGGATTCATCTACAATCATCTGCATTGTTTCA
 TTAGTCTTCACCATTCTCATCACCATCTTATGGTTCTTCACGGAATCGGTTTTCTTACTT
 CTTAGACAAGATCCTAGCATCTCAAACAAGCTGCACTCTACATGAAGTACCTAGCTCCC
 GGTTTACTCGCTTACGGGTTCTTACAAAACATTTTGAAGTTTTGCCAAACACAATGCATC
 GTTACTCCGCTAGTTTTATTCTCGTTTCTTCCCTTGGTGATTAATATCGGTACTACATAT
 GCTCTGGTGCATTTAGCTGGGCTTGGATTTCATCGGTGCTCCAATAGCTACATCTATTTCA

TTGTGGATAGCTTTTCGTTTCTCTCGGGTTTTATGTGATTTGTTTCGGACAAGTTTAAGGAA
 ACATGGACCGGATTTTCGATGGAATCATTTCATCATGTAGTACTAAACTTGACATTAAGC
 ATCCCTTCTGCTGCTATGGTATGTTTGGAAATATTGGGCGTTTCGAGATTCTAGTGTCTTA
 GCAGGATTGATGCGAAATCCGAAATCACCACCTCTTTGGTAGCTATATGCGTCAACACG
 GAATCAATAAGTTACATGTTAACATGCGGACTTAGTGCAGCTACAAGTACGCGTGTGTCC
 AACGAACTTGGAGCAGGAAATGTAAAAGGCGCAAAGAAGGCGACTTCGGTCTCCGTTAAG
 TTGTCTTTAGTTCTAGCTCTCGGTGTAGTCATTGCTATACTTGTAGGTCATGATGCCTGG
 GTTGGTTTTATTACAGCAATAGCCATGTGATTAAGAGGGATTTGCATCACTAAGGTTTTTC
 CTTGCTGCATCTATAACACTTGATTCAATCCAAGGTGTTTTATCAGGAGTTGCGAGAGGA
 TGCGGATGGCAGCGGTTAGCCACGGTTATAAATTTGGGAACATTTCTACTTAATCGGAATG
 CCTATTTTCAGTCCTTTGTGGTTTTCAAGTTGAAGCTTCATGCCAAGGGTTTATGGATCGGT
 CTGATATGTGGGATGTTTTGCCAGTCCGCATCTCTTTTGTCTTATGACAATTTTCCGGAAG
 TGGACAAAGCTGACTGCTGCCACTGTCTGA

7.1.3. AtMATEgenomisch – At3g23550 genomische DNA

GTCTAGCTTCTCCTACTCTTCGCCAGATCCAAATTCCTTGAAGATACAATGGCTGATCCC
 ACGTCCAAAGATGACCATGATGGTGAAGGAGGAAGAGACAAATCATCAACTTTTTGTTCAA
 AAAGTTATTGACGTTGAAGAAGCAAAGACTCAAATCATTACTCTCTACCAATGATATTC
 ACCAATCTTTTCTATTATTGTATCCCTTTAACCTCTGTGATGTTGCTTCTCAACTCGGC
 CAACTCGAGCTCGCCGGTGTACCTAGCCAATTCCTTGGGCTACCGTCACCGGTTTTGCC
 TTCATGGTACTATTATCTCCTTATCCTCCAACCTTCATTTGCATCCAACATTTTCTTTTG
 CTTACTACATGCATAAGTTACTAAAGATAGGCTAATATATTATATATAAAAAAGTTAT
 AACTCAAATTTGGATTCAACTTTATCCATGCATTTCTCTAAATTTGGTTAATATTGTTT
 CTTTTTTGTTTTGCTATTTAAGGAGATCTAAAAGGGACAAGTGGATGGGCTTATGCGTTT
 TGTCTAAATGTTTTCTTAACCAGAACGTTTCTATGCATTATATGGGTATTTGTTTCTA
 TAAAGACATTTAATGTCTTGTAAATTTTTCAGACAGGGTTAAGTGGAGCACTTGAGACATT
 GTGTGGACAAGGCTTTGGTGCAAAAAGCTATAGAATGTTGGGGATTTCATCTACAATCATC
 TTGCATTGTTTCATTAGTCTTCACCATTCTCATCACCATCTTATGGTTCCTTCACGGAATC
 GGTTTTCTTACTTCTTAGACAAGATCCTAGCATCTCAAAAACAAGCTGCACTCTACATGAA
 GTACCTAGCTCCCGGTTTACTCGCTTACGGGTTCTTACAAAACATTTTGAGATTTTGCCA
 AACACAATGCATCGTTACTCCGCTAGTTTTATTCTCGTTTCTTCCCTTGGTGATTAATAT
 CGGTACTACATATGCTCTGGTGCATTTAGCTGGGCTTGGATTCATCGGTGCTCCAATAGC
 TACATCTATTTTCATTGTGGATAGCTTTTCGTTTCTCTCGGGTTTTATGTGATTTGTTGGA
 CAAGTTTAAGGAAACATGGACCGGATTTTCGATGGAATCATTTCATCATGTAGTACTAAA
 CTTGACATTAAGCATCCCTTCTGCTGCTATGGTATGGTAAGTCAGTTTCATAATACTTTA
 TTGACCAAAATGTGTAGCTTAGTGGTTTTGTGTTAGTGTGCATCATTGTGTATTTGTGATAC
 ACTCAACTCTATATGCTTATTGAAGTTTAAGAACTATATTGTTGCAACAGTTTGGAAATA
 TTGGGCGTTTCGAGATTCTAGTGTCTTAGCAGGATTGATGCGAAATCCGAAATCACCAC
 TTCTTTGGTAGCTATATGGTAAGTTTTTTAATATCACTATTATAGTTAATTAATTTACAT
 CAACAAAGTTGCTCATTGTGTGTAATGTTAAAATAATTCAGCGTCAACACGGAATCAATA
 AGTTACATGTTAACATGCGGACTTAGTGCAGCTACAAGGTTAGCTAAACTCATCAATCTT

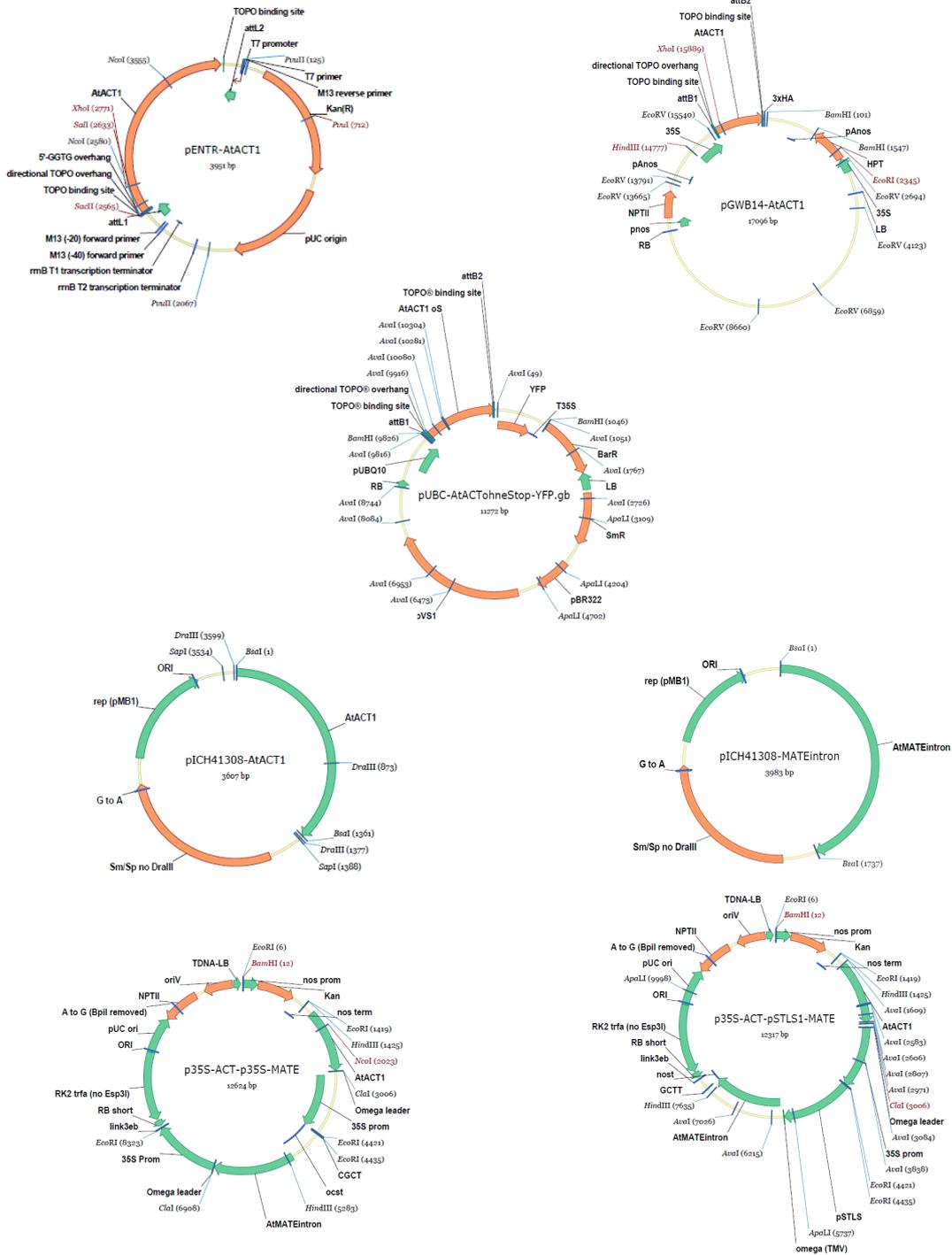
TTCAAAATACTTTTGCATTCCCTCTCATAATTGTGTATTAAAATTA AAAATCGAAAAC TTT
 GCAGTACGCGTGTGTCCAACGAACTTGGAGCAGGAAATGTAAAAGGCGCAAAGAAGGCGA
 CTTCCGGTCTCCGTTAAGTTGTCTTTAGTTCTAGCTCTCGGTGTAGTCATTGCTATACTTG
 TAGGTCATGATGCCTGGGTTGGTTTATTAGCAATAGCCATGTGATTAAAAGAGGGATTG
 CATCACTAAGGTTTTTCCCTTGCTGCATCTATAACACTTGATTCAATCCAAGGTGTTTTAT
 CAGGTATAAAGATCCAAGAAAATCTTCTTCTTTCTTGA ACTATCAAGCGCGAAGAACTC
 ATTTCTTTAATGTATTTTACAGGAGTTGCGAGAGGATGCGGATGGCAGCGGTTAGCCACG
 GTTATAAATTTGGGAACATTCTACTTAATCGGAATGCCTATTTTCAGTCCTTTGTGGTTTC
 AAGTTGAAGCTTCATGCCAAGGTGAATGTTAGACTCTCTTATGAAACTTTTAAAAGATTT
 TTGTTGTTGCTAAACTGTGTTTGATTCAATATTTTGATATTGTTTTTGATGAAAACAGGG
 TTTATGGATCGGTCTGATATGTGGGATGTTTTGCCAGTCCGCATCTCTTTGCTTATGAC
 AATTTTCCGGAAGTGGACAAAGCTGACTGCTGCCACTGTCTGAAACCTATAGTTCAATTT
 TCCGATTATTATAGGAAGAAGATTGTTGTTGTGGACGAGATCAATGTAAAGATTGTGTCC
 AAGAAAAGACATTATTAAGTGA ACTTTTAGGAATTATTGAAATCAACATATTTTTGTAAAC
 AAAGATGATAAAGAGCACTTGAACG

7.1.4. AtMATEintron – At3g23550 cDNA mit erstem Intron

ATGGCTGATCCCACGTCCAAAGATGACCATGATGGTGAAGGAGGAAGAGACAAATCATCA
 ACTTTTGTTCAAAAC TTTATTGACGTTGAAGAAGCAAAGACTCAAATCATTTACTCTCTA
 CCAATGATATTCACCAATCTTTTCTATTATTGTATCCCTTTAACCTCTGTGATGTTTCGCT
 TCTCAACTCGGCCAACTCGAGCTCGCCGGTGTACCC TAGCCAATCTTGGGCTACCGTC
 ACCGGTTTTGCCTTCATGGTACTATTATCTCCTTATCCTCCAACCTTCATTTGCATCCAA
 CATTTTCTTTTGCTTACTACATGCATAAGTTACTAAAGATAGGCTAATATATATATATA
 TAAAAGGTTATACACTCAAATTTGGATTCAACTTTATCCATGCATTTCTCTAAAATTTGG
 TTAATATTGTTTTCATTTTTGTTTTGCTATTTAAGGAGATCTAAAAGGGACAAGTGGATGG
 GCTTATGCGTTTTGTCTAAATGTTTTCTTAAACCAGAACGTTTCTATGCATTATATGGG
 TATTTGTTTCTATAAAGACATTTAATGTCTTGTAAATTTTCAGACAGGGTTAAGTGGAGC
 ACTTGAGACATTGTGTGGACAAGGCTTTGGTGCAAAAAGCTATAGAATGTTGGGGATTCA
 TCTACAATCATCTTGCATTGTTTCATTAGTATTCACCATTCTCATCACCATCTTATGGTT
 CTTACGGAATCGGTTTTCTTACTTCTTAGACAAGATCCTAGCATCTCAAAAACAAGCTGC
 ACTCTACATGAAGTACCTAGCTCCCGTTTTACTCGCTTACGGGTTCTTACAAAACATTTT
 GAGATTTTGCCAAACACAATGCATCGTTACTCCGCTAGTTTTATTCTCGTTTCTTCCCTT
 GGTGATTAATATCGGTACTACATATGCTCTGGTGCATTTAGCTGGGCTTGGATTATCGG
 TGCTCCAATAGCTACATCTATTTCAATGTGGATAGCTTTCGTTTCTCTCGGGTTTTATGT
 GATTTGTTCCGACAAGTTAAGGAAACATGGACCGGATTTTCGATGGAATCATTTCATCA
 TGTAGTACTAACTTGACATTAAGCATCCCTTCTGCTGCTATGGTATGGTAAGTCAGTTT
 CATAATACTTTTATTGACCAAAATGTGTAGCTTAGTGGTTTTGTGTTAGTGTATCATTTGTG
 TATTTGTGATACACTCAACTCTATATGCTTATTGAAGTTTAAGAACTATATTGTTGCAA
 CAGTTTGGAAATATTGGGCGTTTCGAGATTCTAGTGTCTTAGCAGGATTGATGCGAAAATCC
 GGAAATCACCCTTCTTTGGTAGCTATATGGTAAGTTTTTTAATATCACTATTATAGTTA
 ATTAATTTACATCAACAAAGTTGCTCATTGTGTGTAATGTTAAAATAATTCAGCGTCAAC
 ACGGAATCAATAAGTTACATGTTAACATGCGGACTTAGTGCAGCTACAAGGTTAGCTAAA

CTCATCAATCTTTTCAAATACTTTTGCATTCCCTCTCATAATTGTGTATTAAAATTAAAA
ATCGAAAACCTTTCAGTACGCGTGTGTCCAACGAACTTGGAGCAGGAAATGTAAAAGGCG
CAAAGAAGGCGACTTCGGTATCCGTTAAGTTGTCTTTAGTTCTAGCTCTCGGTGTAGTCA
TTGCTATACTTGTAGGTCATGATGCCTGGGTTGGTTTATTCAGCAATAGCCATGTGATTA
AAGAGGGATTTGCATCACTAAGGTTTTTCCCTTGCTGCATCTATAACACTTGATTCAATCC
AAGGTGTTTTATCAGGTATAAAGATCCAAGAAAATCTTCTTCTTTCTTGAACATCAAGC
GCGAAGAACTCATTTCCTTTAATGTATTTTACAGGAGTTGCGAGAGGATGCGGATGGCAG
CGGTTAGCCACGGTTATAAATTTGGGAACATTCTACTTAATCGGAATGCCTATTTTCAGTC
CTTTGTGGTTTCAAGTTGAAGCTTCATGCCAAGGTGAATGTTAGACTCTCTTATGAAACT
TTTAAAAGATTTTTGTTGTTGCTAAACTGTGTTTGATTCAATTTTTGATATTGTTTTTG
ATGAAAACAGGGTTTATGGATCGGTCTGATATGTGGGATGTTTTGCCAGTCCGCATCTCT
TTTGCTTATGACAATTTCCGGAAGTGGACAAAGCTGACTGCTGCCACTGTCTGA

7.2. Vektorkarten



7.3. Primer

Tabelle 8 Primer

| Primer | Oligonukleotidsequenz (5'→3') | Verwendung | PCR-Produkt (bp) | T _A (°C) |
|-----------------|-------------------------------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| At5g61160_5_bex | CACCATGGCGTTAAAGGTGATCAAG | pENTR-Klonierung, | 1375 bp | 56 |
| At5g61160_3 | GATTGGAAACTGAAAACGTACGGTC | | (genom. u. CDS) | |
| MATE_5 | CACCATGGCTGATCCCACGTCC | pENTR-Klonierung | 2219 bp (genom.) | 59 |
| MATE_3 | GCTGACTGCTGCCACTGTCTGA | | 1410 bp (CDS) | |
| AtACT F1_5 | TTTGAAGACAAAATGGCGTTAAAGGTGATCAA | pICH41308-Golden | 147 bp | 58 |
| AtACT F1_3 | TTTGAAGACAAACTTGCTCGGTAGGGTTGAG | Gate-Klonierung | (genom. u. CDS) | |
| AtACT F2_5 | TTTGAAGACAAAAGTATTCITTTACAAACTCACC | pICH41308-Golden | 1103 bp | 58 |
| AtACT F2_3 | TTTGAAGACAACITCCCCACCCGAAGTCCGTTTCG | Gate-Klonierung | (genom. u. CDS) | |
| AtACT F3_5 | TTTGAAGACAAGAAGGCCATTACACTGAGACAATG | pICH41308-Golden | 187 bp | 60 |
| AtACT F3_3 | TTTGAAGACAAAAGCTCAGTTTCCAATCCATTTG | Gate-Klonierung | (genom. u. CDS) | |
| AtMATE F1_5 | TTTGAAGACAAAATGGCTGATCCCACGTCCAA | pICH41308-Golden | 388 bp (CDS) | 58 |
| AtMATE F1_3 | TTTGAAGACAAACTAATGAAACAATGCAAGATGA | Gate-Klonierung | 713 bp (genom.) | |
| AtMATE F2_5 | TTTGAAGACAATAGTATTCACCATTTCTCATCACC | pICH41308-Golden | 669 bp (CDS) | 60 |
| AtMATE F2_3 | TTTGAAGACAATACCGAAGTCGCCTTCTTTGC | Gate-Klonierung | 976 bp (genom.) | |
| AtMATE F3_5 | TTTGAAGACAAGGTATCCGTTAAGTTGTCTTTAG | pICH41308-Golden | 429 bp (CDS) | 60 |

| | | | |
|-----------------|-------------------------------------|---|---|
| AtMATE F3_3 | TTTGAAGACAAAAGCTCAGACAGTGGCAGCAGTCA | Gate-Klonierung | 605 bp (genom.) |
| M13 uni (-21) | TGTAAAACGACGGCCA | Sequenzierung | |
| M13 rev (-29) | CGTCATAGCTGTTTCCTG | pENTR | |
| pICH41308_1F | CAATACGCAAACCGCCTCTC | Sequenzierung | |
| pICH41308_690F | CTTCACCATTCATCACC | pICH41308-AtMATEgenomisch | |
| pICH41308_1468F | CGGACTTAGTGCAGCTACAAG | | |
| pICH41308_1R | GGTTAATGTCATGATAATAATG | | |
| pICH41308_1F | CAATACGCAAACCGCCTCTC | Sequenzierung | |
| pICH41308_1R | GGTTAATGTCATGATAATAATG | pICH41308-AtACT pICH41308-AtMATEintron pICH41308-AtMATEcDNA | |
| pUNI51 F | CTGTTGGTGTGTCTATTAATCG | Sequenzierung | |
| PUNI51 R | GTGCCTTCTAGTTGCCA | Klon U18345 (tair-Stock: 3986246) Vektor: pUNI51 | |
| PEN2B-F | GCATCTCTCAATCACGCATT | Genotypisierung <i>pen2</i> | 1250 bp (genom.) 58 |
| PEN2B-R | TCCCTTTTGCCATCTGTTTT | CAPS Marker, Verdau: AlwI | Nach Restriktion: WT: 500 bp, 300 bp, 250 bp <i>pen2</i> : 800 bp, 250 bp |

| | | | |
|-----------------|---------------------------|---|--|
| LBb1.3_salk | ATTTTGCCGATTTCGGAAC | Genotypisierung | WT: 900 bp; |
| LBb1_salk | GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT | linker T-DNA spez. <i>Border</i> -Primer bei SALK- Linien + Gen- spezifischer Primer | Heterozygot: 900 bp + ca. 400 bp; Homozygot: ca. 400 bp |
| Neu_RP_MATE | GAAACCACAAAGGACTGAAATAGG | Genotypisierung SALK- 062231 rechter Genspezifischer Primer für <i>AtMATE</i> | (siehe T-DNA 54 spezifische <i>Border</i> - Primer) |
| Neu_LP_MATE | TGTGGATAGCTTTCGTTTCTCTC | Genotypisierung SALK- 062231 linker Genspezifischer Primer für <i>AtMATE</i> | (siehe T-DNA spezifische <i>Border</i> - Primer) |
| At5g61160_5_bex | CACCATGGCGTTAAAGGTGATCAAG | Genotypisierung SALK_097380 linker Genspezifischer Primer für <i>AtACT1</i> | (siehe T-DNA 56 spezifische <i>Border</i> - Primer) |
| At5g61160_3 | GATTGGAAACTGAAAACGTACGGTC | Genotypisierung SALK_097380 rechter Genspezifischer | (siehe T-DNA spezifische <i>Border</i> - Primer) |

| | | Primer für <i>AtACT</i> | | |
|-----------------|------------------------------|---|--|----|
| GABI_T-DNA_PCR2 | ATAATAACGCTGCGGACATCTACATTTT | Genotypisierung GK_411D06 spez. <i>Border</i> -Primer bei GABI-KAT-Linien + Gen-spezifischer Primer | BP+RP: WT: keine Bande; Mutante: ca. 700 bp | 49 |
| GK_411D06LP | AGATTTTGCCAAACACAATGC | Genotypisierung | LP+RP: | 49 |
| GK_411D06RP | AACATTCACCTTGGCATGAAG | GK_411D06 linker und rechter genspezifischer Primer <i>AtMATE</i> | WT: 1183 bp Mutante: ca. 750 bp | |

7.4. Sonden für *real time*-PCR

Tabelle 9 Sonden

| Sonde | Nukleotidsequenz (5'→3') | Verwendung | PCR-Produkt (bp) | T _A (°C) |
|---------------|--------------------------|--|------------------|---------------------|
| AtACT1 #131_F | CGCTGCTGATTTTAGGAACC | qRT-PCR | zur 62 | 59(|
| AtACT1 #131_R | CACAAGTCCCGAAGTATGTCAC | Bestimmung <i>AtACT1</i> -Transkript ROCHE-Sonde Library#131, cat.no. 0469 4155001 | von | TM) |

| | | | | |
|----------------|---------------------------|---|----|----|
| AtMATE # 117_F | C TTCTCAACTCGGCCAACTC | qRT-PCR zur | 98 | 54 |
| AtMATE #117_R | TGCTCCACTTAACCCTGTCA | Bestimmung von <i>AtMATE</i> -Transkript ROCHE-Sonde Library #117, cat.no. 0469351500 1 | | |
| PiO8-3-3 #4_F | CGTACGGCCAATGTAGTTCC | Relative Quantifizierung | 64 | 60 |
| PiO8-3-3 #4_R | TTTGCACAGTATCACGCAAGT | von <i>P. infestans</i> -Biomasse (qPCR) für ROCHE- Sonde Library-Nr. #4 cat. No. 04685016001 | | |
| StNOX #73_F | TCAATGCATAGGTATGAAGGAATC | Relative Quantifizierung | 86 | 60 |
| StNOX#73_R | TCTCTTCCTAGCTAGAGCATCAAAT | von <i>P. infestans</i> - Biomasse, interner NOX-Standard (qPCR) für ROCHE-Sonde Library-Nr. #73 (cat. No. 04688961001) | | |

7.5. Sonden für Northernblot- und Southernblot Analysen

Tabelle 10 Sonden für Northernblot- und Southernblot-Analysen

| Sonde | Nukleotidsequenz (5'→3') | Verwendung | Größe (bp) |
|---------------------------------|--|---|------------|
| AtACT1-cDNA für Southernblot | AGCTTGCATGCCTGCAGGTCCCCAGATTAGCCTTTTCAATTCAGAAAGAATGC TAACCACAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAGCAGGTCTCATCAAGACGATCTAC CCGAGCAATAATCTCCAGGAAATCAAATACCTTCCCAAGAAGGTTAAAGATGCA GTCAAAAGATTTCAGGACTAACTGCATCAAGAACACAGAGAAAGATATATTTCTC AAGATCAGAAGTACTATTCCAGTATGGACGATTCAAGGCTTGCTTCACAAACCA AGGCAAGTAATAGAGATTGGAGTCTCTAAAAAGGTAGTTCCTCACTGAATCAAAG GCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGAGGACCTAACAGAACTCGCCGTAAAGACT GGCGAACAGTTCATACAGAGTCTCTTACGACTCAATGACAAGAAGAAAATCTTC GTCAACATGGTGGAGCACGACACACTTGTCTACTCCAAAAATATCAAAGATACA GTCTCAGAAGACCAAAGGGCAATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCCGGA AACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTTATTGTGAAGATAGTG GAAAAGGAAGGTGGCTCCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAAGGCCATC GTTGAAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGG AGCATCGTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGCTTCAAAGCAAGTGGATTGA TGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCACAATCCCACTATCCTTCGCAA GACCCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGAACACGGGGGACT CTAGAGTTATCAACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGCGGCCGCCCTTC ACCATGGCGTTAAAGGTGATCAAGATCTCCGAGTCAGCCCTGCAACCGCCTCC GTCGACCCGCTCATTGTCCACTCTCGTTCTTTGATTTACAGTGGCTTAAACTC AACCTACCGAGCAAGTCTTCTTTTACAAACTCACCGAATCATCATCTCTCGCG ACGTTTTCTACTCCTCCATCCTCCCCAAGC | Sonde Southernblotanalyse nach Doppelverdau aus pGWB14- <i>AtACT1</i> - Plasmid-DNA | 1112 |
| <i>AtACT1</i> -cDNA | GATCCTATCCATATGACGTTCCAGATTACGCTGCTCAGTGCAGCGCTTAGAGCT | Sonde | für 1659 |

| | | |
|------------------|--|---|
| für Northernblot | CGAATTTCCCGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAGTTTCTTAAGATTGAATC CTGTTGCCGGTCTTGCGATGATTATCATATAATTTCTGTTGAATTACGTTAAGC ATGTAATAATTAACATGTAATGCATGACGTTATTTATGAGATGGGTTTTTATGA TTAGAGTCCCGCAATTATACATTTAATACGCGATAGAAAACAAAATATAGCGCG CAAAC TAGGATAAATTATCGCGCGGGTGTCTATGTTACTAGATCGGGAAT TAGCTTCATCAACGCAAGACATGCGCACGACCGTCTGACAGGAGAGGAATTTCC GACGAGCACAGAAAGGACTTGCTCTTGGACGTAGGCCTATTTCTCAGGCACATG TATCAAGTGTTCCGGACGTGGGTTTTTCGATGGTGTATCAGCCGCCCAACTGGG AGATGAGGAGGCTTTCTTGGGGGCAGTCAGCAGTTCATTTACAAGACAGAGG AACTTGTAAGGAGATGCACTGATTTATCTTGGCGCAAACCAGCAGGACGAATTA GTGGGAATAGCCCGCAATATCTAAGTTATGCCTGTCGGCATGAGCAGAACTT CCAATTCGAAACAGTTTGGAGAGGTTGTTTTGGGCATACCTTTTGTAGTCAG CCTCTCGATTGCTCATCGTCATTACACAGTACCGAAGTTTGATCGATCTAGTAA CATAGATGACACCGCGCGGATAATTTATCCTAGTTTGCGCGCTATATTTTGTT TTCTATCGCGTATTAATGTATAATTGCGGGACTCTAATCATAAAAACCCATCT CATAAATAACGTCATGCATTACATGTTAATTATTACATGCTTAACGTAATTCAA CAGAAATTATATGATAATCATCGCAAGACCGGCAACAGGATTCAATCTTAAGAA ACTTTATTGCCAAATGTTTGAACGATCTGCTTCGACGCACTCCTTCTTTACTCC ACCATCTCGTCCTTATTGAAAACGTGGGTAGCACCAAAACGAATCAAGTCGCTG GAACTGAAGTTACCAATCACGCTGGATGATTTGCCAGTTGGATTAATCTTGCTT TTCCCCGCATGAATAATATTGATGAATGCATGCGTGAGGGGTATTTTCGATTTTG GCAATAGCTGCAATTGCCGCGACATCCTCCAACGAGCATAATTCTTCAGAAAAA TAGCGATGTTCCATGTTGTCAGGGCATGCATGATGCACGTTATGAGGTGACGGT GCTAGGCAGTATTCCTCAAAGTTTCATAGTCAGTATCATATTCATCATTGCAT TCCTGCAAGAGAGAATTGAGACGCAATCCACACGCTGCGGCAACCTTCCGGCGT TCGTGGTCTATTTGCTCTTGGACGTTGCAAACGTAAGTGTGGATCCCGGTCCGG | Northernblotanalyse nach Doppelverdau aus pGWB14- <i>AtACT1</i> - Plasmid-DNA mit BamHI/EcoRI |
|------------------|--|---|

CATCTACTCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTCCACTA
 TCGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCG
 ATTTGTGTACGCCCAGAGTCCCGGCTCCGGATCGGACGATTGCGTCGCATCGA
 CCCTGCGCCCAAGCTGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGT
 TGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATACGCCCCGAGCCGCGGCGATCCTGCAAGC
 TCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCGTCTGCTGCTCCATAACAAGCCAACCAC
 GGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCCGAACATCGCC
 TCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTTG
 GAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGACTTCGGGGCAGTCTCGGCCCAA
 AGCATCAGCTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTGTCGCCATC
 ACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGC
 CATGTAGTGTATTGACCGATTCTTGGCGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTC
 TGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGCCTCCGCGACCGGCTGCAGA
 ACAGCGGGCAGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACCCTGTGCACGG
 CGGGAGATGCAATAGGTCAGGCTCTCGCTG

AtMATE_F2

TTTGAAGACAAAATTCACCATTCTCATCACCATCTTATGGTTCTTCAC
 GGAATCGGTTTTCTTACTTCTTAGACAAGATCCTAGCATCTCAAAACA
 AGCTGCACTCTACATGAAGTACCTAGCTCCCGGTTTACTCGCTTACGG
 GTTCTTACAAAACATTTTGAGATTTTGCCAAACACAATGCATCGTTAC
 TCCGCTAGTTTTATTCTCGTTTTCTTCCCTTGGTGATTAATATCGGTAC
 TACATATGCTCTGGTGCATTTAGCTGGGCTTGGATTCATCGGTGCTCC
 AATAGCTACATCTATTTTATTGTGGATAGCTTTCGTTTTCTCTCGGGTT
 TTATGTGATTTGTTCCGACAAGTTTAAGGAAACATGGACCGGATTTTC
 GATGGAATCATTTTCATCATGTAGTACTAACTTGACATTAAGCATCCC
 TTCTGCTGCTATGGTATGTTTGAATATTGGGCGTTCGAGATTCTAGT

Northernblotanalyse 669
 von *AtMATE*-cDNA
 exprimierenden
 Pflanzen

| | | | |
|---|--|--|--|
| | GTTCTTAGCAGGATTGATGCGAAATCCGGAAATCACCCTTCTTTGGT AGCTATATGCGTCAACACGGAATCAATAAGTTACATGTTAACATGCGG ACTTAGTGCAGCTACAAGTACGCGTGTGTCCAACGAACTTGGAGCAGG AAATGTAAAAGGCGCAAAGAAGGCGACTTCGGTTTTGAAGACAAA | | |
| <i>AtACT1</i> -cDNA für Northernblot von <i>AtACT1</i> - <i>AtMATE</i> -Pflanzen | AATGGCGTTAAAGGTGATCAAGATCTCCCGAGTCAGCCCTGCAACCGCCTCCG TCGACCCGCTCATTGTCCCACTCTCGTTCTTTGATTTACAGTGGCTTAAACTC AACCTACCGAGCAAGTATTCTTTTACAAACTCACCGAATCATCATCATCTCG CGACGTTTTCTACTCCTCCATCCTCCCCAAGCTCGAGCGATCTCTTTCACTCA TCCTCACTCACTTTTCGCTATTACAGGGTCACCTAAGTGGGATTACACAAGAT CCAAAGCCGCATTTAGTTGTTCTCTCAGGAGACACACTCTCTCTCACAGTGGC TGAGACTGATGCGGATTTCTCACGTATCTCTGGCAGAGGGCTTCGTCCAGAGC TAGAGTTACGCCCTCTAATACCCGAGCTACCGATTTATTCTGACTCGGGGGCT GTTGTATCTCTGCAAGTCACTTTGTTCCCGAAAACAAGGCTTCTGCATTGGAAC CACAGCCCACCATGTGCTCTTGGACGGCAAAACGGCTGAAAAATTTAACAAG CATGGGCTCACACTTGTAACATGGCACCATAACGAAAATTCTACCAACGGTT TTAGATCGTTCTGTGTCGAATGTTCCAGCCGGACTTGAACAAAAGATGCTCGA ACTTCTGCCGTATCTTACGGAGGACGACAAAGAGAACGGAAGAACCCTAAAGC TACCTCCAGTCAAAGAGATTAACGCTAAAGACAACGTCCTCCGAATCACCATC GAGATAAGTCCTGAAAACATTGAGAAACTCAAGGAGAGAGCCAAGAAAGAGTC AACACGCGCTGAGCTTCACTTGTCACGTTTCGTAGTCACGTTCCGCCATGTGT GGACATGCATGGTGAAGGCACGTAGTGGTGACCCAAACCGACCGGTTTCGTTTC ATGTACGCTGCTGATTTTAGGAACCGGTTAGAACCACAGTCCCTGTGACATA CTTCGGGACTTGTGTCTTAGCCATGGATTTCTATAAATACAAAGCTAAGGAGT TTATGGGAGAAGATGGATTTGTCAACACCGTCGAGATTCTCAGTGATTCGGTC AAACGTTTGGCTTACAAAGGGGTAGAGTCAACTTGGAAAGTGATGAGGAAGG | Sonde für 1360 Northernblotanalyse nach Verdau aus pICH41308- <i>AtACT1</i> - Plasmid-DNA mit BsaI | |

| | | | |
|---|--|--|--|
| | AACAAAGACAATGAAATGGGGTACACAGTTGTTGGTTCGTAAACGGGTCTGAACC AGATTGGGATGTACGAAACGGACTTCGGGTGGGGAAGGCCCATTCACACTGAG ACAATGTCTATCTACAAGAACGATGAGTTCTCTATGTCCAAGAGGAGAGATGG TATCGGTGGCGTCGAGATTGGCATCTCTTTGAAGAACTTGAGATGGATACTT TTCTGTCTTTATTTTACAAATGGATTGGAACTGA | | |
| <i>AtMATE</i> -DNA mit ersten Intron für Northernblot von <i>AtACT1</i> - <i>AtMATE</i> -Pflanzen | AATGGCTGATCCCACGTCCAAAGATGACCATGATGGTGAAGGAGGAAGAGACA AATCATCAACTTTTGTTCAAAACTTATTGACGTTGAAGAAGCAAAGACTCAA ATCATTTACTCTCTACCAATGATATTCACCAATCTTTTCTATTATTGTATCCC TTTAACCTCTGTGATGTTTCGCTTCTCAACTCGGCCAACTCGAGCTCGCCGGTG CTACCCTAGCCAATTCTTGGGCTACCGTCAACGGTTTTGCCTTCATGGTACTA TTATCTCCTTATCCTCCAACCTTCATTTGCATCCAACATTTTCTTTTGCTTAC TACATGCATAAGTTACTAAAGATAGGCTAATATATTATATATATAAAAAGGTT ATACACTCAAATTTGGATTCAACTTTATCCATGCATTTCTCTAAATTTGGTTA ATATTGTTTCATTTTTGTTTTGCTATTTAAGGAGATCTAAAAGGGACAAGTGG ATGGGCTTATGCGTTTTGTCTAAATTGTTTTCTTAACCAGAACGTTTCTATG CATTATATGGGTATTTGTTTCTATAAAGACATTTAATGTCTTGTTAATTTTCA GACAGGGTTAAGTGGAGCACTTGAGACATTGTGTGGACAAGGCTTTGGTGCAA AAAGCTATAGAATGTTGGGGATTCATCTACAATCATCTTGCAATTGTTTCATTA GTATTCACCATTCTCATCACCATCTTATGGTTCTTCACGGAATCGGTTTTCTT ACTTCTTAGACAAGATCCTAGCATCTCAAAACAAGCTGCACTCTACATGAAGT ACCTAGCTCCCGGTTTACTCGCTTACGGGTTCTTACAAAACATTTTGAGATTT TGCCAAACACAATGCATCGTTACTCCGCTAGTTTTATTCTCGTTTCTTCCCTT GGTGATTAATATCGGTACTACATATGCTCTGGTGCATTTAGCTGGGCTTGAT TCATCGGTGCTCCAATAGCTACATCTATTTCAATTGTGGATAGCTTTTCGTTTCT CTCGGTTTTATGTGATTTGTTTCGGACAAGTTAAGGAAACATGGACCGGATT TTTCGATGGAATCATTTTCATCATGTAGTACTAACTTGACATTAAGCATCCCTT | Sonde für 1736 Northernblotanalyse nach Verdau aus pICH41308- <i>AtMATEintron</i> -Plasmid- DNA mit BsaI | |

CTGCTGCTATGGTATGTTTGGAAATATTGGGCGTTTCGAGATTCTAGTGTTCTTA
GCAGGATTGATGCGAAATCCGGAAATCACC ACTTCTTTGGTAGCTATATGCGT
CAACACGGAATCAATAAGTTACATGTTAACATGCGGACTTAGTG CAGCTACAA
GTACGCGTGTGTCCAACGAACTTGGAGCAGGAAATGTAAAAGGCGCAAAGAAG
GCGACTTCGGTATCCGTTAAGTTGTCTTTAGTTCTAGCTCTCGGTGTAGTCAT
TGCTATACTTGTAGGTCATGATGCCTGGGTTGGTTTATT CAGCAATAGCCATG
TGATTAAAGAGGGATTTGCATCACTAAGGTTTTTCCTTGCTGCATCTATAACA
CTTGATTCAATCCAAGGTGTTTTATCAGGAGTTGCGAGAGGATGCGGATGGCA
GCGGTTAGCCACGGTTATAAATTTGGGAACATTCTACTTAATCGGAATGCCTA
TTTCAGTCCTTTGTGGTTTTCAAGTTGAAGCTTCATGCCAAGGGTTTATGGATC
GGTCTGATATGTGGGATGTTTTGCCAGTCCGCATCTCTTTTGCTTATGACAAT
TTTCCGGAAGTGGACAAAGCTGACTGCTGCCACTGTCTGA

7.6. Ergebnisse

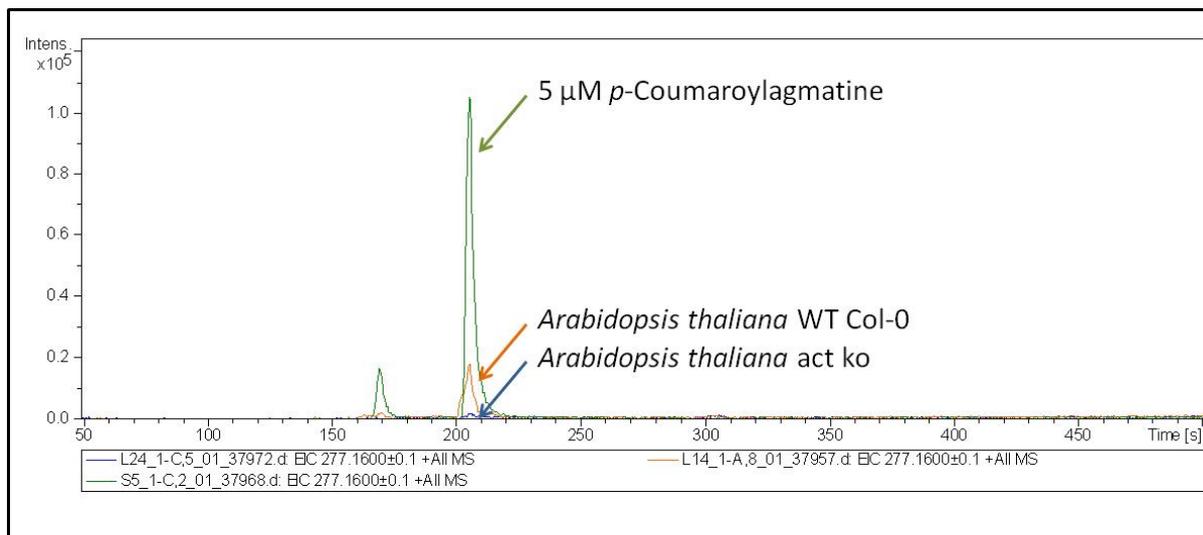
7.6.1. EIC und MS²-Spektrum von *p*-Cumaroylagmatin

Abbildung 39: Extrahiertes Ionen-Chromatogramm (EIC) von *p*-Cumaroylagmatinstandard (5 µM) -, methanolischen Extrakten von *A. thaliana* Wildtyp Col-O-Blättern - und methanolischen Extrakten von *A. thaliana AtACT1 knock out*-Blättern -. $m/z = 277.1600 \pm 0,1$; UPLC-ESI-QTOF-MS

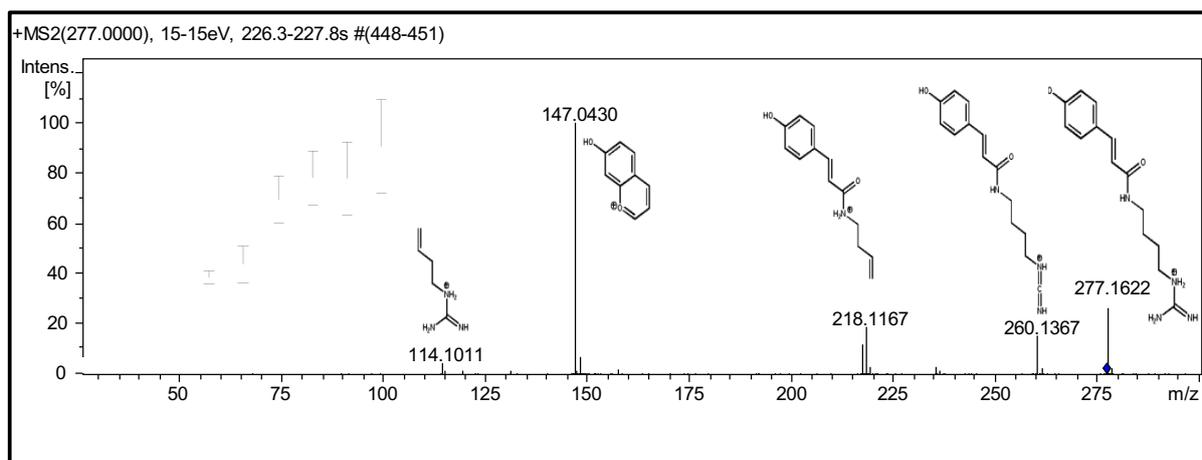


Abbildung 40: MS-MS-Spektrum von *p*-Cumaroylagmatin. Eltern-Ion $m/z = 277.1600 \pm 0,1$; UPLC-ESI-QTOF-MS

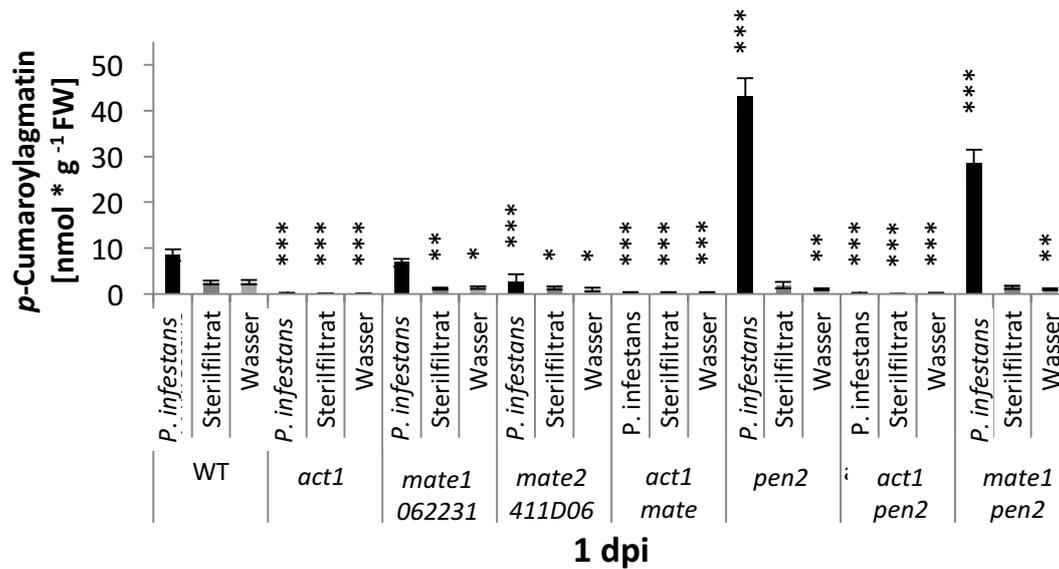
7.6.2. *p*-Cumaroylagmatingehalte in Blättern von *A. thaliana* *knock out*-Linien

Abbildung 40: *p*-Cumaroylagmatingehalte von *A. thaliana*-Blattextrakten 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■, Sterilfiltrat ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Die methanolischen Blattextrakte wurden per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen: m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und segregierenden MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 107 *P. infestans*, n = 50 Sterilfiltrat; n = 49 Wasser); *knock out*-Linien: *act1* (n = 22 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 12 Wasser); *mate1* (n = 48 *P. infestans*, n = 28 Sterilfiltrat; n = 30 Wasser); *mate2* (n = 9 *P. infestans*, n = 11 Sterilfiltrat; n = 11 Wasser); *act1 mate1* (n = 9 *P. infestans*, n = 15 Sterilfiltrat; n = 14 Wasser); *pen2* (n = 24 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 13 Wasser); *act1 pen2* (n = 26 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 13 Wasser); *mate1 pen2* (n = 6 *P. infestans*, n = 11 Sterilfiltrat; n = 11 Wasser) Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert ≤ 2*10⁻⁶ *** (Student'scher t-Test).

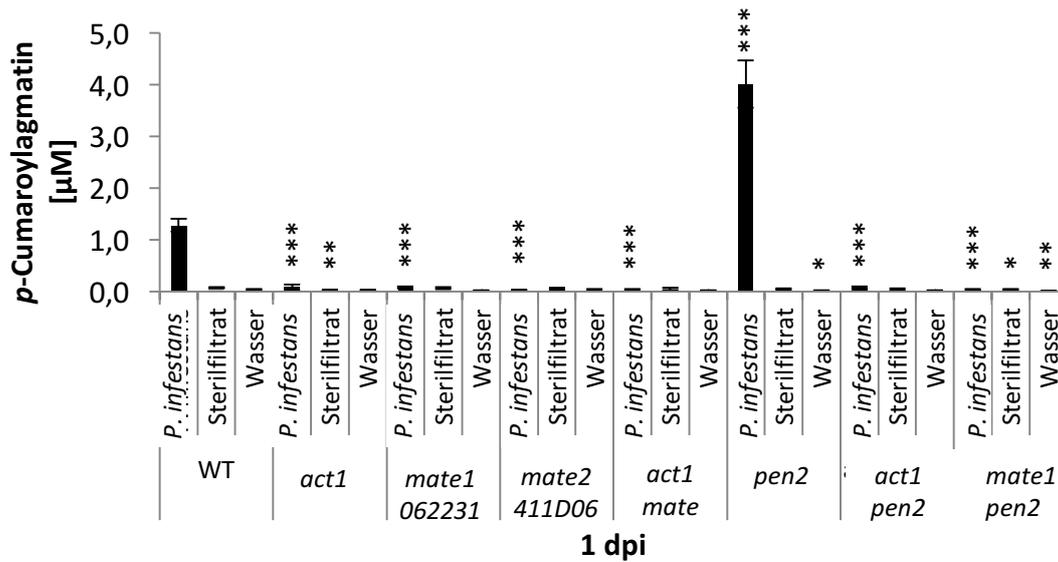
7.6.3. *p*-Cumaroylagmatingehalte in Tropfen von *A. thaliana knock out*-Linien

Abbildung 41: *p*-Cumaroylagmatingehalte im Inokulum von *A. thaliana* 1 Tag nach Inokulierung mit *P. infestans* ■, Sterilfiltrat ■ oder Wasser ■ (3 Experimente). Das nach einem Tag von den Blättern abgenommene Inokulum wurde direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen m/z 277.1659 $[M+H]^+$; Kontrollen sind Wildtyplinien Col-0, *gl-1* und segregierenden MATE-Wildtyp zusammengefasst (n = 109 *P. infestans*, n = 51 Sterilfiltrat; n = 48 Wasser); *knock out*-Linien: *act1* (n = 22 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 13 Wasser); *mate1* (n = 47 *P. infestans*, n = 29 Sterilfiltrat; n = 36 Wasser); *mate2* (n = 9 *P. infestans*, n = 11 Sterilfiltrat; n = 11 Wasser); *act1 mate1* (n = 12 *P. infestans*, n = 15 Sterilfiltrat; n = 16 Wasser); *pen2* (n = 24 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 13 Wasser); *act1 pen2* (n = 27 *P. infestans*, n = 13 Sterilfiltrat; n = 12 Wasser); *mate1 pen2* (n = 6 *P. infestans*, n = 11 Sterilfiltrat; n = 11 Wasser) Statistik: SEM; Signifikanzen zu Wildtyp-Kontrollen mit gleicher Behandlungsart sind mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 4 \cdot 10^{-11}$ *** (Student'scher t-Test).

7.6.4. *p*-Cumaroylputreszin-Gehalte 3 dpi *P. infestans* in *AtACT1* exprimierenden
Kartoffelpflanzen

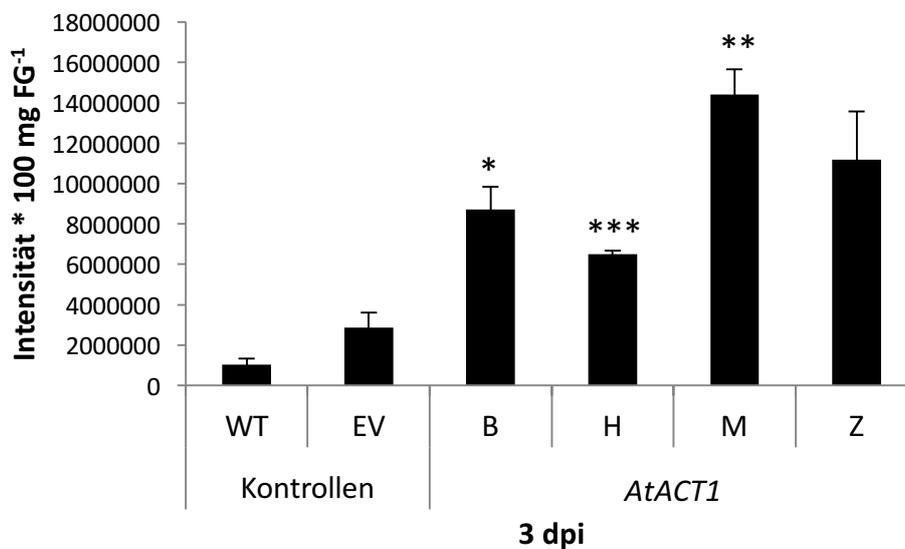


Abbildung 42: *p*-Cumaroylputreszin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 1). Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml) inokuliert mit $18 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 235.1441 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); *AtACT1* B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 8. Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

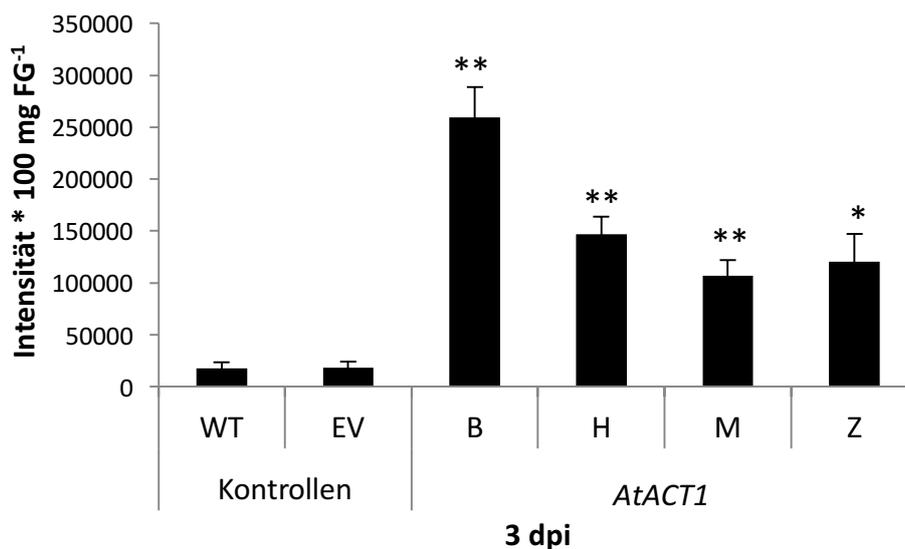


Abbildung 43: *p*-Cumaroylputreszin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 2). Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml) inokuliert mit $18 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 235.1441 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); *AtACT1* B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 8. Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test). *p*-Cumaroylagamatin-Gehalte 3 dpi *P. infestans* in *AtACT1* exprimierenden Kartoffelpflanzen

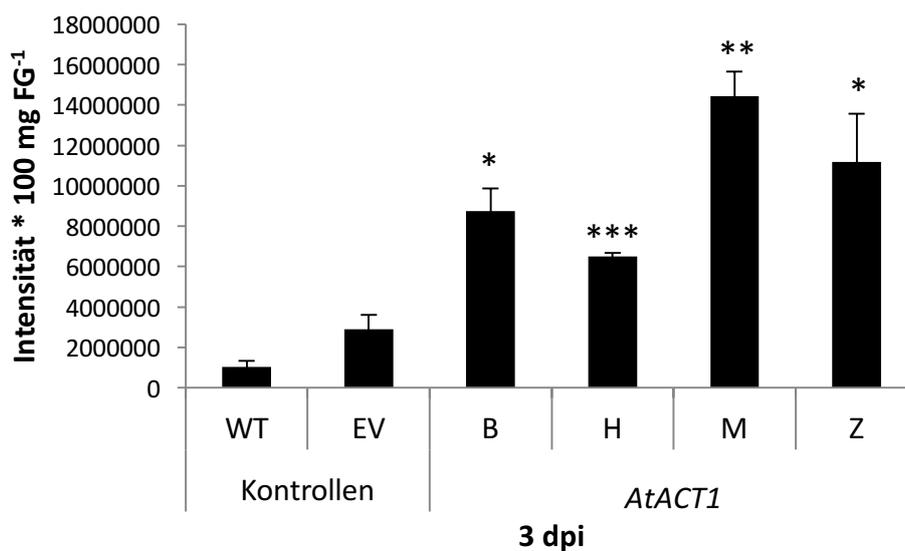


Abbildung 44: *p*-Cumaroylagamatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 3). Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml) inokuliert mit $18 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze,

verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); AtACT1 B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 4. Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert ≤ 0,01 **, P-Wert ≤ 0,001 *** (Student'scher t-Test).

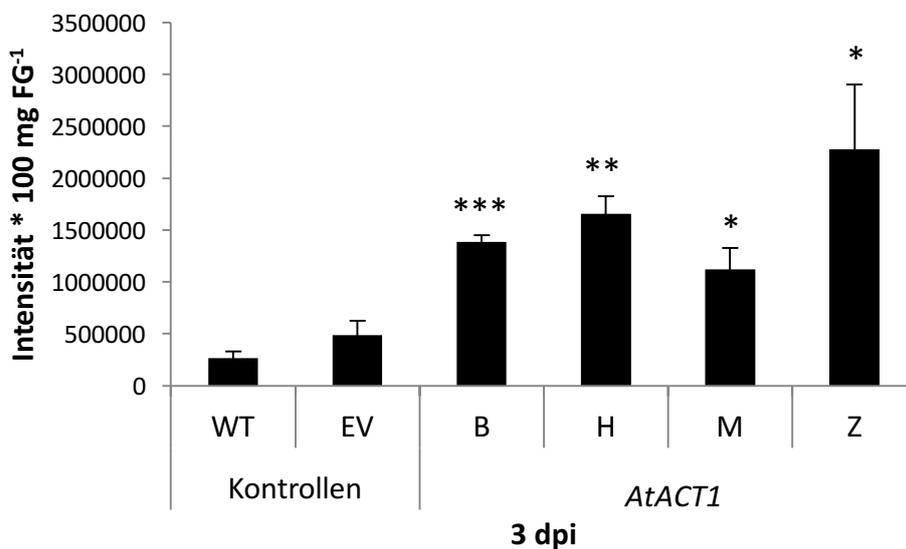


Abbildung 45: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben drei Tage nach Inokulierung mit *P. infestans* (Experiment 1).

Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml) inokuliert mit $18 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; WT – Wildtypkontrolllinie (n = 8); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 8); AtACT1 B, H, M, Z – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, je Linie n = 4. Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert ≤ 0,05 *, P-Wert ≤ 0,01 **, P-Wert ≤ 0,001 *** (Student'scher t-Test).

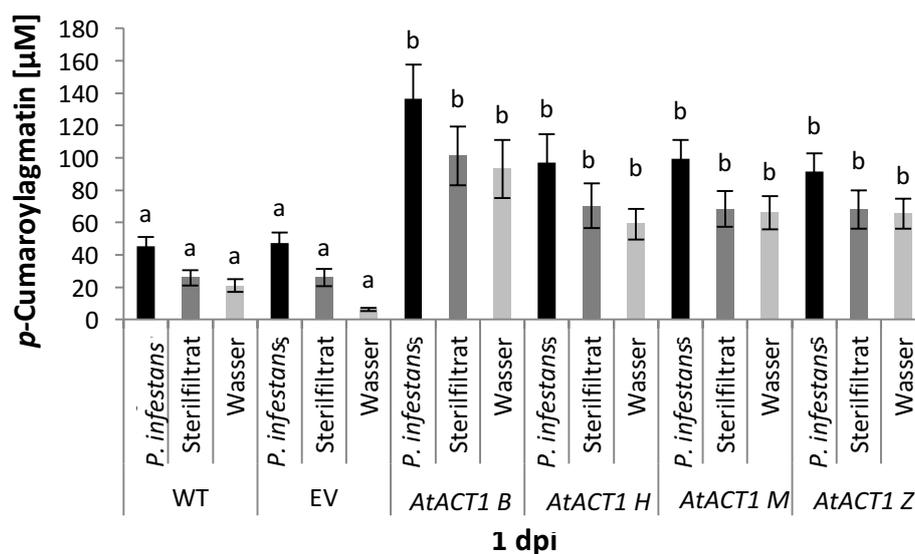


Abbildung 46: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*-Zoosporen ($1 \times 10^5/\text{ml}$) ■, einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension ■ oder Wasser ■. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \times 10^5/\text{ml}$), einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension oder Wasser inokuliert. Dabei wurden $30 \times 10 \mu\text{l}$ je Inokulierungssubstrat pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4 inokuliert. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach einem Tag, nachdem vorher das Inokulum abgenommen wurde. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 $[\text{M}+\text{H}]^+$; 3 Experimente; Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien ($n = 20$ je Behandlung); *AtACT1*-unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien B, H, M, Z ($n = 24$ je Behandlung); quantifiziert wurde über eine *p*-Cumaroylagmatin-Eichgerade, Statistik: SEM; Signifikanzen zu Kontrollen oder Behandlungsart sind mit Kleinbuchstaben dargestellt, P-Wert $\leq 0,001$ b (one way Anova)

7.6.5. *p*-Cumaroylagmatin in Tropfen auf transgenen *AtACT1* exprimierenden

Kartoffellinien

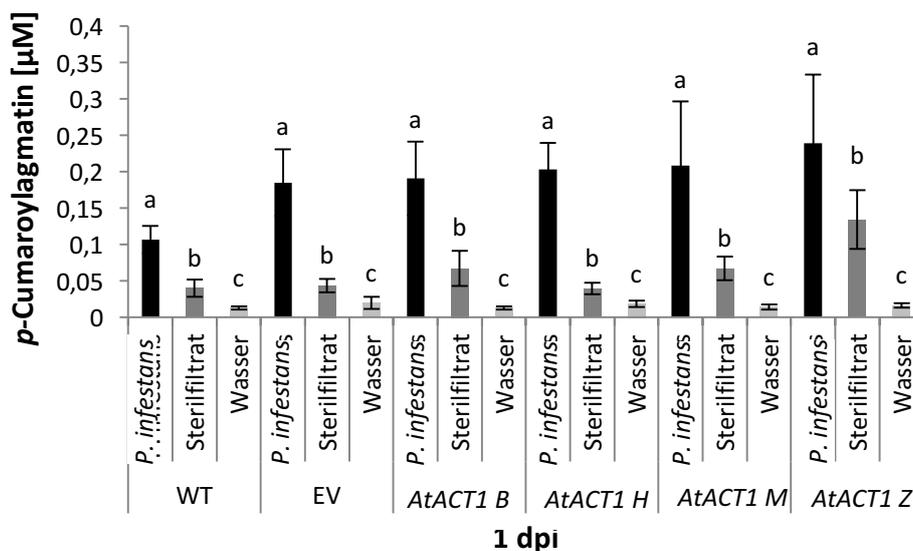


Abbildung 47: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte im Inokulum (*P. infestans*-Zoosporen ($1 \cdot 10^5$ /ml) ■, einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension ■ oder Wasser ■) welches einen Tag nach Inokulierung vom Kartoffelblatt abgenommen wurde. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Ausstopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml), einer steril filtrierten *P. infestans*-Suspension oder Wasser inokuliert. Dabei wurden $30 \cdot 10 \mu$ je Inokulierungssubstrat pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4 inokuliert. Ernte des Inokulum erfolgte nach einem Tag. Nach Abzentrifugation wurde das Inokulum anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; 3 Experimente: Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinie (n = 20 je Behandlung); AtACT1-unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien B, H, M, Z (n = 24 je Behandlung); quantifiziert wurde über eine *p*-Cumaroylagmatin-Eichgerade. Signifikanzen zu Kontrollen oder Behandlungsart sind mit Kleinbuchstaben dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ b,c; (one way Anova)

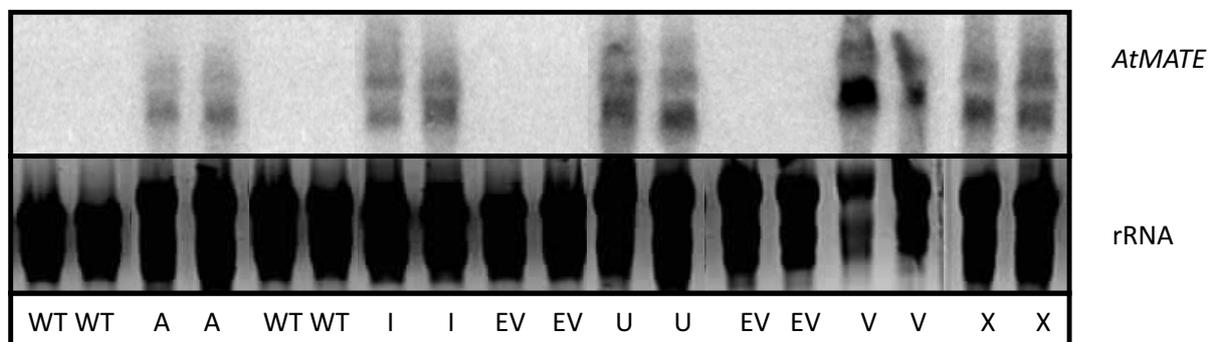
7.6.6. Nachweis der Expression von *AtMATE*-Transkript in transgenen Kartoffellinien

Abbildung 48: Northernblot der transgenen *AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien (3 Experimente, n = 6). Sonde für *AtMATE*-Transkript: *AtMATE*-cDNA aus *AtMATE*cDNA_Fragment2 (669 bp). WT = Wildtypkontrolle, EV = Leervektorkontrolle, A, I, U, V, Z = unabhängige transgene *AtMATE* exprimierende Linien

7.6.7. *p*-Cumaroylagmatin Tropfen auf transgenen *AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien

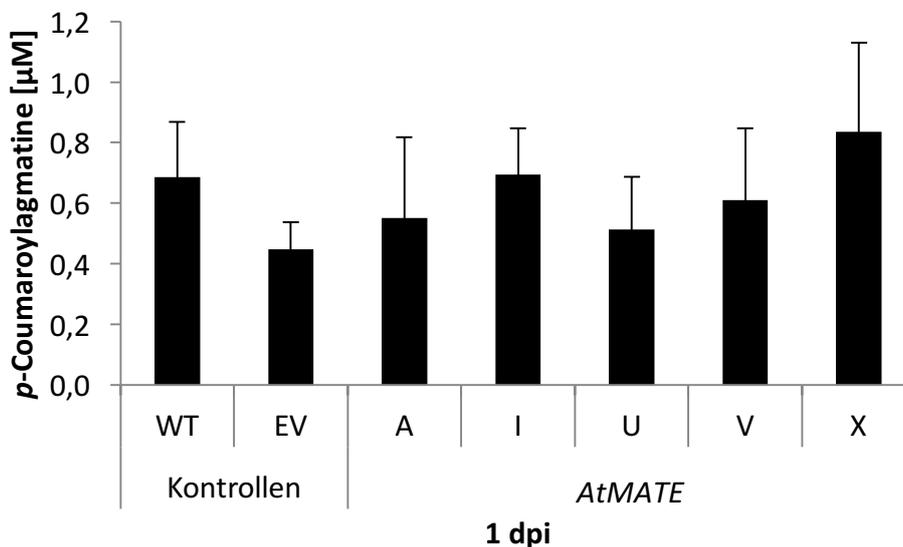


Abbildung 49: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte in Kartoffelblattscheiben einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans* – Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5/\text{ml}$) inokuliert mit $18 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blatttagen 3-4. Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die Blattscheiben wurden einer methanolischen Extraktion unterzogen und anschließend per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (WT, $n = 36$, EV, $n = 35$); *AtMATE*– unabhängige transgene *AtMATE* exprimierende Kartoffellinien (A, $n = 8$; I, $n = 16$; U, $n = 12$; V, $n = 8$; X, $n = 12$). 3 Experimente, Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,01$ **, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

7.6.8. *p*-Cumaroylagmatin in Blättern von transgenen AtMATE exprimierenden

Kartoffellinien

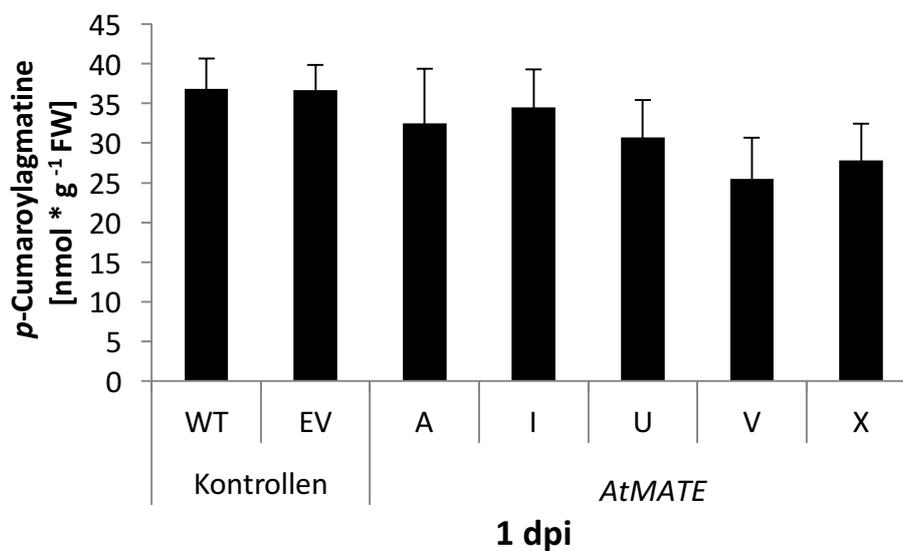


Abbildung 50: *p*-Cumaroylagmatin-Gehalte im Inokulum einen Tag nach Inokulierung mit *P. infestans*. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (Zoosporenkonzentration: $1 \cdot 10^5$ /ml) inokuliert mit $30 \cdot 10 \mu\text{l}$ Suspension pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4. Ernte des Inokulum vom Blatt erfolgte nach einem Tag. Das Inokulum wurde nach Abzentrifugation direkt per UHPLC-ESI-QTOF-MS vermessen. m/z 277.1659 [M+H]⁺; Kontrollen sind Wildtyp- und Leervektorkontrolllinien (WT, $n = 36$, EV, $n = 35$); AtMATE-unabhängige transgene AtMATE exprimierende Kartoffellinien (A, $n = 8$; I, $n = 16$; U, $n = 12$; V, $n = 8$; X, $n = 12$). 3 Experimente, Statistik: SEM; Signifikanzen zu WT- und EV-Kontrolllinien mit Sternen dargestellt, P-Wert $\leq 0,05$ *, P-Wert $\leq 0,01$ **, P-Wert $\leq 0,001$ *** (Student'scher t-Test).

7.6.9. *P. infestans*-Biomasse in transgenen AtMATE exprimierenden Kartoffelpflanzen

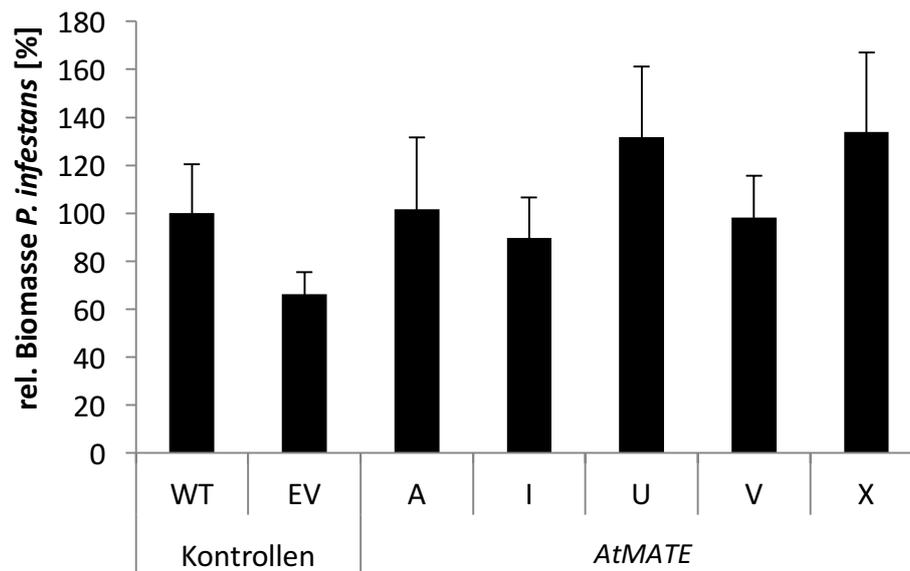


Abbildung 51: *P. infestans* –Infektion von transgenen *AtACT1-AtMATE* exprimierenden Kartoffellinien. Die Kartoffellinien wurden drei Wochen nach dem Austopfen aus der Sterilkultur in Erde mit der *P. infestans* –Zoosporensuspension inokuiert. Dabei wurden 18 * 10 µl *P. infestans* –Zoosporensuspension ($1 \cdot 10^5$ /ml) pro Pflanze, verteilt auf 3 Blätter der Blattetagen 3-4, inokuiert. Die Ernte der inokulierten Blattscheiben erfolgte nach drei Tagen. Die *P. infestans*-Biomasse wurde durch qPCR, nach Isolierung der genomischen DNA aus den infizierten Blattscheiben, bestimmt. 3 Experimente: WT – Wildtypkontrolllinie (n = 16); EV – Leervektorkontrolllinie (n = 16); *AtACT1* A, I, U, V, X – unabhängige transgene *AtACT1* exprimierende Kartoffellinien, A, n = 12; I, n = 8; U, n = 8; V, n = 8; X, n = 7; Signifikanzen zu WT- und EV- Kontrolllinien: keine (Student'scher t-Test)

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Doktor-Mutter Prof. Dr. Sabine Rosahl für die exzellente Betreuung meiner Arbeit, für das Überlassen des sehr interessanten Themas, die schönen und hilfreichen Diskussionen, das immer offene Ohr und sich Zeitnehmen um mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, die Möglichkeit in einer so netten Arbeitsgruppe über fünf Jahre gearbeitet zu haben, das Korrekturlesen meiner Arbeit und für den vielen leckeren Kapselkaffee. Danke Desy!

Ein ganz großes Dankeschön gilt auch meinem Doktor-Vater Prof. Dr. Dierk Scheel für die Möglichkeit in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie zu promovieren, hilfreichen Diskussionen, das Ermöglichen an sehr interessanten, internationalen und nationalen Konferenzen teilgenommen zu haben und für die Übernahme des ersten Gutachtens.

Desweiteren möchte ich Prof. Dr. Ingo Heilmann und Prof. Dr. Felix Mauch für die Übernahme des zweiten und des externen Gutachtens danken.

Ich danke auch allen Kollegen der AG Induzierte Pathogenabwehr; Ramona, Jule, Linda, Andreas, Nadine und Ulrike für das tolle Arbeitsklima und die vielen lustigen Momente im Labor und in der Kaffeerunde. Besonderer Dank gilt dabei Ulrike und Andreas, die mit viel Rat und Tat an dieser Arbeit mitgewirkt haben. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Abteilung SEB für die schöne Arbeitsatmosphäre in der Abteilung und tollen Mittags- und Kaffeerunden.

Besonderer Dank gilt den PostDocs Lennart, für die Protoplastenexperimente und den vielen guten Ratschlägen im Laboralltag, Christoph und Stephan, die stets halfen wenn die MS nicht so wollte wie ich und Karin, für das Durchforsten meiner Daten nach neuen Erkenntnissen und die schönen Gespräche.

Aus der Abteilung SZB danke ich Dr. Thomas Vogt für die Diskussionen und Anregungen als mein Mentor und Dr. Sylvestre Marillonnet für das Einführen und die Hilfe in der Welt des Golden Gate Cloning.

Ein riesiges Dankeschön gilt meinem Ehemann Dirk und meiner Familie für die Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Außerdem möchte ich mich bei meinen vielen lieben Freunden aus Halle, insbesondere der „Mittwochrunde“ und allen Freunden aus der Heimat, insbesondere beim „Harten Kern“ für viel Spaß, Hilfe und Unterstützung außerhalb des Institutes bedanken.

9. Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese eingereichte Doktorarbeit zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. nat. selbständig verfasst habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht.

Weiterhin bestätige ich, dass ich mich zu keinem früheren Zeitpunkt um den Doktorgrad beworben habe.

Halle, November 2015

10. Lebenslauf

10.1. Persönliche Daten

Geburtsdatum / -ort: 04.02.1983 in Leisnig
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet

10.2. Ausbildung und beruflicher Werdegang

April 2010 – Juni 2015 Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle
 Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie
 Forschungsgruppe Induzierte Pathogenabwehr

Dissertation: „Hydroxyzimtsäureamide als
 Abwehrstoffe gegen *Phytophthora infestans* in *Arabidopsis
 thaliana* und *Solanum tuberosum*“; Betreuer: Prof. Dr.
 Sabine Rosahl, Prof. Dr. Dierk Scheel

Jan. – März 2010 Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie des
 Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Martin-
 Luther-Universität Halle-Wittenberg

Werkvertrag „Vorbereitende experimentelle und
 konzeptionelle Arbeiten sowie Mitarbeit als
 Praktikumsbetreuerin“

Okt. – Dez. 2009 Abteilung Ökologische und Pflanzen-Biochemie des
 Instituts für Biochemie und Biotechnologie der Martin-
 Luther-Universität Halle-Wittenberg

Werkvertrag „Experimentelle Studien zu einem
 Metallothionein (MT) aus Weizen“

Jan. – Sept. 2009 experimentelle Diplomarbeit: „Metall-induzierter
 oxidativer Stress in *Physcomitrella patens* – Untersuchung
 von ROS-entgiftenden Enzymen und Metaboliten“

(Note: sehr gut; 1,4); Betreuer: Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß

10.3. Studium und Schulausbildung

April 2005 – Sept. 2009 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Spezialisierungsrichtung Pflanzenbiochemie, Abschluss mit dem akademischen Grad „Diplom-Biochemikerin“ (Gesamtnote: gut: 2,1)

Okt. 2001 – Sept. 2006 Exellenzstipendium des Wissenschafts- und TransferCenter des Altenburger Landes und der Hochschulen e.V. (WTC)

Okt. 2001 – Sept. 2004 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg

Juni 2001 Abitur

Sept. 1993 – Juni 2001 Roman-Herzog-Gymnasium in Schmölln

Halle (Saale), November 2015

11. Publikationen und Vorträge

Dobritsch, M., Lübken, T., Eschen-Lippold, L., Gorzolka, K., Blum, E., Matern, A., Marillonnet, S., Böttcher, C., Dräger, B., and Rosahl, S. (2016). MATE Transporter-Dependent Export of Hydroxycinnamic Acid Amides. *Plant Cell* 28, 583–596.

Pradhan, A., Seena, S., Schlosser, D., Gerth, K., Helm, S., Dobritsch, M., Krauss, G.-J., Dobritsch, D., Pascoal, C., and Cássio, F. (2015). Fungi from metal-polluted streams may have high ability to cope with the oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*

Pradhan, A., Seena, S., Dobritsch, D., Helm, S., Gerth, K., Dobritsch, M., Krauss, G.-J., Schlosser, D., Pascoal, C., and Cássio, F. (2014). Physiological responses to nanoCuO in fungi from non-polluted and metal-polluted streams. *Sci. Total Environ.* 466–467, 556–563.

Poster: Dobritsch, M., Matern, A. and Rosahl, S., Hydroxycinnamic acid amides as defense metabolites; SFB 648 International meeting: Communication in Plants and their Responses to the Environment (2015); Halle (Saale)

Poster: Dobritsch, M., Matern, A., Dräger, B. und Rosahl, S., Hydroxycinnamic acid amides as defense metabolites; 12th New Phytologist Workshop: “The apoplast as battleground for plant–microbe interactions” (2015), Schloss Rauschholzhausen

Vortrag: Dobritsch, M., Lübken, T., Blum, E., Dräger, B. and Rosahl, S. The Role of Hydroxycinnamic Acid Amides for Pathogen Defense of Potato; International Conference of the Metabolomics Society (2012); Washington D.C., USA