

**MOLEKULARE CHARAKTERISIERUNG  
AUSGEWÄHLTER PATHOGENRESPONSIVER  
REZEPTORKINASEN AUS *ARABIDOPSIS THALIANA***

**DISSERTATION**

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2008

vorgelegt von  
Anne Schwedt

Tag der mündlichen Prüfung:

15.07.08

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Harter

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	V
TABELLENVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Konzept der angeborenen Immunität.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Grundprinzipien der pflanzlichen Immunität .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Prinzipien der Pathogenerkennung und pathogenvermittelten         Signaltransduktion .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4 LRR-RLKs.....</b>	<b>11</b>
<b>1.5 BAK1 – eine LRR-RLK mit multipler Funktion .....</b>	<b>13</b>
<b>1.6 Ziele der Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Chemikalien .....	15
2.1.2 Nährmedien .....	15
<b>2.2 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen.....</b>	<b>16</b>
2.2.1 Verwendete Pflanzen .....	16
2.2.2 Geninaktivierung durch T-DNA-Insertion .....	17
2.2.3 Komplementation der DRK-Gendefekte .....	17
2.2.4 <i>Arabidopsis</i> Zellkulturbedingungen und Protoplastierung .....	17
2.2.5 Transformation von <i>Arabidopsis</i> Protoplasten .....	18
2.2.6 Transformation von <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen mittels <i>Agrobacterium</i> .....	18
<b>2.3 Phänotypische Analysen.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 Keimungs- und Wurzellängenexperimente .....	19
2.3.2 Pathogen-Test <i>in planta</i> .....	19
2.3.3 Analyse des Bakterienwachstums <i>in planta</i> .....	19
2.3.4 Analyse der Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen.....	20
2.3.4.1 Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	20
2.3.4.2 Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	20
2.3.4.3 Infektion mit verschiedenen <i>Colletotrichum</i> Spezies .....	21
2.3.4.4 Infektion mit <i>Erysiphe pisi</i> oder <i>Blumeria graminis</i> .....	21
2.3.5 Anfärbung reaktiver Sauerstoffspezies mit 3,3'-Diaminobenzidin .....	21
2.3.6 Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau.....	21
2.3.7 Ethylenbestimmung .....	22
2.3.8 Laserbasierte Konfokalmikroskopie .....	22
2.3.9 Plasmolyseexperimente .....	22
2.3.10 Statistik .....	22
2.3.10.1 Mittelwerte und Standardabweichungen .....	22
2.3.10.2 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA).....	22
<b>2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>23</b>
2.4.1 Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen .....	23
2.4.2 Verwendete Plasmide .....	24
2.4.3 Anzucht der Mikroorganismen .....	24
2.4.3.1 Anzucht von <i>E. coli</i> .....	24

2.4.3.2	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	24
2.4.3.3	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	25
2.4.3.4	Anzucht von Pilzen .....	25
2.4.4	Transformationen .....	25
2.4.4.1	<i>E. coli</i> -Transformation .....	25
2.4.4.2	<i>Agrobacterium</i> -Transformation .....	26
<b>2.5</b>	<b>DNA-Analytik</b> .....	<b>26</b>
2.5.1	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen.....	26
2.5.2	Bakterien ( <i>E. coli</i> )-Plasmid-Präparation.....	27
2.5.2.1	Alkalische Lyse .....	27
2.5.2.2	QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN) .....	27
2.5.2.3	Bakterien ( <i>E. coli</i> )-Plasmid-Midipräparation .....	27
2.5.2.4	<i>Agrobakterien</i> -Plasmid-Minipräparation.....	27
2.5.3	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung .....	28
2.5.4	DNA-Restriktionsanalyse .....	28
2.5.5	Fällung von DNA mit Ethanol .....	28
2.5.6	Fällung von DNA mit PEG.....	28
2.5.7	Polymerasekettenreaktion-PCR.....	29
2.5.8	PCR zur Genotypisierung von <i>T</i> -DNA-Insertionslinien.....	29
2.5.9	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	30
2.5.10	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	30
2.5.11	Radioaktive Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten .....	30
2.5.12	DNA-Hybridisierung (Southern-Hybridisierung).....	31
2.5.13	Sequenzierung der DNA .....	31
2.5.14	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung .....	31
2.5.15	Klonierung mit Hilfe der Gateway <sup>TM</sup> -Technologie (Invitrogen) .....	31
<b>2.6</b>	<b>RNA-Analytik</b> .....	<b>33</b>
2.6.1	Isolierung von RNA aus Pflanzen .....	33
2.6.2	DNase-Verdau isolierter RNA.....	33
2.6.3	Ermittlung der Transkriptmenge über semiquantitative RT-PCR .....	33
2.6.4	Erstellung von <i>Microarray</i> -Daten.....	34
<b>2.7</b>	<b>Proteinanalytik</b> .....	<b>34</b>
2.7.1	Proteinbestimmung.....	34
2.7.2	SDS-PAGE .....	34
2.7.3	Proteinfärbung mit Coomassie.....	35
2.7.4	Proteindetektion mit Hilfe des Western-Blot .....	35
2.7.5	Kinaseaktivitätstest.....	35
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>37</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswahl geeigneter pathogeninduzierter LRR-RLK Kandidaten</b> .....	<b>37</b>
<b>3.2</b>	<b>DRK5</b> .....	<b>38</b>
3.2.1	Expressionsmuster der <i>DRK5</i> nach Bakterieninjektion .....	38
3.2.2	<i>DRK5</i> -Expression nach Applikation von Hormonen und abiotischem Stress ..	39
3.2.3	Analyse der <i>T</i> -DNA-Insertionslinie .....	41
3.2.3.1	Genotypisierung .....	42
3.2.3.2	Nachweis der Inaktivierung auf Transkriptebene .....	43
3.2.3.3	Bestimmung der Anzahl inserierter <i>T</i> -DNA-Fragmente.....	44
3.2.4	Phänotypische Analysen der <i>DRK5</i> -defizienten <i>T</i> -DNA-Insertionslinie .....	45
3.2.4.1	Untersuchung des Wachstums bakterieller Pathogene in <i>drk5</i> -Pflanzen .....	45
3.2.4.2	Test weiterer Pathogene <i>in vivo</i> .....	48
3.2.4.3	Einfluss pflanzlicher Hormone auf das <i>drk5</i> -Wachstum.....	49
3.2.4.4	Applikation abiotischer Stressoren.....	50

3.2.5	Molekulare Eigenschaften der DRK5.....	52
3.2.6	Lokalisation der DRK5.....	53
3.2.7	Struktur der LRR-Domäne der DRK5 .....	54
3.2.8	Besonderheiten des <i>DRK5</i> -Promotors.....	54
3.2.9	Kinasefunktion der DRK5 .....	55
3.2.10	<i>In vitro</i> Kinaseaktivität der DRK5-Kinasedomäne.....	56
<b>3.3</b>	<b>DRK6 .....</b>	<b>58</b>
3.3.1	<i>DRK6</i> -Expressionsmuster nach Behandlung mit Pathogenen .....	58
3.3.2	Einfluss abiotischer Stressoren auf die <i>DRK6</i> -Expression.....	59
3.3.3	Analyse der <i>T</i> -DNA-Insertionslinien .....	60
3.3.3.1	Genotypisierung .....	60
3.3.3.2	Nachweis der Inaktivierung auf Transkriptebene .....	62
3.3.3.3	Bestimmung der Anzahl inserierter <i>T</i> -DNA-Fragmente.....	62
3.3.4	Phänotypische Analysen der <i>DRK6</i> -defizienten <i>T</i> -DNA-Insertionslinie .....	64
3.3.4.1	Untersuchung des Wachstums bakterieller Pathogene in <i>drk6-2</i> -Pflanzen.....	64
3.3.4.2	Analyse weiterer Pathogene .....	69
3.3.5	Markergenexpression der <i>drk6-2</i> .....	70
3.3.6	Einfluss des <i>DRK6</i> -Gendefektes auf die Wirkung abiotischer Stressoren.....	71
3.3.7	Proteinstruktur und Molekulare Eigenschaften der DRK6.....	72
3.3.8	Lokalisation der DRK6.....	73
3.3.9	Struktur der DRK6-LRR-Domäne.....	75
3.3.10	Kinasefunktion der DRK6 .....	76
3.3.11	<i>In vitro</i> Kinaseaktivität der DRK6-Kinasedomäne.....	77
<b>3.4</b>	<b>BAK1 .....</b>	<b>80</b>
3.4.1	Zeitverlauf der zellulären Reaktionen auf die <i>A. brassicicola</i> -Infektion.....	80
3.4.2	Zeitverlauf der zellulären Reaktionen auf die <i>Pto</i> DC3000 Infektion.....	82
3.4.3	DPI Einfluss auf die Ausprägung pflanzlicher Abwehrreaktionen .....	84
3.4.4	Ethylenbiosynthese nach Pathogeninfektion .....	86
3.4.5	Vergleich von <i>bak1-3</i> und Col-0 durch Analyse von <i>Microarray</i> -Daten .....	88
3.4.6	Verifizierung der <i>Microarray</i> -Daten durch RT-PCR.....	91
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>92</b>
<b>4.1</b>	<b>DRK5 .....</b>	<b>92</b>
4.1.1	Regulation der <i>DRK5</i> -Genexpression .....	92
4.1.2	Phänotypische Analysen zur Funktionsbestimmung der DRK5.....	93
4.1.2.1	Einfluss des <i>DRK5</i> -Gendefektes auf die Hormonsensitivität .....	94
4.1.2.2	Einfluss des <i>DRK5</i> -Gendefektes auf die Pathogenabwehr.....	95
4.1.3	Mögliche Funktion der DRK5 .....	96
<b>4.2</b>	<b>DRK6 .....</b>	<b>97</b>
4.2.1	Regulation der <i>DRK6</i> -Genexpression .....	97
4.2.2	Phänotypische Analysen zur Funktionsbestimmung der DRK6.....	98
4.2.2.1	Charakterisierung <i>DRK6</i> -gendifizienter <i>T</i> -DNA-Insertionslinien .....	98
4.2.2.2	Einfluss eines <i>DRK6</i> -Gendefektes auf die abiotische Stressantwort.....	98
4.2.2.3	Einfluss eines <i>DRK6</i> -Gendefektes auf die Pathogenabwehr .....	99
4.2.2.4	Transkriptveränderung durch einen <i>DRK6</i> -Gendefekt .....	101
4.2.2.5	Mögliche biologische Funktion der DRK6 .....	101
<b>4.3</b>	<b>BAK1 .....</b>	<b>103</b>
4.3.1	Einfluss des <i>BAK1</i> -Gendefektes auf Pathogenabwehr und Zelltod .....	103
4.3.2	Veränderung der Genexpression in <i>bak1</i> -Mutanten.....	105
4.3.3	BAK1-ein multifunktionaler Korezeptor .....	108

<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b> .....	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b> .....	<b>A</b>
<b>7.1</b>	<b>Verwendete Primer</b> .....	<b>A</b>
<b>7.2</b>	<b>Sonden für die DNA Hybridisierung</b> .....	<b>B</b>
7.2.1	SALK Southern-Sonde .....	B
7.2.2	DSLox Southern-Sonde .....	C
<b>7.3</b>	<b>DRK5-Sequenzen</b> .....	<b>C</b>
7.3.1	<i>DRK5</i> -Promotor .....	C
7.3.2	<i>DRK5</i> -Gensequenz .....	D
7.3.3	<i>DRK5</i> -Proteinsequenz .....	E
<b>7.4</b>	<b>DRK6</b> .....	<b>E</b>
7.4.1	<i>DRK6</i> -Gensequenz .....	E
7.4.2	<i>DRK6</i> -Proteinsequenz .....	G
<b>7.5</b>	<b>BAK1</b> .....	<b>G</b>

## **ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1.1.1:	Grundstruktur von LRR-Rezeptorproteinen der angeborenen Immunität in Insekten, Säugetieren und Pflanzen (nach Nürnberger <i>et al.</i> 2004) .....	2
Abbildung 1.2.1:	„Zickzack“-Modell der pflanzlichen Immunantwort (nach Jones und Dangl 2006)....	3
Abbildung 1.2.2:	Mechanismen der Erkennung von effektor-modifiziertem RIN4 Protein (Jones und Dangl 2006) .....	5
Abbildung 1.3.1:	Modell der PAMP-Erkennung und Signaltransduktion in Pflanzen am Beispiel des Elicitors Flagellin (Ingle <i>et al.</i> 2006).....	9
Abbildung 2.5.1:	Lokalisation von T-DNA und Primern für die Genotypisierung.....	29
Abbildung 3.2.1:	<i>Microarray</i> -Daten und RT-PCR nach Infiltration von Wildtyppflanzen mit verschiedenen <i>Pseudomonas</i> Stämmen.....	38
Abbildung 3.2.2:	<i>DRK5-Microarray</i> -Daten nach Hormonbehandlung von Col-0 .....	40
Abbildung 3.2.3:	Auswirkung von abiotischem Stress auf die <i>DRK5</i> -Expression in Col-0.....	41
Abbildung 3.2.4:	Genstruktur und Lokalisation der T-DNA-Insertion im <i>DRK5</i> -Gen .....	41
Abbildung 3.2.5:	PCR zur Genotypisierung der <i>DRK5</i> -defizienten Pflanzenlinien.....	42
Abbildung 3.2.6:	RT-PCR zum Nachweis von <i>DRK5</i> -Transkript .....	43
Abbildung 3.2.7:	Southern-Hybridisierungen mit einer T-DNA-spezifischen Sonde .....	44
Abbildung 3.2.8:	Bakterienwachstum nach Inokulation verschiedener <i>Pseudomonas</i> -Stämme .....	46
Abbildung 3.2.9:	Bakterielles Wachstum und Symptomatik nach <i>Pto</i> DC3000 Infektion .....	47
Abbildung 3.2.10:	Bestimmung des <i>Pto</i> DC3000-Wachstums nach Komplementation des <i>DRK5</i> -Gendefekts.....	48
Abbildung 3.2.11:	Keimung auf Abszissinsäure (ABA)-haltigem Medium.....	49
Abbildung 3.2.12:	Keimungsexperiment auf NaCl haltigem Medium .....	51
Abbildung 3.2.13:	Domänenstruktur des DRK5-Proteins .....	52
Abbildung 3.2.14:	Lokalisation der DRK5 in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten.....	53
Abbildung 3.2.15:	Lokalisation der DRK5 in <i>Arabidopsis</i> Blattmaterial .....	54
Abbildung 3.2.16:	LRR-Domänenstruktur .....	54
Abbildung 3.2.17:	Sequenzabgleich der DRK5-Kinasedomäne mit der verwandter Proteine .....	55
Abbildung 3.2.18:	<i>in vitro</i> Kinaseaktivitätstest der DRK5-Kinasedomäne .....	57
Abbildung 3.3.1:	<i>Microarray</i> -Daten und RT-PCR nach Infiltration mit verschiedenen <i>Pseudomonas</i> Stämmen.....	58
Abbildung 3.3.2:	Wurzelspezifische <i>DRK6</i> -Induktion unter Salzstress .....	59
Abbildung 3.3.3:	Genstruktur und Positionen der T-DNA-Insertionen im <i>DRK6</i> -Gen .....	60
Abbildung 3.3.4:	Genotypisierung der <i>DRK6</i> -defizienten Pflanzenlinie <i>drk6-1</i> .....	61
Abbildung 3.3.5:	Genotypisierung der <i>DRK6</i> -defizienten Pflanzenlinie <i>drk6-2</i> .....	61
Abbildung 3.3.6:	RT-PCR zum Nachweis des <i>DRK6</i> -Transkriptes .....	62
Abbildung 3.3.7:	Southern-Hybridisierungen mit einer T-DNA-spezifischen Sonde .....	63
Abbildung 3.3.8:	Bakterienwachstum von <i>Pto</i> DC3000 und <i>Pph</i> .....	64

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.3.9:	Bakterienwachstum und Symptomatik nach <i>Pto</i> avrRpm1-Infektion.....	65
Abbildung 3.3.10:	<i>Pto</i> avrRpm1-Wachstum nach Komplementation des <i>DRK6</i> -Gendefekts .....	66
Abbildung 3.3.11:	Variation der <i>Pto</i> avrRpm1 Applikationsmethode.....	67
Abbildung 3.3.12:	Bakterienwachstum und Symptomatik nach <i>Pto</i> avrB-Applikation.....	68
Abbildung 3.3.13:	Analyse von Bakterienwachstum und Symptomatik nach <i>Pto</i> avrRpt2-Infektion....	69
Abbildung 3.3.14:	Expression der Markergene <i>RPM1</i> und <i>PR1</i> .....	70
Abbildung 3.3.15:	Keimungsexperiment auf NaCl-haltigem MS-Agar.....	71
Abbildung 3.3.16:	Domänenstruktur des <i>DRK6</i> -Proteins .....	73
Abbildung 3.3.17:	<i>DRK6</i> -Lokalisation in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten.....	73
Abbildung 3.3.18:	Zelluläre Lokalisation des <i>DRK6</i> -eGFP-Fusionsproteins in <i>Arabidopsis</i> -Blättern...	74
Abbildung 3.3.19:	Struktur der LRR-Domäne .....	75
Abbildung 3.3.20:	Sequenzvergleich der <i>DRK6</i> -Kinasedomäne mit der verwandter Proteine .....	76
Abbildung 3.3.21:	<i>in vitro</i> Kinaseaktivitätstest der <i>DRK6</i> -Kinasedomäne .....	77
Abbildung 3.3.22:	<i>in vitro</i> Kinaseaktivitätstest der verkürzten <i>DRK6</i> -Kinasedomäne .....	78
Abbildung 3.4.1:	ROS-Akkumulation nach <i>A. brassicicola</i> -Infektion .....	81
Abbildung 3.4.2:	Ausprägung <i>A. brassicicola</i> -induzierten Zelltods.....	81
Abbildung 3.4.3:	ROS-Bildung nach <i>Pto</i> DC3000-Infektion .....	82
Abbildung 3.4.4:	Zelltodausbildung nach <i>Pto</i> DC3000-Infektion .....	83
Abbildung 3.4.5:	DPI-abhängige ROS-Produktion nach <i>Pto</i> DC3000-Infektion .....	84
Abbildung 3.4.6:	DPI-Abhängigkeit des <i>Pto</i> DC3000-induzierten Zelltods.....	85
Abbildung 3.4.7:	<i>Pto</i> DC3000 Wachstum nach DPI-Applikation .....	86
Abbildung 3.4.8:	Ethylenbiosynthese nach <i>Pto</i> DC3000-Infektion .....	87
Abbildung 3.4.9:	Vergleich der in <i>bak1-3</i> verschieden zum Wildtyp exprimierten Gene in unbehandelten bzw. <i>A. brassicicola</i> behandelten Pflanzen .....	88
Abbildung 3.4.10:	Vergleich der Gene, welche in unbehandelten <i>bak1-3</i> -Pflanzen deregulierten sind mit Wildtyp-Pathogenexpressionsprofilen.....	89
Abbildung 3.4.11:	Vergleich der Genexpression in <i>bak1-3</i> mit brassinolidregulierten Genen in Col-090	
Abbildung 3.4.12:	Expression ausgewählter Markergene in unbehandelten <i>bak1-3</i> -Pflanzen .....	91
Abbildung 4.3.1:	Modell von BAK1 als Teil verschiedener Rezeptorkomplexe und Signalwege (Kemmerling und Nürnberger 2008).....	109
Abbildung 7.2.1:	SALK Southern-Sonde .....	B
Abbildung 7.2.2:	DSLox Southern-Sonde.....	C
Abbildung 7.3.1:	Promotorsequenz des <i>DRK5</i> -Gens .....	C
Abbildung 7.3.2:	<i>DRK5</i> -Gensequenz.....	D
Abbildung 7.3.3:	<i>DRK5</i> -Proteinsequenz mit vorhergesagter Domänenstruktur .....	E
Abbildung 7.4.1:	<i>DRK6</i> -Gensequenz.....	F



## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1.1:	Abkürzungen der Aminosäuren .....	9
Tabelle 1.1.2:	Abkürzungen der organischen Basen .....	9
Tabelle 2.1.1:	Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien .....	15
Tabelle 2.1.2:	Nährmedien .....	16
Tabelle 2.4.1:	Verwendete Bakterienstämme.....	23
Tabelle 2.4.2:	Verwendete Plasmide .....	24
Tabelle 7.1.1:	verwendete Primer.....	A
Tabelle 7.5.1:	Liste der Gene, welche in unbehandelten <i>bak1-3</i> -Pflanzen unterschiedlich reguliert sind als in Col-0 .....	G
Tabelle 7.5.2:	Liste der Gene, welche nach <i>Alternaria</i> Infektion in <i>bak1-3</i> unterschiedlich reguliert sind im Vergleich zu Col-0.....	I

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABA	Abszisisäure ( <i>abscisic acid</i> )	MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>
<i>abi1-1</i>	ABA-insensitiv 1-1	MAPK/MPK	<i>Mitogen-activated protein-Kinase</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure	MeJa	Methyljasmonsäure
<i>acd</i>	<i>accelerated cell death</i>	MEKK	MAPK-Kinase-Kinase-Kinase
ACS	ACC-Synthase	MKK	MAPK-Kinase
AS	Aminosäuren	NB-LRR	<i>nucleotide-binding leucine-rich receptor-like kinase</i>
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NDR1	<i>non-race-specific disease resistance 1</i>
Avr	Avirulenzfaktor	NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
BAK1	BRI1-associated receptor-kinase 1	PAMP	pathogen-associated molecular pattern
BASTA	Glufosinat-Ammonium	Pc	<i>Petroselinum crispum</i> (Petersilie)
bp	Basenpaare	PCD	<i>programmed cell-death</i>
BRI1	<i>brassinosteroid-insensitiv 1</i>	PCR	<i>polymerase-chain reaction</i>
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>	PR	<i>pathogenesis-related</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	PRR	<i>pattern recognition receptors</i>
CEBiP	<i>chitin oligosaccharide elicitor-binding protein</i>	PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
CERK	<i>chitin elicitor receptor kinase</i>	<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
CNGC	<i>cyclic-nucleotide-gated channel</i>	RBOH	<i>respiratory burst oxidase homologous</i>
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid	R-Gen	Resistenzgen
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RNA	Ribonukleinsäure
<i>dnd1</i>	<i>defense, no death</i>	R-Protein	Resistenzprotein
DPI	Diphenylen Iodonium	RIN4	<i>RPM1-interacting protein 4</i>
DRK	<i>defense-related receptor-like kinase</i>	RLK	<i>receptor-like Kinase</i>
EFR	Elongationsfaktor-Tu Rezeptor	RNA	Ribonukleinsäure
eGFP	<i>enhanced green-fluorescing protein</i>	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
EIX	<i>ethylen-inducing xylanase</i>	RPM1	<i>resistant to Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> 1 (identisch mit RPS3)
ETI	<i>effector triggered immunity</i>	RPS2	<i>resistant to Pseudomonas syringae 2</i>
ETS	<i>effector triggered susceptibility</i>	RRS1	<i>resistant to Ralstonia solanacearum 1</i>
FLS2	<i>Flagellin sensitive 2</i>	RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
GA3	Gibberellinsäure	SA	Salizylsäure
GBP	β-Glukan-bindendes Protein	SERK	<i>somatic embryogenesis receptor-like Kinase</i>
HR	hypersensitive Reaktion	T3SS	Typ III-Sekretionssystem
IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated Kinase</i>	TB	Trypanblau
JA	Jasmonsäure	TIR	Toll-Interleukin 1 Rezeptor
kDa	Kilodalton	TLR	Toll-ähnliche Rezeptoren
Le	<i>Lycopersicon esculentum</i> (Tomate)		
LPS	Lipopolysaccharid		
LRR	<i>leucine-rich repeat</i>		
<i>Isd</i>	<i>lesions simulating disease</i>		

**Tabelle 1.1.1: Abkürzungen der Aminosäuren**

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

**Tabelle 1.1.2: Abkürzungen der organischen Basen**

<b>Purine</b>		<b>Pyrimidine</b>	
<b>A</b>	Adenin	<b>C</b>	Cytosin
<b>G</b>	Guanin	<b>T</b>	Thymin

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Konzept der angeborenen Immunität

Als Immunität bezeichnet man die Fähigkeit eines Organismus Infektionen durch Pathogene zu vermeiden, bzw. diese erfolgreich abzuwehren. Alle multizellulären eukaryotischen Systeme sind in der Lage, über Mechanismen der angeborenen Immunität potentielle Krankheitserreger wahrzunehmen und mit geeigneten Maßnahmen zu reagieren. Nur in kiefertragenden Wirbeltieren (*Gnathostomata*) wird die angeborene Immunität durch das evolutionär weit jüngere Konzept des adaptiven Immunsystems ergänzt. Eine gemeinsame Strategie der angeborenen Immunität ist die Erkennung von mikrobe- bzw. pathogenassoziierten molekularen Mustern (MAMPs oder auch PAMPs). Unter diesen werden konstitutive, hochkonservierter Epitope zusammengefasst, die von essentieller Wichtigkeit für den pathogenen Organismus sind, in dieser Form nicht im Wirt vorkommen und damit die Unterscheidung zwischen fremden Organismen und den eigenen Zellen ermöglichen (Akira *et al.* 2006; Ferrandon *et al.* 2007; Medzhitov 2007). Zu den PAMPs welche sowohl in Vertebraten als auch Nonvertebraten erkannt werden, gehören unter anderem das Lipopolysaccharid (LPS) Gram-negativer und das Peptidoglykan Gram-positiver Bakterien, eubakterielles Flagellin, pilzliche Zellwandbestandteile wie Chitine, Mannane und Glukane oder pilzliche Zellwandproteine sowie unmethylierte bakterielle DNA-Fragmente (Aderem und Ulevitch 2000; Girardin *et al.* 2002; Ferrandon *et al.* 2007). Viele dieser PAMPs sind auch als Elicitoren der pflanzlichen Immunantwort bekannt (Felix *et al.* 1999; Dow *et al.* 2000; Brunner *et al.* 2002; Newman *et al.* 2002; Nürnberger und Brunner 2002; Underhill und Ozinsky 2002; Felix und Boller 2003; Kunze *et al.* 2004; Gust *et al.* 2007). Eine zentrale Rolle in der PAMP-Perzeption spielen Rezeptoren der Familie der LRR-Proteine (Abbildung 1.1.1). Aufgrund ihrer Gemeinsamkeiten zu dem *Drosophila* Rezeptor Toll, wurden die verwandten Proteine in Vertebraten als Toll-ähnliche Rezeptoren bezeichnet (TLRs). Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit leuzinreichen Wiederholungen (LRRs), welche die Erkennung von PAMPs wie Lipoproteinen, Peptidoglykan, Lipopolisacchariden bzw. Proteinen wie Flagellin ermöglicht und einer intrazellulären TIR-Domäne (*Drosophila Toll and human interleukin-1 receptor*), die für die Interaktion mit Adapterproteinen und der damit verbundenen Rekrutierung von Kinasen der IRAK (Interleukin-1 rezeptorassoziierte Kinase)-Familie verantwortlich ist (Underhill und Ozinsky 2002; Akira und Takeda 2004; Cook *et al.* 2004). Die pflanzlichen LRR-Domänen tragenden Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptor*), FLS2 und EFR,

unterscheiden sich in ihrem modularen Aufbau ein wenig von ihren tierischen Verwandten Toll bzw. TLRs (Abbildung 1.1.1). Sie besitzen zwar ebenfalls eine extrazelluläre LRR-Domäne, welche jedoch über die Transmembrandomäne direkt mit einer Kinasedomäne der IRAK-Familie verknüpft ist. Außerdem ist beispielsweise das in Säugern durch TLR5 erkannte Flagellinpeptid ein anderes, als das in Pflanzen durch FLS2 (*flagellin-insensitiv 2*) wahrgenommene (Donnelly und Steiner 2002; Smith *et al.* 2003). Im modularen Aufbau zeigen demnach pflanzliche und tierische Organismen sehr ähnliche Strategien in Pathogenerkennung und Auslösung von Abwehrmechanismen (Girardin *et al.* 2002). Eine genauere Betrachtung zeigt jedoch, dass sich die beiden Signaltransduktionsmechanismen vermutlich durch konvergente Evolution entwickelt haben (Ausubel 2005; Nürnberger und Lipka 2005).

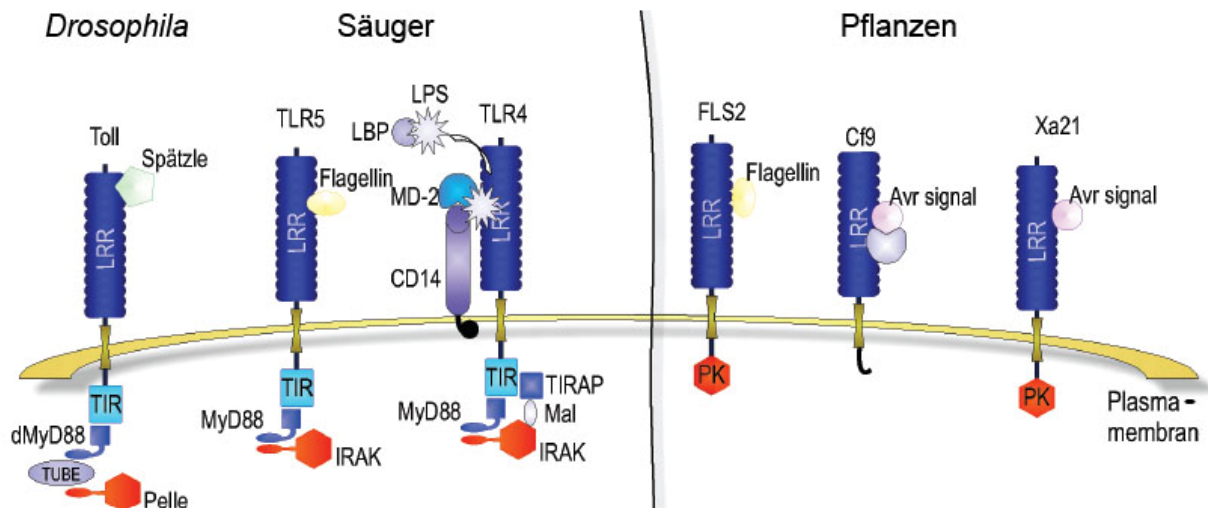
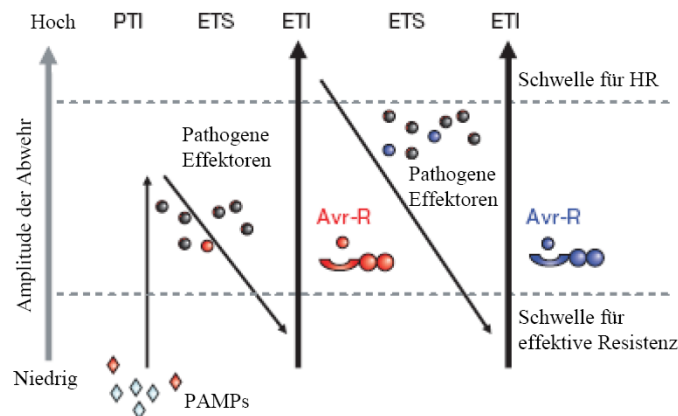


Abbildung 1.1.1: Grundstruktur von LRR-Rezeptorproteinen der angeborenen Immunität in Insekten, Säugetieren und Pflanzen (nach Nürnberger *et al.* 2004)

## 1.2 Grundprinzipien der pflanzlichen Immunität

Pflanzen sind wie Tiere beständig von potentiellen Krankheitserregern, wie Pilzen, Oomyzeten, Bakterien, Viren, Viroiden und Parasiten wie Nematoden und Insekten, umgeben. Es kommt jedoch nur vergleichsweise selten zum Ausbruch einer Krankheit, da sie sich kontinuierlich durch eine Bandbreite physikalischer und chemischer Barrieren schützen (Hammond-Kosack und Jones 1996). Einerseits beeinträchtigt die wachshaltige Oberfläche der Kutikula ein Anheften von Mikroorganismen und das Eindringen in die Pflanzenzelle wird durch Zellwandverstärkungen mit Lignin erschwert (Ride 1983). Auf der anderen Seite

verhindern antibiotische Enzyme (z.B. Lipidtransferproteine, LTPs), Peptide und nichtproteino- gene Sekundärmetabolite (Phytoantizipine, VanEtten *et al.* 1994) auf chemische Weise eine Ausbreitung der Erreger (Heath 2000; Dixon 2001; Kamoun 2001; Nürnberger *et al.* 2004). Diese permanent erstellten Barrieren sind eng mit induzierbaren Mechanismen der angeborenen Immunität vernetzt (Nürnberger *et al.* 2004).



**Abbildung 1.2.1: „Zickzack“-Modell der pflanzlichen Immunantwort (nach Jones und Dangl 2006)**

Die pflanzliche Immunität besteht aus zwei konzeptionell und evolutionär verknüpften Teilen (Abbildung 1.2.1). Die primäre Immunantwort ermöglicht die Erkennung von PAMPs durch PRRs was zur Aktivierung von Abwehrantworten führt, warum sie auch als PAMP- ausgelöste Immunität bezeichnet wird (*PAMP-triggered immunity*, PTI; Medzhitov und Janeway 2002). Sie ist das Fundament der Resistenz ganzer Pflanzenspezies gegenüber mikrobiellen Infektionen, was auch als Spezies- oder Nichtwirtsimmunität bezeichnet wird. Außerdem bildet sie die Basisresistenz in suszeptiblen Wirtspflanzen (Nürnberger und Lipka 2005; Bittel und Robatzek 2007). Neben den bereits beschriebenen exogenen PAMPs (Kapitel 1.1) ermöglichen endogene Elicitoren eine Erkennung der Pathogenpräsenz. Zu diesen zählen Oligosaccharide, die beim Abbau der pflanzlichen Zellwand durch ein Pathogen freigesetzt werden und eine pflanzliche Abwehrreaktion auslösen (Jones und Takemoto 2004; Vorwerk *et al.* 2004). Bisher ist nicht klar, ob die Fähigkeit einiger Pflanzen mehrere Elicitoren eines Pathogens zu perzipieren eine Art Absicherung darstellt, um bei Fehlen eines einzelnen die Erkennung des Pathogens weiterhin zu gewährleisten, oder ob ihre Zusammensetzung die Stärke der Abwehr bestimmt (Underhill und Ozinsky 2002).

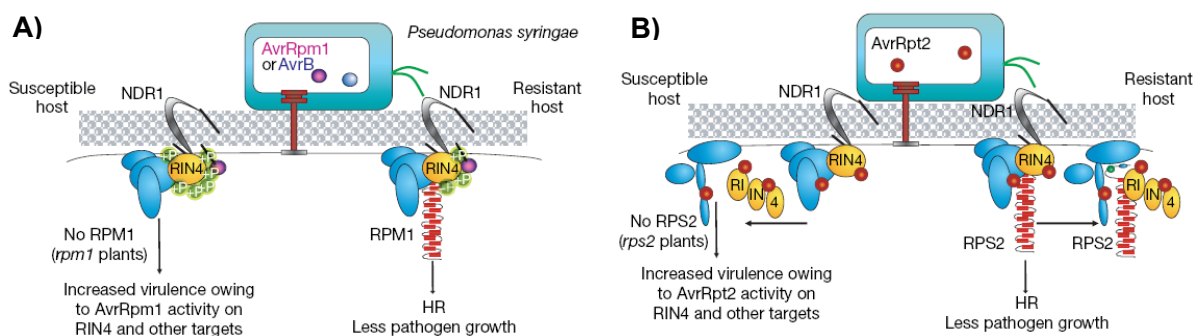
Der am besten untersuchte pflanzliche PAMP-Rezeptor ist FLS2 (Gomez-Gomez und Boller 2000). Er bindet ein Erkennungsmotiv des bakteriellen Flagellinmoleküls von

22 Aminosäuren (flg22, Asai *et al.* 2002; Zipfel *et al.* 2004; Chinchilla *et al.* 2006). Nach der Stimulation mit flg22 erfolgt die Internalisierung von FLS2 und die Aktivierung von Abwehrantworten (Gomez-Gomez *et al.* 2001; Asai *et al.* 2002; Robatzek *et al.* 2006). Ein weiteres Beispiel für einen PAMP-Rezeptor in *Arabidopsis* ist der Elongationsfaktor-Tu (EF-Tu)-Rezeptor (EFR, Kunze *et al.* 2004; Zipfel *et al.* 2006). Obwohl es sich bei bakteriellem Flagellin und EF-Tu um sehr unterschiedliche Elicitoren handelt, lösen sie doch sehr ähnliche Veränderungen im Genexpressionsmuster aus (Zipfel *et al.* 2006). Man geht daher davon aus, dass die PAMP-induzierte Abwehr auf einer begrenzten Zahl von Signalwegen basiert die zur Ausprägung allgemein konservierter Abwehrreaktionen führen (Jones und Dangl 2006, Kapitel 1.3).

Einige Pathogene sind in der Lage, die PAMP-induzierte Immunantwort zu umgehen bzw. zu beeinträchtigen, um die Pflanze erfolgreich zu infizieren. Diesen Prozess bezeichnet man auch als effektorvermittelte Suszeptibilität (ETS). Er äußert sich in der Ausbildung von Krankheitssymptomen (Prell und Day 2000). Neben der toxinvermittelten Unterdrückung immunassoziierter pflanzlicher Reaktionen (Feys *et al.* 1994; Mittal und Davis 1995; Melotto *et al.* 2006) ist eine allgemeine Strategie die Unterdrückung der PTI durch Beeinflussung zentraler Prozesse der Signaltransduktion mit Hilfe von virulenzinduzierenden Effektormolekülen, welche auch Pathogenizitäts- bzw. Virulenzfaktoren genannt werden (Cohn *et al.* 2001; Abramovitch und Martin 2004; Alfano und Collmer 2004; Nomura *et al.* 2005; Nomura *et al.* 2006; Speth *et al.* 2007). Gram-negative Bakterien verwenden zur Translokation von Effektoren in das Wirtszellinnere das Typ III-Sekretionssystem (T3SS, He *et al.* 2004). Es wird durch einige der Gene des so genannten *hrp* (*hypersensitive response and pathogenicity*)-Clusters kodiert (Galan und Collmer 1999; Kjemtrup *et al.* 2000). Sie sind an der Ausbildung einer Pilusstruktur beteiligt, welche über ringförmige Proteinkomplexe in den Bakterienmembranen verankert ist (Roine *et al.* 1997; He *et al.* 2004). Über diesen Pilus werden Effektoren in das Zellinnere der Pflanze geschleust. Ein prominentes Beispiel für solche Effektoren sind AvrPto und das mit ihm funktionell verwandte Protein AvrPtoB (Abramovitch *et al.* 2003). Durch Bindung an die Proteinkinasedomäne pflanzlicher Rezeptorkinasen wie FLS2, EFR und LeFLS2 (Xiang *et al.* 2008) hemmen sie die Aktivierung der PAMP-induzierten MAPK-Kaskade (Kapitel 1.3) und blockieren somit die pflanzliche PTI (Hauck *et al.* 2003; de Torres *et al.* 2006; He *et al.* 2006).

Der mit der ETS verbundene evolutionäre Anpassungsdruck hat auf Seiten suszeptibler Wirtspflanzen zur Ausprägung kultivar- bzw. ökotypspezifischer Immunitäten geführt. Der Pflanze ist es dabei durch Koevolution mit dem jeweiligen Erreger gelungen, die Anwesenheit von Effektor- oder Avirulenzproteinen (Avr-Proteine) des Pathogens mittels komplementärer

Resistenzproteine (R-Proteine) zu perzipieren und entsprechende Abwehrmaßnahmen auszulösen (Flor 1955; Person 1959; Schneider 2002). Man bezeichnet diesen Vorgang auch als effektorvermittelte Immunität (ETI, Abbildung 1.2.1), R-Gen-vermittelte Resistenz oder auch Rasse-Kultivar-spezifische bzw. Gen-für-Gen-Resistenz. Die dabei ablaufenden Reaktionen ähneln denen der PTI, sie werden jedoch schneller aktiviert, zeichnen sich durch eine höhere Intensität aus und resultieren in der Ausbildung hypersensitiven Zelltods (HR, Agrios 1988) an der Infektionsstelle (Abbildung 1.2.1). Für einige *Avr*-Genprodukte konnte eine direkte Interaktion mit einem pflanzlichen R-Protein gezeigt werden wie z.B. Pto und AvrPto (Scofield *et al.* 1996; Tang *et al.* 1996), Pi-ta und Avr-Pita (Jia *et al.* 2000) oder AvrL und L (Dodds *et al.* 2004; Catanzariti *et al.* 2006; Dodds *et al.* 2006). Eine zweite Gruppe der R-Proteine interagiert mit pflanzlichen Proteinen, welche durch das Avr-Protein modifiziert werden (Mackey *et al.* 2002; Axtell und Staskawicz 2003; Mackey *et al.* 2003). Beispiele hierfür sind AvrRpm1 bzw. AvrB und RPM1/RPS3 (Bisgrove *et al.* 1994; Grant *et al.* 1995) oder AvrRpt2 und RPS2 (Bent *et al.* 1994; Mindrinos *et al.* 1994). Diese Theorie der Erkennung von Avirulenzprodukten über die Effektorwirkung bzw. –interaktion mit seinem Zielprotein wird auch als *guard*-Hypothese bezeichnet (Van der Biezen und Jones 1998; Dangl und Jones 2001). Dieses Konzept der Erkennung des „pathogeninduziert modifizierten Selbst“ ermöglicht einerseits dem Pathogen durch Entwicklung verschiedener Effektoren ein und dasselbe Wirtsprotein unterschiedlich zu modifizieren, andererseits die Entstehung mehrerer pflanzlicher NB-LRR Proteine, welche die Wirkung dieser multiplen Effektoren auf das gemeinsame Zielprotein erkennen. Sie stellt damit einen stabilen, dauerhaften und evolutionär ökonomischen Schutz vor der Beeinträchtigung zellulärer Abwehrmaßnahmen durch Effektoren dar (Jones und Dangl 2006).



**Abbildung 1.2.2: Mechanismen der Erkennung von effektormodifiziertem RIN4 Protein (Jones und Dangl 2006)**

**A)** Die Modifikation von RIN4 durch die Avirulenzfaktoren AvrRpm1 bzw. AvrB wird durch RPM1 erkannt und pflanzliche Abwehrreaktionen ausgelöst. **B)** Die Spaltung von RIN4 durch den Effektor AvrRpt2 löst die RPS2 vermittelte ETI aus.



Ein bekanntes Beispiel für solch ein Zielprotein ist RIN4 (Abbildung 1.2.2). RIN4 ist essentiell für die pflanzliche Entwicklung, eine Nullmutation erweist sich als embryolethal (Mackey *et al.* 2003). Bisher sind zwei verschiedene Strategien bekannt, die Funktion von RIN4 durch bakterielle Effektoren zu beeinflussen. Einerseits die AvrRpm1- bzw. AvrB- (Abbildung 1.2.2, A; Mackey *et al.* 2002) und andererseits die AvrRpt2- (Abbildung 1.2.2, B; Axtell und Staskawicz 2003) vermittelte Virulenz. In resistenten Kultivaren mit dem entsprechenden R-Protein kommt es zur bisher mechanistisch unverstandenen Erkennung der effektorvermittelten Manipulation von RIN4 durch das R-Protein. Diese resultiert in kultivarspezifischer Immunität (ETI). Die Avirulenzfaktoren AvrRpm1/AvrB verursachen beispielsweise die Phosphorylierung von RIN4 (Mackey *et al.* 2002), wodurch das R-Protein RPM1 aktiviert wird. Andererseits löst die Freisetzung der putativen Cysteinprotease AvrRpt2 durch das Bakterium (Axtell *et al.* 2003) den posttranskriptionellen Abbau von RIN4 aus, was durch das R-Genprodukt RPS2 registriert wird, welches wiederum die ETI aktiviert (Axtell und Staskawicz 2003; Mackey *et al.* 2003; Kim *et al.* 2005).

### 1.3 Prinzipien der Pathogenerkennung und pathogenvermittelten Signaltransduktion

Anders als das menschliche Immunsystem, verfügen Pflanzen nicht über mobile Abwehrzellen oder ein adaptives Immunsystem. Jede einzelne Zelle muss im Falle einer drohenden Infektion in der Lage sein, sich mit dem ihr zur Verfügung stehenden Mitteln der angeborenen Immunität zu verteidigen und systemische Signale an die Nachbarzellen weiterzugeben. Dafür stehen der Pflanze eine Reihe verschiedener Rezeptoren und Signalwege zur Verfügung.

Eine Möglichkeit der Einteilung pflanzlicher Rezeptoren ist die nach ihrer Funktion in der Pathogenabwehr. Im Prinzip verfügen Pflanzen über zwei verschiedene Arten von Rezeptoren für die Pathogenerkennung. Die eine Gruppe besteht aus Transmembranrezeptoren (RLKs) welche extrazellulär PAMPs erkennen und auch als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRRs) bezeichnet werden (siehe auch Kapitel 1.1). Obwohl bereits relativ viele PAMPs identifiziert und charakterisiert werden konnten, ist über die entsprechenden pflanzlichen Rezeptoren wenig bekannt. Für das *Phytophthora* PAMP Pep13 (Nürnberg *et al.* 1994) konnten über Quervernetzung zu Petersiliezellmembranen Bindeproteine von 100 kDa und 145 kDa gefunden werden (Nennstiel *et al.* 1998), die Charakterisierung des Rezeptor steht jedoch noch aus. Des Weiteren konnte in Sojabohne ein  $\beta$ -Glukan-bindendes Protein (GBP) identifiziert werden (Mithöfer *et al.* 2000). Es verfügt über eine intrinsische 1,3- $\beta$ -Glukanase-Aktivität welche wahrscheinlich die verstärkte

Freisetzung des Oligoglukosid-Elicitors aus der pilzlichen Zellwand katalysiert. Aufgrund einer fehlenden Domäne zur Signalübertragung vermutet man, dass es Bestandteil eines größeren Rezeptorkomplexes ist (Fliegmann *et al.* 2004). Ein weiteres Beispiel ist der Rezeptor des pilzlichen Elicitors Xylanase EIX (*ethylen-inducing xylanase*) aus Tomate (Ron und Avni 2004). Er besitzt ein Leuzinzippermotiv, eine extrazelluläre LRR-Domäne und ein intrazelluläres Endozytosesignal. Vor kurzem war es außerdem möglich in Reis und *Arabidopsis* die Erkennung des pilzlichen Elicitors Chitin durch die Proteine CEBiP bzw. CERK1 nachzuweisen (Kaku *et al.* 2006; Miya *et al.* 2007). CERK1 ist eine aktive Rezeptorkinase, und besitzt zur Bindung des Chitins eine extrazelluläre LysM-Domäne. Das LysM-Motiv ist bereits aus den putativen Nod-Faktor-Rezeptorkinasen bekannt, welche die Signaltransduktion zwischen Leguminosen und Wurzelbakterien vermitteln, und damit zur Etablierung einer Symbiose beitragen (Truchet *et al.* 1991). Am besten beschrieben wurde der pflanzliche Flagellinrezeptor FLS2 (*flagellin-insensitiv 2*, Kapitel 1.2). Bei ihm handelt es sich um eine LRR-RLK (*leucin-rich receptor-like kinase*), wobei die Perzeption des minimalen Motivs flg22 über die LRR-Domäne erfolgt (Chinchilla *et al.* 2006). Ein weiterer Vertreter der abwehrrelevanten LRR-RLKs ist der PAMP-Rezeptor EFR (Elongationsfaktor-Tu-Rezeptor), welcher das minimale Motiv elf18 des Elongationsfaktors Tu erkennt (Kunze *et al.* 2004; Zipfel *et al.* 2006). Neben der Perzeption von PAMPs sind membranständige Rezeptorproteine ebenfalls an der Avr-Proteinerkennung beteiligt. Dazu zählen einerseits Mitglieder der LRR-RLKs, wie Xa21, Xa26 und Pi-d2 aus Reis, sowie Gersten-RPG1 (Bruggeman *et al.* 2002; Sun *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006). Auf der anderen Seite sind aber auch rezeptorähnliche Proteine (LRR-RPs) wie Xa21D aus Reis und Cf-9 aus Tomate involviert (Jones *et al.* 1994; Wang *et al.* 1998; Shiu und Bleecker 2003). Diese besitzen zwar ebenfalls eine extrazelluläre LRR-Domäne, ihnen fehlt jedoch eine intrazelluläre Domäne zur Signalvermittlung.

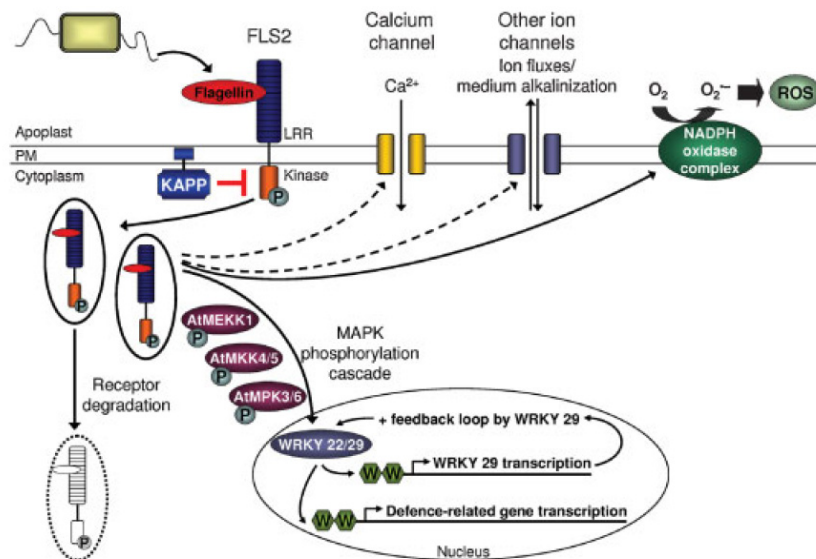
Die intrazelluläre Erkennung von pathogenen Effektoren (AVR-Proteinen) im Rahmen der ETI erfolgt in Pflanzen hauptsächlich durch die R-Proteine. Von den in *Arabidopsis* etwa 149 exprimierten R-Genen gehört der überwiegende Teil der Gruppe der NB-LRRs an (*nucleotide binding site leucine-rich repeat*; Jones und Dangl 2006). Diese Rezeptoren sind mit den Säugetierproteinen der CARD/NOD (*caspase recruitment domain/nucleotide-binding oligomerisation domain*)-Familie verwandt, welche ebenfalls in der angeborenen Immunität eine Rolle spielen (Inohara und Nunez 2003). In ihrem Grundaufbau bestehen sie aus einer aminoterminalen TIR (*Drosophila* Toll und Säuger Interleukin 1 Rezeptor), CC (*coiled-coil*) oder Leuzin-*Zipper*-Domäne. An diese schließt sich die NB (nukleotidbindende)-Domäne an, welche ATP oder GTP binden kann, diese hydrolysiert und somit ein Signal freigesetzt wird

(Saraste 1999; Tao *et al.* 2000; Tameling *et al.* 2002). Darauf folgt die LRR-Domäne deren aminoterminaler Teil die Aktivierung des Proteins moduliert, während der carboxyterminale Bereich für die Effektorerkennung und die Interaktion mit Regulatoren verantwortlich ist (Tanabe *et al.* 2004). Beispiele für NBS-LRR-Proteine aus *Arabidopsis* sind auf der einen Seite die TIR-Domänen tragenden Resistenzproteine RPP5 und RPS4, auf der anderen Seite die stattdessen mit einem CC versehenen NBS-LRRs wie RPM1, RPP8, RPS5 und RPS2 (Nürnberger *et al.* 2004). Das ebenfalls zytosolische Pto aus Tomate, welches für die Erkennung von AvrPto aus *P. syringae* nötig ist (Kapitel 1.2), bildet eine strukturelle Ausnahme. Es zeigt keine NBS-LRR Struktur, sondern besteht nur aus einer Kinasedomäne (Scofield *et al.* 1996).

Eine der ersten beobachtbaren Reaktionen auf Pathogenbefall ist die veränderte Permeabilität der Plasmamembran für bestimmte Ionen (Abbildung 1.3.1). So lassen sich ein verstärkter Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{H}^+$  und ein erhöhter Ausstrom von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Ionen messen (Jabs *et al.* 1997; Zimmermann *et al.* 1997; Blatt *et al.* 1999; Lee *et al.* 2001). Dies führt einerseits zu einer Alkalisierung des Apoplasten, andererseits hat die erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einen Einfluss auf die Aktivität von calciumabhängigen Proteinkinasen (CDPKs, Romeis *et al.* 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein elicitorinduziert erhöhter Calciumspiegel den so genannten *oxidative burst* auslöst (Blume *et al.* 2000). Dabei werden durch NADPH-Oxidasen Calcium- und NADPH-abhängig reaktive Sauerstoffspezies (ROS) freigesetzt (Nürnberger und Scheel 2001).

Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$ , im Apoplasten ist ebenfalls eine der ersten Reaktionen nach der Pathogenerkennung durch die Pflanzenzelle (Doke 1983; Auh und Murphy 1995; Grant *et al.* 2000; Scheel 2001). Bereits die Elicitierung mit pathogenassoziierten molekularen Mustern (PAMPs) ist in der Lage den *oxidative burst* auszulösen (Levine *et al.* 1994; Park *et al.* 1998).  $\text{H}_2\text{O}_2$  verursacht dabei nicht nur die Quervernetzung von Zellwandstrukturproteinen (Bradley *et al.* 1992; Brisson *et al.* 1994; Lamb und Dixon 1997), die Synthese antimikrobieller Lipidperoxide bzw. das Entstehen von Membranschäden, woraus sich seine antimikrobielle Wirkung ergibt (Hammond-Kosack und Jones 1996; Lamb und Dixon 1997; Montillet *et al.* 2005). Es dient auch als lokaler Auslöser des programmierten Zelltods (PCD, Dangl *et al.* 1996; Greenberg 1996; Beers und McDowell 2001; Greenberg und Yao 2004). Andererseits ermöglicht es als diffusibles Signal die Induktion von Abwehrgenen umgebender Zellen (Levine *et al.* 1994; Dangl *et al.* 1996) und hat neben der Etablierung lokaler Barrieren eine Funktion in der Aktivierung von systemischer Resistenz (SAR; Dangl *et al.* 1996; Alvarez *et al.* 1998). Untersuchungen

haben gezeigt, dass die pathogeninduzierte ROS-Produktion vermutlich hauptsächlich durch plasmamembranständige NADPH-Oxidasen und zellwandlokalisierte Peroxidasen katalysiert wird (Grant *et al.* 2000; Bolwell *et al.* 2002). Die Funktion der NADPH-Oxidasen kann durch DPI (Diphenylen Iodonium) gehemmt werden, wodurch auch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zurückgeht (Desikan *et al.* 1996; Grant *et al.* 2000).



**Abbildung 1.3.1: Modell der PAMP-Erkennung und Signaltransduktion in Pflanzen am Beispiel des Elicitors Flagellin (Ingle *et al.* 2006)**

Neben der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ist eine weitere verbreitete Reaktion auf einen Pathogenangriff die verstärkte Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion mit Hilfe von NO-Synthasen (NOS; Delledonne *et al.* 1998; Klessig *et al.* 2000; Wendehenne *et al.* 2002). In Homologie zur Wirkung in tierischen Systemen konnte dabei auch in Pflanzen die NO-induzierte Katalyse der sekundären Botenstoffe cADP und cGMP gezeigt werden (Durner *et al.* 1998). Sie stimulieren die Öffnung bestimmter Ionenkanäle wie CNGC2 (*cyclic-nucleotide-gated channel 2*), welches den Fluss von Kationen reguliert (Köhler *et al.* 1999). Eine Mutante dieses Kanals, *dnd1* (*defense, no death*), zeigt erhöhten Salizylsäuregehalt, verstärkte systemische Resistenz und ist nicht mehr in der Lage nach Infektion mit avirulenten Pathogenen den programmierten Zelltod auszulösen (Clough *et al.* 2000).

Als Antwort auf die Inokulation verschiedener Pathogene und PAMPs konnte weiterhin eine posttranslationale, transiente Aktivierung von mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPK, MPK) nachgewiesen werden (Nürnberger und Scheel 2001; Zhang und Klessig 2001; Jonak *et al.* 2002; Nürnberger und Lipka 2005). So resultiert beispielsweise die FLS2-vermittelte

Flagellinperzeption in der Aktivierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren über eine MAPK-Kaskade (Abbildung 1.3.1, Asai *et al.* 2002, Ingle *et al.* 2006).

Es ist seit langem bekannt, dass in pflanzlichen Abwehrprozessen der angeborenen Immunität verschiedene Phytohormone als primäre Botenstoffe dienen (Durrant und Dong 2004; Pieterse und Van Loon 2004; Chern *et al.* 2005; Kim *et al.* 2005). Sie können einerseits in der pflanzlichen Abwehr involviert sein, dienen aber auch der Etablierung verschiedener Resistenzformen. Die Produktion des Phytohormons Salizylsäure (SA) wird vor allem bei der Abwehr von biotrophen bzw. hemibiotrophen Krankheitserregern ausgelöst (Ryals *et al.* 1996), während JA traditionell mit der Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen in Zusammenhang gebracht wird. Das Phytohormon Ethylen wirkt meist synergistisch mit JA und antagonistisch zu SA (Feys und Parker 2000; Kunkel und Brooks 2002). Es wird jedoch auch ein Einfluss von Ethylen auf den Abszisin säure (ABA)-Stoffwechsel vermutet (Ghassemian *et al.* 2000). ABA wirkt scheinbar als negativer Regulator des SA-Signalwegs nach *Pto*-Infektion (Mohr und Cahill 2007). Auf der anderen Seite unterdrückt eine Applikation von ABA die Ethylen/JA-vermittelte Induktion von Abwehrgenen (Anderson *et al.* 2004).

Nach der Erkennung eines Pathogens und der Vermittlung eines Signals werden in der Pflanzenzelle verschiedene Abwehrreaktionen ausgelöst. Dazu gehört in einigen Fällen die Ausbildung einer HR (Dangl *et al.* 1996; Heath 2000). Diese ist durch einen schnellen Ablauf und die lokale Begrenzung auf die Infektionsstelle gekennzeichnet. Das Ziel dabei ist, mit dem Abtöten der Zelle auch das angreifende Pathogen zu zerstören bzw. ihm die Nahrungsgrundlage zu entziehen und damit dessen Ausbreitung zu verhindern (Holub *et al.* 1994). Weiterhin ist in einigen Fällen die Verstärkung von Zellwänden durch Lignifizierung, Suberinisierung sowie Papillenbildung an der Infektionsstelle durch Kalloseauflagerung und der Einbau von Stoffen wie oxidierten Phenolen zu beobachten. Weiterhin werden Stoffe mit antimikrobieller Wirkung synthetisiert, wie Flavonoide, Terpenoide, Lektine, Phenylpropanoide oder Enzyminhibitoren (Prell 1996). Einige dieser Stoffe fasst man unter dem Begriff Phytoalexine zusammen. Dies sind Mitglieder einer heterogenen Gruppe niedermolekularer Stoffe, deren Biosynthese nach Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanstoffwechsels ausgelöst wird (Logemann *et al.* 1987). Zusätzlich synthetisiert die Pflanze Enzyme, welche die Zellwandstrukturen von Pathogenen angreifen wie Chitinasen oder Glukanasen. Die Funktionen der meisten dieser PR (*pathogenesis-related*)-Proteine sind bisher jedoch weitgehend unbekannt (van Loon und van Kammen 1970; van Loon 1990; van Loon und van Strien 1999). Allgemein werden sie als kleine (15 bis 40 kD) Proteine mit stark saurem oder

basischem isoelektrischem Punkt charakterisiert. Sie sind säurestabil und beständig gegenüber Proteinasen. Ursprünglich wurden sie als Tabak-Mosaik-Virus (TMV)-induzierte Proteine definiert (van Loon und van Kammen 1970), später jedoch auf weitere Pathogene ausgeweitet (van Loon 1990; Sela-Buurlage *et al.* 1993). Anhand von strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten wurden sie in 14 Familien unterteilt, von denen jedoch nur fünf genauer charakterisiert sind.

Unabhängig davon ob es sich um eine Nichtwirts- oder rassenspezifische Erkennung handelt, kann es zur Ausprägung lokaler (LAR = *local acquired resistance*, Ross 1961a) bzw. systemischer (SAR = *systemic acquired resistance*, Ross 1961b) Resistenzen kommen, die einen Schutz der Pflanze gegen nachfolgende Infektionen gewährleisten. Bisher kennt man mindestens drei Signalwege, die zur Etablierung systemischer Resistenz führen (Hammond-Kosack und Jones 1997). Die salizylsäureabhängigen Resistenzmechanismen (Ryals *et al.* 1996), die ethylen- bzw. jasmonsäurevermittelten Reaktionen (Penninckx *et al.* 1996; Penninckx *et al.* 1998) und die Ausbildung systemischer Resistenz nach Interaktion mit nichtpathogenen Wurzelbakterien (ISR = *induced systemic resistance*, Pieterse *et al.* 1996). Letzterer ist ebenfalls von Jasmonsäure und Ethylen abhängig und kann gleichzeitig mit der SAR aktiviert werden, was z. B. in einer additiv verstärkten Resistenz von *Arabidopsis* gegenüber *Pseudomonas syringae* resultiert (van Wees *et al.* 2000).

### 1.4 LRR-RLKs

Die größte Gruppe von Transmembranrezeptoren in *Arabidopsis* stellt mit 235 Mitgliedern die Familie der leuzinreichen Rezeptorkinasen (LRR-RLKs) dar (Shiu und Bleecker 2001b; Shiu und Bleecker 2003). Sie verfügen über eine LRR-Domäne, welche aus unterschiedlich vielen leuzinreichen Wiederholungen von etwa 24 Aminosäuren Länge mit der Konsensussequenz --L--L--L--L--L--L--N-L-G-IP besteht („-“ bezeichnet variable Aminosäuren). Durch diese abwechselnden  $\beta$ -Faltblatt/ $\beta$ -Turn/ $\alpha$ -Helix Strukturen entsteht, je nach Zahl der Wiederholungen, in der Tertiärstruktur eine Hufeisenform, in deren innerer Furche vermutlich der jeweilige Ligand bindet (Kobe und Deisenhofer 1993; Jones und Jones 1997). Oft ist die LRR-Domäne von Cysteinpaaren amino- bzw. carboxyterminal flankiert. Diese werden für die Fähigkeit der Dimerisierung verantwortlich gemacht (Torii 2004).

Die Kinasedomäne pflanzlicher LRR-RLKs gehört zu der monophyletischen Serin-Threonin-Kinasegruppe. Kinasedomänen lassen sich in 11 Subdomänen unterteilen, welche in unterschiedlichem Maße für Nukleotidbindung, Substratspezifität und Katalyse verantwortlich sind (Hanks *et al.* 1988). Zwischen den Domänen VII und VIII befindet sich die so genannte Aktivierungsschleife. Die Phosphorylierung dieser Schleife ist in vielen Kinasen

entscheidend für deren Aktivität (Adams 2003). Kinasen, welche durch diesen *loop* reguliert werden, weisen typischerweise einen Argininrest (R) in Unterdomäne VI auf, der ebenfalls wichtig für ihre katalytische Aktivität ist (Johnson *et al.* 1996). Prinzipiell unterscheidet man zwischen Kinasen mit Arginin-Asparaginsäure (RD) oder ohne (nicht-RD) in dieser Region. Nur vergleichsweise wenige Kinasen (in *Arabidopsis* 10 %, Reis 29 % aller Kinasen) sind nicht-RD Kinasen. Ein Großteil der PRRs gehört jedoch zu dieser Gruppe (Dardick und Ronald 2006). In Pflanzen zählen FLS2, PR5K, Xa21, Xa26, Pi-2d und LRK10 zu den nicht-RD Kinasen (Gomez-Gomez und Boller 2002, Wang *et al.* 1996, Song *et al.* 1995, Sun *et al.* 2004, Dardick und Ronald 2006, Feuillet *et al.* 1997). Alle anderen pflanzlichen Rezeptorkinasen mit bekannter Funktion sind RD-Kinasen. Sie sind in Prozessen wie Entwicklung, Pollenerkennung, Hormonperzeption, allgemeiner Stress- und Wundantwort, Pathogenabwehr oder Symbiose involviert (Jones und Jones 1997; Torii 2000; Torii und Clark 2000; Bishop und Koncz 2002; Gomez-Gomez und Boller 2002; Kistner und Parniske 2002; Dardick und Ronald 2006).

Einer der am besten aufgeklärten Funktionsmechanismen einer LRR-RLK ist die Erkennung von Brassinolid durch den BRI1-BAK1-Komplex. In dem aktuell anerkannten Modell für die BRI1-vermittelte BR-Signaltransduktion ist Brassinolid in der Lage als Molekül allein oder in einem Steroid-Protein-Komplex an die Inseldomäne und die 22. leuzinreiche Wiederholung (LRR) von BRI1 zu binden (Wang *et al.* 2001; Kinoshita *et al.* 2005). Dadurch wird die Dissoziation des BRI1-Repressors BKI1 ausgelöst (Wang und Chory 2006). Die Bindung von BL induziert innerhalb des BRI1-BAK1-Heterodimers die Transphosphorylierung, sowie die Phosphorylierung weiterer, zum Teil unbekannter Signalproteine, welche die Expression BR-responsiver Gene auslösen (Li *et al.* 2002; Nam und Li 2002; He *et al.* 2005; Wang *et al.* 2005a; Yin *et al.* 2005).

## 1.5 BAK1 – eine LRR-RLK mit multipler Funktion

Das erste Mitglied der SERK-Familie wurde ursprünglich in Karotte als Markergen des Übergangs von somatischen in embryonale Zellen in Zellsuspensionskulturen gefunden (Schmidt *et al.* 1997). Spätere Untersuchungen in *Arabidopsis* zeigten jedoch, dass die Funktionen dieser Proteinfamilie weit vielschichtiger sein können. Am besten beschrieben ist AtSERK3 (*somatic embryogenesis receptor-like kinase 3*), welches auch als BAK1 (BRI1-assoziierte Rezeptorkinase) bezeichnet wird (Hecht *et al.* 2001). Es besitzt eine relativ kurze extrazelluläre Domäne mit nur 5 leuzinreichen Wiederholungen. An diese schließt sich eine Transmembrandomäne an, welche die LRR-Domäne mit der intrazellulären Kinasedomäne verbindet. BAK1 gehört zur LRR II Unterfamilie und zählt aufgrund des Arginin-Asparaginsäure (RD) Motivs in der katalytischen Domäne zu den RD-Kinasen.

Bisherige Studien weisen darauf hin, dass BAK1 in der Brassinolid-abhängigen Signaltransduktion und der damit verbundenen Regulation des pflanzlichen Wachstums eine wichtige Rolle spielt. Dazu bildet es mit dem Brassinosteroidrezeptor BRI1 (Li und Chory 1997) *in vitro*, *in vivo* und im Hefedihibridsystem Heterodimere (Li *et al.* 2002; Nam und Li 2002). BAK1 ist jedoch nicht der einzige BRI1-Interaktor aus der SERK-Familie (Rusinova *et al.* 2004; Karlova *et al.* 2006). Es konnte gezeigt werden, dass SERK1 ebenfalls in den BRI1-Komplex involviert ist (Karlova *et al.* 2006). Sobald BRI1 und BAK1 koexprimiert werden, erfolgt eine verstärkte Internalisierung der beiden plasmamembranständigen Proteine in die Endosomen, welche vermutlich in ihrem Abbau resultiert (Friedrichsen *et al.* 2000; Li *et al.* 2002; Rusinova *et al.* 2004). Vermutlich dient BAK1 somit der Feineinstellung der BR-Signaltransduktion über die Regulierung von plasmamembranlokalisiertem BRI1. Des Weiteren scheint BAK1 an der Regulierung der Photomorphogenese beteiligt zu sein (Whippo und Hangarter 2005). Es wird diskutiert, ob der dabei beobachtete Effekt mit seiner Rolle in der Brassinolidperzeption zusammenhängt.

Die Tatsache, dass BAK1 *in vivo* mit dem Flagellinrezeptor FLS2 in flagellinabhängiger Weise heterodimerisiert (Chinchilla *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007), weist außerdem auf eine Rolle dieses Proteins in der Regulation der Pathogenabwehr hin. Während in Wildtyppflanzen die Applikation der Elicitoren flg22 und elf26 den *oxidative burst* auslöst, ist dieser Prozess in *bak1*-Mutanten verzögert und abgeschwächt (Chinchilla *et al.* 2007). Daneben ist die verminderte Endozytose von FLS2 in flg22-stimulierten *bak1-3*-Pflanzen zu beobachten (Chinchilla *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007).

Unabhängige Untersuchungen konnten zeigen, dass BAK1 ebenso an der brassinolid-unabhängigen Auslösung von pathogeninduziertem Zelltod beteiligt ist (He *et al.* 2007;



Kemmerling *et al.* 2007, Teilaspekte dieser Arbeit). Ein *BAK1*-Gendefekt verursacht die unkontrollierte Ausbreitung von Zelltod nach Infektion mit hemibiotrophen Bakterien und nekrotrophen Pilzen, welcher jedoch nicht wie bei *lesion-mimic* Mutanten (Lam 2004) durch SA induziert werden kann (Kemmerling *et al.* 2007). Interessant ist, dass Doppelmutanten mit dem nächsten Paralogen von BAK1, BKK1 (SERK4), nicht nur drastisch reduziertes Größenwachstum zeigen, sondern unter anderem auch spontanen Zelltod ausbilden, was auf eine redundante Wirkung beider Proteine in Brassinolidperzeption und Zelltodregulation schließen lässt (He *et al.* 2007).

### 1.6 Ziele der Arbeit

Pflanzen besitzen ein breites Spektrum an zytosolischen und membranständigen Rezeptoren. Eine große Gruppe unter ihnen bilden die membranständigen leuzinreichen Rezeptorkinasen (LRR-RLKs). Man geht davon aus, dass die LRR-RLKs an Prozessen der pflanzlichen Entwicklung und Stressadaptation beteiligt sind. Sie spielen auf allen Ebenen der Pathogenabwehr eine Rolle. So sind sie an der Perzeption endogener und exogener Elicitoren an der Zelloberfläche und der Auslösung der PAMP-vermittelten Immunität (PTI) beteiligt. Außerdem ermöglichen sie die Erkennung von Avirulenzfaktoren und die darin resultierende Effektor-vermittelte Immunität (ETI), wie beispielsweise Xa21. Bisher ist für einige wenige LRR-RLKs eine Funktion bei Verwundung, Prozessen der Pflanze-Pathogen-Interaktion bzw. der Etablierung von Symbiosen gezeigt worden (Gomez-Gomez *et al.* 1999; Scheer und Ryan 2002; Stracke *et al.* 2002). Im Rahmen des AFGN-Projektes der DFG sollten die Aufgaben weiterer Vertreter dieser Proteinfamilie genauer untersucht werden. Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der reversen Genetik die Funktion ausgewählter, pathogenresponsiver LRR-RLKs in der angeborenen Immunität nachzuweisen.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Alle Laborchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von ICN (jetzt MP-Biomedicals; Eschwege) Amersham Pharmacia Biotech (jetzt General Electrics, Freiburg), Biorad (München), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, NL) oder Sigma (Steinheim) geliefert. Organische Lösungsmittel wurden von den Firmen Brenntag Chemiepartner GmbH NL (Plochingen), Fluka und Merck bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien stammen von Difco Lab. (Detroit, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck, Sigma, und Duchefa (Haarlem, NL). Nukleinsäure modifizierende Enzyme wurden von Biomaster (Köln), Invitrogen, Stratagene (La Jolla, USA), New England Biolabs (Beverly, USA), Promega (Mannheim) und Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Blottingmembranen sowie Radiochemikalien wie  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dATP}$  sowie  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  wurden von Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) geliefert. Autoradiographien wurden mittels des Phosphorimagers Storm II der Firma Molecular Dynamics - Amersham Pharmacia detektiert.

#### **2.1.2 Nährmedien**

Zu Selektionsmedien (Tabelle 2.1.2) wurde nach Abkühlen auf 55 °C das jeweilige Antibiotikum in den in Tabelle 2.1.1 angegebenen Konzentrationen zugegeben.

**Tabelle 2.1.1: Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien**

<b>Antibiotikum</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	50 µg/µl
Cycloheximid	50 µg/µl
Gentamycin	25 µg/µl
Kanamycin	50 µg/µl
Rifampicin	50 µg/µl (aus 25 mg/ml in Methanol)
Spectinomycin	100 oder 200 µg/µl
Tetracyclin	12,5 µg/µl (aus 12,5 mg/ml in Ethanol)

Die Tabelle 2.1.2 fasst häufig verwendete Nährmedien zusammen. Für feste Nährböden wurde 15 g/l Bacto-Agar und für MS-Agar 8 g/l Agar-Agar verwendet.

**Tabelle 2.1.2: Nährmedien**

Medium	Inhaltsstoffe
LB	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
King's B	20 g/l Glycerol; 40 g/l Proteose-Peptone 3; nach dem Autoklavieren 10 ml/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> und 10 ml/l MgSO <sub>4</sub> steril filtriert zugeben
½ MS	2,2 g/l MS-Salz (Sigma, Duchefa); pH 5,7 mit KOH einstellen
MSCol	4,3 g/l MS-Salz (Invitrogen); 1 mg/l Nikotinsäure; 1 mg/l Pyridoxin-HCl; 1 mg/l Thiamin-HCl; 100 mg/l myo-Inositol; 30 g/l Saccharose; pH 5,8; nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 mg/l 2,4-D (1 mg vorgelöst in 1 ml Ethanol)
SOB	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 0,5 g/l NaCl; 2,5 mM KCl (vorgelöst); pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und auf 0,4 M MgCl <sub>2</sub> zugeben
SOC	2,0 g/l Trypton; 0,5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl (vorgelöst); pH 7 mit NaOH einstellen; autoklavieren und 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM α-D-Glukose steril filtriert zugeben
Sakai	34 g/l frisch gemahlene Bohnenmehl; 17 g/l Haferkleie mit Keim (Alnatura); 8,5 g/l Saccharose; auf ca. 1 l Wasser auffüllen; aufkochen, ½ h bei 95 °C quellen lassen, durch ein Metallsieb rühren, auf 1 l mit Wasser auffüllen und autoklavieren
PD/PDB	12 g/l PD (Kartoffel-Glukose, Duchefa)

## 2.2 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

### 2.2.1 Verwendete Pflanzen

Für die Versuche an Pflanzen wurden entweder Wildtyppflanzen der Spezies *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia 0* (Col-0) bzw. 2 (Col-2) verwendet oder die entsprechenden gendefizienten (*knockout*)-Linien, bei denen das jeweilige Gen durch Insertion einer *T*-DNA inaktiviert wurde (Kapitel 2.2.2). Zusätzlich standen die kommerziell verfügbaren gendefizienten Linien *abi1-1* (Abzissinsäure-insensitiv 1 Achard *et al.* 2006), *sos1-1* (*salt overly sensitive 1* (Wu *et al.* 1996)), *a11r* und *a11* (*rpm1* und der korrespondierende Hintergrund in Col-0; Tornero *et al.* 2002a) zur Verfügung. Weiterhin wurden in dieser Arbeit Linien erzeugt, die einen Gendefekt komplementieren (DRK5 bzw. DRK6, Kapitel 2.2.3). Die Aussaat wurde, wie bei den einzelnen Experimenten beschrieben, entweder auf vorher

dampfsterilisierter GS90-Erde (Gebr. Patzer) gemischt mit Vermikulit oder auf ½ MS-Agar durchgeführt. Anschließend wurden die Samen zur Stratifikation für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Anzucht erfolgte entweder in einer Pflanzenkammer unter Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) bei 130 µmol/m<sup>2</sup>s und einer Temperatur von ca. 22 °C oder im Pflanzenschrank (Percival, CLF) unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) bei 130 µmol/m<sup>2</sup>s, 22 °C und einer Luftfeuchte von 40-60 %.

### **2.2.2 Geninaktivierung durch T-DNA-Insertion**

Die in dieser Arbeit beschriebenen gendefizienten Linie *drk5*, *drk6-1*, *drk6-2*, *bak1-3* und *bak1-4* wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC, <http://nasc.nott.ac.uk>) zur Verfügung gestellt. Bei *drk5* (N580404), *drk6-1* (N591274), *bak1-3* (N534523) und *bak1-4* (N616202) handelt es sich um Linien des Salk Instituts (Baulcombe *et al.* 1986; Alonso *et al.* 2003). Das Gen der LRR-RLKs ist in den im jeweiligen Kapitel beschriebenen Stellen durch die T-DNA unterbrochen (Kapitel 3.2.3, 3.3.3 und 3.4). Die WiscDsLox Linie *drk6-2* (N856397) wurde im Col-2 Hintergrund wie in Woody *et al.* 2006 beschrieben erzeugt.

### **2.2.3 Komplementation der DRK-Gendefekte**

Für die Komplementation der DRK-Gendefekte in *drk5* und *drk6-2* wurden die promotorbeinhaltenden Vollängensequenzen des jeweiligen Gens mit den Primern attB1At1g66830-P und attB2At1g66830-MS bzw. attB1At5g25930-P und attB2At5g25930-MS von genomischer DNA amplifiziert (Kapitel 2.5.7, Anhang 7.1). Mit Hilfe der Gateway-Technologie (Kapitel 2.5.15) wurden diese Sequenzen in die binären Expressionsvektoren pBGW (*DRK5*) bzw. pGWB (*DRK6*) kloniert und in *E. coli* DH5α transformiert (Kapitel 2.4.2 und 2.4.4.1). Nach Reisolierung des Plasmids (Kapitel 2.5.2.1) wurde dieses in *Agrobacterium* GV3101 transformiert (Kapitel 2.4.4.2). Mit diesen wurden *Arabidopsis drk5*- bzw. *drk6-2*-Pflanzen transformiert (Kapitel 2.2.6) und das daraus erhaltene Saatgut mittels BASTA (Glufosinat-Ammonium) bzw. Kanamycin selektioniert.

### **2.2.4 Arabidopsis Zellkulturbedingungen und Protoplastierung**

Für die Lokalisierung der verschiedenen DRKs *in vivo* wurden *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia 0* (Col-0) Protoplasten aus Zellkultur genutzt. Die Zellen wurden im Dunkeln bei 26 °C und 120 upm in MSCol-Medium angezogen, wobei einmal wöchentlich 15 ml Kultur in 35 ml frisches Medium umgeimpft wurden. Die Protoplasten wurden nach dem Protokoll von Negrutiu (Negrutiu *et al.* 1987) aus dieser Zellkultur präpariert.

### **2.2.5 Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten**

Die Zellen einer 3 Tage alten Vorkultur wurden geerntet (400 x g, 5 min) und mit Puffer (8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 x 7 ml Zellwandverdauungspuffer (1 % Zellulase; 0,25 % Mazerozym; 8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) aufgenommen und auf einer Petrischale verteilt. Nach 6-stündiger Inkubation bei 26 °C und 50 upm wurden die Protoplasten geerntet und wieder in Zellwandverdauungspuffer ohne Enzyme gewaschen. Das Zellpellet wurde in der verbleibenden Lösung vorsichtig resuspendiert und mit 10 ml W5-Lösung (154 mM NaCl; 125 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mM KCl; 5 mM  $\alpha$ -D-Glukose; pH 5,8-6,0) equilibriert. Von einem Aliquot wurde nach erneuter Aufnahme in W5-Lösung die Zellzahl bestimmt. Nach Zentrifugation der Protoplasten wurde das Pellet zu einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  pps/ml in MMM-Lösung (15 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 % MES; 0,5 M Mannitol; pH 5,8) aufgenommen und zu 250  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Zu einem Aliquot wurden 30  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gegeben, langsam 250  $\mu\text{l}$  PEG-Lösung (40 % PEG 4000; 0,4 M Mannitol; 0,1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; pH 8,0-9,0) dazu pipettiert und 15 bis 20 min inkubiert. Nach und nach wurden 10 ml W5 Lösung zugegeben, anschließend abzentrifugiert und die Zellen in 2 ml K3 Lösung (1,5 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 9 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 25 g/l  $\text{KNO}_3$ ; 2,5 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1,34 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 2,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) bei 26 °C 20 h im Dunkeln inkubiert.

Im speziellen Fall wurden die Protoplasten mit der in den Vektor pK7FWG2 (Kapitel 2.4.2) über Gateway<sup>TM</sup>-Rekombination (Kapitel 2.5.15) klonierten cDNA der jeweiligen DRK transformiert. Als Positivkontrolle für die Transformationseffizienz wurde der Vektor cF203 (K. Schumacher), in welchem GFP5 (S65T) unter Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert wird, genutzt.

### **2.2.6 Transformation von *Arabidopsis*-Pflanzen mittels *Agrobacterium***

Mit selektionierten Agrobakterien (Kapitel 2.4.4.2) wurden die jeweiligen Pflanzenlinien wie in Bechtold *et al.* 1993 und Clough und Bent 1998 beschrieben über Eintauchen der Blüten in die Bakteriensuspension transformiert.

## 2.3 Phänotypische Analysen

### 2.3.1 Keimungs- und Wurzellängenexperimente

Die Bestimmung von Keimungsraten und Wurzelwachstum von *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia 0* (Col-0) und den *DRK*-defizienten Linien wurde auf 0,5 g/l MES-gepuffertem ½ MS-Medium (Duchefa) mit 0,8 % Agar-Select (Sigma) vorgenommen. Die zu testenden Stoffe wurden dem autoklavierten Medium steril filtriert zugesetzt. Zur Untersuchung des Wachstums bei Salzstress wurde 130 mM Natriumchlorid verwendet. Hinzu kamen Versuchsansätze mit den Phytohormonen Abszissinsäure (ABA, 1 und 2 µM) und Methyljasmonsäure (MeJa, 5 µM).

Die Samen wurden 10 min in einer Lösung aus 50 % Natriumhypochlorid und 0,1 % Triton X-100 oberflächensterilisiert, anschließend 7-mal mit sterilem Wasser gewaschen und auf ½ MS-Agar mit oder ohne die angegebenen Stressoren in Petrischalen ausgelegt. Die Keimlinge wurden nach zweitägiger Stratifikation im Pflanzenschrank (Percival) unter Langtagbedingungen angezogen. Anschließend wurde die Zahl aufgegangener Pflanzen, die mindestens 2 Blätter haben, ermittelt.

### 2.3.2 Pathogen-Test in planta

Um zu untersuchen, ob die *DRK*-defizienten Linien im Vergleich zu den Wildtyppflanzen eine erhöhte Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen aufweisen, wurden sechs Wochen alte, auf Erde angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen mit Bakterien bzw. Pilzen infiziert (siehe folgende Kapitel). Es handelt sich dabei um die Bakterienstämme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto* DC3000), *Pto* hrcC<sup>-</sup>, *Pto* avrRpm1, *Pto* avrB, *Pto* avrRpt2 und *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* (*Pph*). Weiterhin wurde die Infektiosität der biotrophen Pathogene *Erysiphe pisi* oder *Blumeria graminis*, sowie verschiedener *Colletotrichum* Arten wie *C. higginsianum*, *C. lagenarium*, *C. trifolii* oder *C. lindemuthianum* untersucht. Zusätzlich wurde die Ausbildung von Symptomen nach Applikation der nekrotrophen Pilze *Botrytis cinerea* und *Alternaria brassicicola* verfolgt.

### 2.3.3 Analyse des Bakterienwachstums in planta

Als Ausgangsmaterial wurden 6 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, die auf Erde ausgesät, stratifiziert und unter Kurztagbedingungen in einem Pflanzenschrank (Percival, CLF) angezogen wurden. Die verschiedenen *Pseudomonaden* (Kapitel 2.3.2)

wurden in eine 50 ml Übernachtkultur in King's B Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft und 16 h bei 28 °C und 200 upm inkubiert. Zur Verwendung wurden die Zellen bei 4 °C 6 min bei 1300 x g abzentrifugiert, zweimal in 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2 eingestellt. Dies entspricht einer Zellzahl von etwa 10<sup>8</sup> cfu/ml. Wenn nicht anders angegeben, erfolgte die Applikation über manuelle Infiltration. Dazu wurden die Zellen auf 10<sup>4</sup> cfu/ml verdünnt und in die Blattunterseiten der Pflanzen beidseitig der mittleren Blattachse mit einer nadellosen Spritze inokuliert. Alternativ wurden auch die Inokulation über Vakuuminfiltration und das Eintauchen der Pflanzen in die Bakteriensuspension, wie in Whalen *et al.* 1991 beschrieben, durchgeführt. Die Probennahme erfolgte nach 0, 1, 2 und 4 Tagen. Aus jedem infizierten Blatt wurden mit Hilfe eines Korkbohrers zwei Blattscheiben herausgetrennt und in ein mit 100 µl 10 mM Magnesiumchlorid gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Blattmaterial wurde mit einem geeigneten Handmörser zerkleinert, die Suspension in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agar (enthielten neben den bakterienspezifischen Antibiotika auch 50 µg/ml Cycloheximid) aufgetragen und 48 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Zellzahl bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurde das arithmetische Mittel gebildet, von dem sich dann auch die jeweilige Standardabweichung ableitet. Eine statistische Beurteilung wurde mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Kapitel 2.3.10.2) durchgeführt. Pro Zeitpunkt und Pathogen wurden jeweils 2 Blätter von 4 Pflanzen inokuliert (8 Parallelen). Die Zahl der unabhängigen Wiederholungen ist bei den Versuchen jeweils angegeben.

### **2.3.4 Analyse der Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen**

#### **2.3.4.1 Infektion mit *Alternaria brassicicola***

Die Sporenpreparation des nekrotrophen Pilzes *Alternaria brassicicola* erfolgte wie in Thomma *et al.* 1999 beschrieben. Die Sporen wurde auf je zwei Blättern der Pflanzen aufgebracht, indem je 5 µl einer Suspension von 5 \* 10<sup>5</sup> Sporen/ml in sterilem Wasser auf 6 bis 8 Stellen eines Blattes getropft und die Pflanzen unter 100 % Luftfeuchte gehalten wurden. Der Grad der Infektion wurde, wie in Kemmerling *et al.* 2007 beschrieben, ausgewertet.

#### **2.3.4.2 Infektion mit *Botrytis cinerea***

Die Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* erfolgte als Suspension von 5\*10<sup>5</sup> Sporen/ml in ¾ PDB-Medium. Pro Blatt wurden 5 µl pro Blattseite aufgetropft und die

Pflanzen anschließend bei 100 % Luftfeuchte inkubiert. Eine Auswertung der Symptomstärke erfolgte wie für *Alternaria brassicicola* beschrieben (Kapitel 2.3.4.1).

### **2.3.4.3 Infektion mit verschiedenen *Colletotrichum* Spezies**

Die Anzucht und Applikation der Sporen erfolgte wie es in O'Connell *et al.* 2004 beschrieben wurde. Für die Infektion wurden ca. 4 Wochen alte *Arabidopsis*-Pflanzen benutzt. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der makroskopisch sichtbaren Symptome.

### **2.3.4.4 Infektion mit *Erysiphe pisi* oder *Blumeria graminis***

Der mit *Arabidopsis thaliana* heterolog inkompatible Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* wurde auf seiner Wirtspflanze Erbse propagiert. Auf die ca. 4 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden möglichst gleichmäßig Sporen des biotrophen Pilzes verteilt, indem ein offener Karton über das Minigewächshaus gestülpt und darüber Sporen von den infizierten Erbsen abgeschüttelt wurden (*settling tower*-Methode). Das Minigewächshaus wurde nach einigen Minuten mit einem transparenten Deckel abgedeckt, um eine höhere Luftfeuchtigkeit zu gewährleisten, und die Pflanzen weiter unter den oben erwähnten Bedingungen angezogen. Die Auswertung erfolgte durch Vergleich der makroskopisch sichtbaren Symptome.

### **2.3.5 Anfärbung reaktiver Sauerstoffspezies mit 3,3'-Diaminobenzidin**

Die behandelten Blätter wurden von der Pflanze abgetrennt und mit 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Firma Sigma) ca. 2 min vakuumfiltriert. Anschließend wurde Färbelösung entfernt und das Material bei 100 % Luftfeuchte unter Lichtabschluss für etwa 5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 70 % Ethanol gestoppt und die Blätter durch mehrmaliges Wechseln dieser Lösung entfärbt. Die Visualisierung der Proben erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops.

### **2.3.6 Anfärbung toter Zellen mit Trypanblau**

Nach Behandlung des Blattmaterials wurde dieses von der Pflanze abgetrennt, 30 s in Trypanblaulösung (10 ml Milchsäure, 10 ml Glycerol, 10 ml Aqua-Phenol, 10 ml Wasser, 300 mg Trypanblau, 80 ml Ethanol) in einem kochenden Wasserbad gefärbt und die Färbelösung entfernt. Die Entfärbung der Blätter erfolgte unmittelbar im Anschluss durch Zugabe von 1 g/l Chloralhydratlösung (Sigma) und Inkubation über mehrere Tage mit mehrmaligem Wechsel der Lösung.



### **2.3.7 Ethylenbestimmung**

Pro Probe wurde nach Behandlung jeweils 1 Blatt abgetrennt, in ein 5 ml Glasgefäß mit 50 µl Wasser gestellt und luftdicht verschlossen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit einer Spritze 1 ml der Gasphase entnommen und über quantitative Gaschromatographie die Ethylenkonzentration ermittelt.

### **2.3.8 Laserbasierte Konfokalmikroskopie**

Für die Lokalisation der RLK *in vivo* in Protoplasten wurde ihre kodierende Sequenz mit Unterstützung durch das Gateway™-System in den Vektor pK7FWG2 (Kapitel 2.4.2) rekombiniert (Kapitel 2.5.15) und in Col-0-Protoplasten transformiert (Kapitel 2.2.5). Die eGFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins wurde mit Hilfe des Laserkonfokalmikroskops TCS SP2 der Firma LEICA und der vom Hersteller mitgelieferten Software visualisiert. Dabei wurde das eGFP mit einem Argon/Krypton Laser bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht im Wellenlängenbereich von 500 bis 600 nm gemessen.

### **2.3.9 Plasmolyseexperimente**

Für die Ablösung der Zellmembran von der Zellwand wurden die Blätter etwa 1 min in 850 mM NaCl Lösung mit 0,01 % Silwet inkubiert. Die Visualisierung erfolgte mit Hilfe eines LCS-Mikroskopes (Kapitel 2.3.8).

### **2.3.10 Statistik**

Die Auswertung der Daten erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit dem Programm Microsoft Office Excel (© Microsoft Corporation).

#### **2.3.10.1 Mittelwerte und Standardabweichungen**

Zur Auswertung von Genexpression, Pathogen- oder Pflanzenwachstum wurde aus den durch Mehrfachbestimmung erhaltenen Werten das arithmetische Mittel gebildet und diesem die jeweilige Standardabweichung zugeordnet.

#### **2.3.10.2 Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA)**

Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Wertepaaren zu ermitteln, wurden diese statistisch getestet. Dazu wurde die einfaktorielle/univariate Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) verwendet. Als signifikant wurden p-Werte von <0,01 eingeschätzt.

## 2.4 Allgemeine molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Verwendete Bakterien- und Pilzstämme

In Tabelle 2.4.1 sind die verwendeten Bakterienstämm mit ihren Genotypen aufgeführt.

**Tabelle 2.4.1: Verwendete Bakterienstämm**

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	F-( $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15) $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r K- m K+ ) deoR thi-1 phoA supE44 glnV44 $\lambda$ - gyrA96 relA1 F-
	DB3.1	RR1 gyrA endA recA Spec <sup>r</sup>
	BL21 AI	F-ompT hsdSb(rb-mb-) gal dcm araB:T7RNAP-tetA
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pph</i>	Rifr
	<i>Pto</i> DC3000	Rif <sup>r</sup> COR <sup>+</sup>
	<i>Pto</i> hrcC-	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> (nptII)
	<i>Pto</i> avrRpm1	pVSP61-avrRpm1, Rif <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
	<i>Pto</i> avrB	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>
	<i>Pto</i> avrRpt2	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3103:pMP90	T-DNA <sup>-</sup> vir <sup>+</sup> rif <sup>r</sup> , pMP90 gen <sup>r</sup>

Weiterhin wurden *Alternaria brassicicola* (MUCL 20297), *Botrytis cinerea* (B05-10), *Erysiphe pisi*, *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* K1 und verschiedene *Colletotrichum* Arten wie *C. higginsianum* (IMI349061), *C. lagenarium*, *C. trifolii* oder *C. lindemuthianum* verwendet.

### **2.4.2 Verwendete Plasmide**

In Tabelle 2.4.1 sind alle verwendeten Vektoren mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgelistet.

**Tabelle 2.4.2: Verwendete Plasmide**

<b>Vektor</b>	<b>Charakteristika</b>	<b>Verwendung</b>
pCR 2.1-TOPO (Invitrogen)	f1 ori pMB1 ori lacZ $\alpha$ MCS M13 T7 Promotor Kan <sup>r</sup> Amp <sup>r</sup>	PCR-Produkt Klonierungsvektor (mit Topoisomerase zur beschleunigten Ligation)
pDONR201 (Invitrogen)	ori pUC rrnB T2 rrnB T1 attP1 attP2 ccdB Cm <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Gent <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für Gateway <sup>TM</sup> -Klonierungen
pDEST15 (Invitrogen)	pT7 RBS GST-tag attR1 attR2 ccdB Cm <sup>r</sup> tT7 bla Promotor Amp <sup>r</sup> pBR322 origin ROP orf	Expressionsvektor für amino-terminale GST-Fusion
pK7FWG2	p35S t35S eGFP attR1 attR2 ccdB Cm <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Sm/Sp <sup>r</sup>	binärer Vektor für carboxy-terminale eGFP-Fusion Karimi <i>et al.</i> 2002
cF203	p35S GFP5 (S65T) trcbs p35S Kan <sup>r</sup>	Kontrolle für Lokalisations-experimente in Protoplasten (K. Schumacher)
pBGW	attR1 attR2 ccdB Cm <sup>R</sup> Sm/Sp <sup>r</sup> Bar	binärer Komplementationsvektor Karimi <i>et al.</i> 2005
pGWB1	attR1 attR2 ccdB Kan <sup>R</sup> Hyg <sup>R</sup>	binärer Komplementationsvektor Nakagawa <i>et al.</i> 2007

### **2.4.3 Anzucht der Mikroorganismen**

#### **2.4.3.1 Anzucht von *E. coli***

Wenn nicht anders angegeben, so wurden die verschiedenen *E. coli* Stämme entweder auf LB-Agar bei 37 °C 24 h oder in LB-Medium bei 37 °C bei ca. 180 upm kultiviert. Den Medien wurden, je nach Bakterienstamm und enthaltener Plasmid-DNA die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

#### **2.4.3.2 Anzucht von *Pseudomonas syringae* pv. *tomato***

Die *Pseudomonas*-Stämme wurden entweder auf King's B-Agar (für längere Aufbewahrung) oder aber LB-Agar (Bakterienwachstumsversuche) etwa 48 h bei 28 °C inkubiert. Die Kultivierung in flüssigem Medium erfolgte immer in King's B-Medium bei 28 °C und 200 upm. Den Medien wurden, je nach Bakterienstamm, die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

### **2.4.3.3 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens***

Die Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* erfolgte auf LB-Platten mit Rifampicin, Gentamycin und dem vektorspezifischen Antibiotikum bei 28 °C für etwa 48 h. Die Flüssigkultur wurde in LB-Medium mit den genannten Antibiotika bei 28 °C und 180 upm inkubiert.

### **2.4.3.4 Anzucht von Pilzen**

Um *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* Sporen für die Infektion von *Arabidopsis* anzuziehen, wurden die Pilze alternierend auf Sakai Agar und 1x PD-Agar bei RT unter weißem Fluoreszenzlicht mit Langtagwechsel etwa 14 Tage angezogen. Die Sporen konnten nach 14 Tagen geerntet werden, indem die Platten mit 0,1 % Tween 20 überschichtet und mit einem Drigalski-Spatel die Oberfläche abgerieben wurde. Das erhaltene Material wurde über Miracloth (Cal Biochem, LaJolla, USA) gefiltert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Sporenzahl wurde mit Hilfe der Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt, mit Wasser auf  $4 \cdot 10^7$  Sporen/ml eingestellt, 1 Vol. 50 % Glycerol zugesetzt und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

## **2.4.4 Transformationen**

### **2.4.4.1 *E. coli*-Transformation**

Für die Versuche wurden chemisch kompetente Bakterienzellen der Linie DH5 $\alpha$  verwendet. Dazu wurden DH5 $\alpha$ -Zellen in 250 ml SOB-Medium bei 18 °C und 200 upm über 24 h angezogen. Nach 10-minütiger Zentrifugation mit etwa 300 upm bei 4 °C wurde das Bakterienpellet mit 80 ml TB-Puffer (10 mM Pipes, 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 250 mM KCl, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 6,7) gewaschen. Es folgt eine erneute Zentrifugation mit anschließender Resuspendierung des Pellets in 20 ml TB-Puffer. Nach langsamer Zugabe von DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % wurde die Suspension in 200  $\mu$ l Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Diese wurden bei -80°C gelagert und bei Bedarf auf Eis aufgetaut. Die Plasmid-DNA wurde dazu pipettiert und das Gemisch erst 15 min auf Eis und anschließend 60 Sekunden in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden sofort 450  $\mu$ l SOC - Medium dazugegeben. Die Suspension wurde bei etwa 180 upm für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor 50  $\mu$ l und 450  $\mu$ l auf Petrischalen mit LB-Agar und den geeigneten Antibiotika ausplattiert wurden. Die Platten wurden für 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C gelagert.

### **2.4.4.2 *Agrobacterium*-Transformation**

Chemisch kompetente *Agrobacterien* (*Agrobacterium tumefaciens*, GV3101) wurden hergestellt, indem 200 ml LB-Medium mit einer 1 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 28 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,8 wachsen gelassen wurde. Nach Pelletieren und Waschen mit TE-Puffer wurden die Zellen in 0,1 Volumen LB-Medium resuspendiert. Aliquots von 250 µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Transformation wurde ein Aliquot kompetenter *Agrobakterien* (Stamm GV3103) mit 5 µg Plasmid-DNA versetzt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 min in flüssigem Stickstoff und dann 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Aliquots bei 22 °C für 3 h geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Zellen in 450 µl LB-Medium aufgenommen, 50 bzw. 400 µl auf LB-Agar mit den jeweiligen Antibiotika ausplattiert und bei 28 °C 48 h wachsen gelassen. Die anschließende Lagerung der Platten erfolgte bei 4 °C.

## **2.5 DNA-Analytik**

### **2.5.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen**

In ein 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 2 bis 3 frische Blätter gegeben und sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Das tiefgefrorene Material wurde mit einem kalten Kunststoffpistill gemörsert und 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 1,5 % SDS) direkt zugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation bei 65 °C wurden 300 µl 5 M Kaliumazetatpuffer (60 % 5 M Kaliumazetat; 11,5 % Essigsäure) zugesetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden alle festen Bestandteile abzentrifugiert (10 min, 20 800 x g, 4 °C) und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß umgefüllt. Nach Zugabe von 800 µl PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol, Verhältnis: 25:24:1) und vorsichtigem Mischen wurde erneut zentrifugiert (5 min, 20 800 x g, 4 °C) und der Überstand wieder in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol die DNA gefällt und anschließend abzentrifugiert. Das Nukleinsäure-Pellet wurde mit 500 µl 70 % Ethanol (-20 °C) kurz gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Trocknung das Pellet in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8 aufgenommen und bei 4 °C gelagert.

### **2.5.2 Bakterien (*E. coli*)-Plasmid-Präparation**

#### **2.5.2.1 Alkalische Lyse**

Für einfache Anwendungen, die einen hohen Probendurchsatz erfordern, wurde die Methode der alkalischen Lyse, modifiziert nach Birnboom und Doly 1979, verwendet. Die pelletierten Bakterien aus 2 ml Übernachtskulturen wurden in 100 µl Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 15 % Saccharose) aufgenommen, mit 200 µl alkalischer SDS-Lösung (200 mM NaOH; 1 % SDS) maximal 5 min lysiert und anschließend mit 150 µl Kaliumazetat-Puffer (60 ml 5 M Kaliumazetat; 11,5 ml Essigsäure; 28,5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>) versetzt. Die Zelltrümmer sowie die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert und die DNA aus dem wässrigen Überstand mit 0,6 Vol. Isopropanol gefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) oder 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen.

#### **2.5.2.2 QIAprep spin miniprep kit (QIAGEN)**

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Plasmid-DNA erfordern, wurde der *kit* der Firma QIAGEN nach den Angaben der Hersteller verwendet, wobei nach der alkalischen Lyse die DNA über einen säulenchromatographischen Schritt aufgereinigt und die DNA mit 50 µl Tris pH8,0 Wasser eluiert wird.

#### **2.5.2.3 Bakterien (*E. coli*)-Plasmid-Midipräparation**

Die Midipräparation erfolgte aus einer 100 ml Übernachtskultur mit Hilfe des QIAGEN Tip 100 Midiprep *kits* nach Angaben des Herstellers. Die isolierte DNA wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

#### **2.5.2.4 Agrobakterien-Plasmid-Minipräparation**

Zur Präparation der binären Plasmide aus Agrobakterien wurden 3 ml einer Übernachtskultur pelletiert und in 100 µl Lösung I (450 g/l Glukose; 20 g/l Lysozym in 0,25 M EDTA; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5), der frisch das Lysozym zugesetzt wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (200 µM NaOH, 1 % SDS) zugegeben und vorsichtig durch Umwenden gemischt. Nach Inkubation weiterer 30-60 min bei RT wurden 30 µl alkalisches Phenol (30 µl Phenol; 1,8 µl 1 N NaOH) zugesetzt, vermischt und sofort 150 µl Kaliumazetat-Puffer (3 M Kaliumazetat; 11,5 % Eisessig) zugegeben. Die Zelltrümmer und gefällte Proteine wurden abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol. PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde nochmals mit 1 Vol. Chloroform extrahiert und aus der resultierenden

wässrigen Phase wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol 5 min bei RT ausgefällt. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> oder TE-Puffer pH 7,5 (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) gelöst.

### **2.5.3 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung**

Die Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen wurden mittels eines Spektrophotometers (Ultrospec 2100 pro, Amersham) in einer Quarzküvette bei 260 nm ermittelt. Über die folgenden Formeln lässt sich die Konzentration der Lösungen errechnen:

dsDNA:  $E_{260}=1$  entspricht 50 µg/ml      RNA:  $E_{260}=1$  entspricht 40 µg/ml

### **2.5.4 DNA-Restriktionsanalyse**

Ein Gemisch von 1 bis 5 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10x Reaktionspuffer, 0,25 µl Restriktionsenzym und Wasser (auf 20 µl auffüllen) wurde bei 37 °C mindestens 4 h oder über Nacht inkubiert.

### **2.5.5 Fällung von DNA mit Ethanol**

Vor der eigentlichen Fällung der DNA konnte optional eine Reinigung über die PCI-Methode erfolgen (Southern-Hybridisierung). Dazu wurde das Volumen auf 150 µl aufgefüllt, 150 µl PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1) hinzugefügt und gut gemischt. Nach Zentrifugation (5 min, 12 000 upm, RT) wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Zu der DNA wurden 0,1 Vol. 3 M Natriumazetat und 2 Vol. kaltes 100 %iges Ethanol zugegeben und bis zu 12 h bei -20 °C inkubiert. Die DNA wurde abzentrifugiert (15 min, 20 000 x g, 4 °C) und das Pellet mit 70%igem Ethanol (-20 °C) gewaschen. Das luftgetrocknete Pellet wurde anschließend in 15 µl Wasser gelöst.

### **2.5.6 Fällung von DNA mit PEG**

Zu einem Aliquot DNA wurden 3 Vol. TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA; pH 8) und 2 Vol. 30 % PEG 8000 in 30 mM MgCl<sub>2</sub> gegeben. Nach Zentrifugation (10000 x g, 30 min, RT) wurde der Überstand verworfen, das Pellet luftgetrocknet und in ca. 20 µl TE-Puffer aufgenommen.

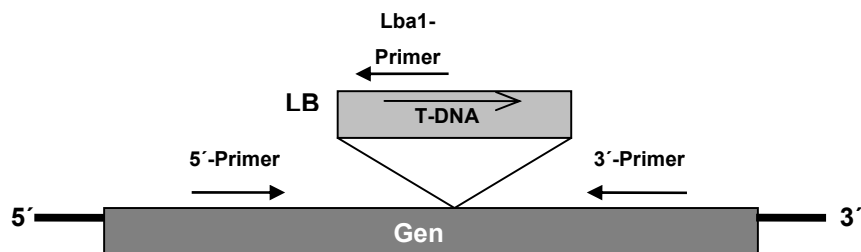
### **2.5.7 Polymerasekettenreaktion-PCR**

Eine Liste aller Primer und die dazugehörenden, in den Reaktionen verwendeten Anlagerungstemperaturen ( $T_{\text{anneal}}$ ) befindet sich im Anhang (s. 7.1).

Für Genotypisierungen und Verifizierungen mittels PCR wurde ein Gemisch aus <math>0,3 \mu\text{mol}</math> Plasmid - Minipräparation oder genomische DNA,  $0,5 \mu\text{M}</math> 5'- und 3'-Primer,  $0,5 \text{ mM}</math> dNTP-Gemisch,  $1\times</math> Taq-Puffer und  $0,05 \text{ U}/\mu\text{l}</math> Taq-Polymerase (Biomaster) folgendem Programm unterzogen:  $94 \text{ }^\circ\text{C}</math> 2:00 min, 20-40x:  $94 \text{ }^\circ\text{C}</math> 0:15 min,  $T_{\text{anneal}}</math> 0:30 min,  $72 \text{ }^\circ\text{C}</math> 1:00 min pro 1 kbp;  $72 \text{ }^\circ\text{C}</math> für 10 min,  $10 \text{ }^\circ\text{C}</math> für unbegrenzte Zeit. Das dazu verwendete Gerät (PTC-200) stammt von der Firma MJ Research (Waltham, USA).$$$$$$$$$$

### **2.5.8 PCR zur Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien**

Um sicherzustellen, dass die verwendeten Mutantenlinien die T-DNA-Insertion homozygot tragen, wurde von jeder Generation die genomische DNA von mindestens acht Pflanzen isoliert (Kapitel 2.5.1) und mit Hilfe geeigneter Primer auf das homozygote Vorkommen der T-DNA getestet.



**Abbildung 2.5.1: Lokalisation von T-DNA und Primern für die Genotypisierung**

Dazu wurden Primer verwendet, die 5' und 3' der T-DNA-Insertion liegen. Parallel dazu wurde der T-DNA-spezifische Lba1-Primer mit einem auf dem jeweiligen Gen bindenden Primer kombiniert (Abbildung 2.5.1). Die verwendeten Primerpaare sind jeweils angegeben.



### **2.5.9 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA**

Die Agarosegelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA in einer Matrix aus Agarose, bei der der prozentuale Anteil der Agarose die Maschenweite des Gels bestimmt. Durch das Anlegen einer Spannung an horizontale, pufferüberschichtete Gele können die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden.

Für die DNA-Trennung wurden 0,8-1,5 % ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer (aus 50x TAE-Puffer: 2 M Tris/Azetat pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0) bei einer Spannung von 60-100 V genutzt. Als Größenstandard wurde die 1 kb DNA-Leiter von Fermentas verwendet. Die Detektion der DNA-Banden erfolgte über die Zugabe einer Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) in die aufgekochte Agarose und Visualisierung auf einem UV-Transilluminator (Infinity-3026 WL/26 MX, Peqlab), der über ein Videosystem die Dokumentation der Gele erlaubte.

### **2.5.10 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden, angefärbt durch das Ethidiumbromid im Gel, unter UV-Licht aus Agarosegelen ausgeschnitten. Durch Adsorption der DNA an Glasmilch unter Verwendung des QIAEX II Agarose *gel extraction kits* (Qiagen) wurde die DNA aus der Agarosegelmatrix nach den Angaben des Herstellers isoliert.

### **2.5.11 Radioaktive Markierung von Nukleinsäure-Fragmenten**

Die DNA der Sonde für die DNA-Hybridisierung wurde mit Hilfe der angegebenen Primer (Anhang 7.2 und Tabelle 7.1.1) von genomischer DNA amplifiziert, über Agarosegelelektrophorese (Kapitel 2.5.9) gereinigt und aus dem Gel extrahiert (Kapitel 2.5.10). Mit Hilfe des *Megaprime DNA-labeling kits* (Amersham) wurde das Fragment mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Amersham) nach der Methode von Feinberg und Vogelstein 1984 radioaktiv markiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine anschließende Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) abgetrennt. Die Sequenzen der verwendeten Sonden befinden sich im Anhang 7.2.

### **2.5.12 DNA-Hybridisierung (Southern-Hybridisierung)**

Pflanzliche DNA (Kapitel 2.5.1) von Wildtyp und *DRK*-defizienten Linien wurde in einem Gesamtansatz von 60 µl mit 4 µl des jeweils angegebenen Restriktionsenzym ca. 12 h verdaut (Kapitel 2.5.4) und die DNA anschließend mit Hilfe von PCI gereinigt (Kapitel 2.5.5). Nach erneutem Verdau mit demselben Restriktionsenzym wurde sie bei 100 V ca. 2,5 h in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt (Kapitel 2.5.9). Die DNA wurde mit alkalischem Transferpuffer (1 M NaCl; 0,4 M NaOH) auf positiv geladene Nylon-Membranen mittels Kapillarblottechnik transferiert und nach 3-maligem Waschen mit 1 M NaCl in 0,5 M Tris/HCl pH 7,2 durch 3-stündige Inkubation bei 80 °C kovalent an die Membran gekoppelt. Anschließend wurde die Membran mit Express Hybridisierungspuffer (ClonTech) bei 42 °C für mindestens 1 h geblockt und über Nacht mit der Prähybridisierungslösung, der das radioaktiv markierte Fragment (Kapitel 2.5.11) zugesetzt wurde, im Rotationsinkubator bei 42 °C inkubiert. Danach wurde 2 x 30 min mit Waschlösung I (2 x SSC; 0,1 % SDS) bei RT und 2 x 30 min bei 42 bis 65 °C, je nach gewünschter Stringenz, mit Waschlösung II (0,2 x SSC; 0,1 % SDS) gewaschen. Die Membranen wurden in Saran<sup>TM</sup>-Folie verpackt und die Autoradioaktivität durch die Exposition eines Phosphoimager Screens und Auslesen mit dem FMBIO III Multi View (Hitachi) detektiert.

### **2.5.13 Sequenzierung der DNA**

Für eine Sequenzierung wurde entweder gereinigtes PCR-Produkt (c = 20 ng/100bp als luftgetrocknetes Pellet) oder Material einer Plasmid-Minipräparation (1 µg) an die Firma MWG gesandt.

### **2.5.14 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung**

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe der Lasergene DNA\*STAR-Software analysiert sowie mit dem öffentlich zugänglichen Programmen pDRAW32 (<http://www.acaclone.com>) und ClustalW ([www.ebi.ac.uk/clustalw](http://www.ebi.ac.uk/clustalw)).

### **2.5.15 Klonierung mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup>-Technologie (Invitrogen)**

Mit den geeigneten genspezifischen Adapterprimern (angegeben in Kapitel 7.1) wurde in einer ersten PCR-Reaktion (<0,3 µmol Plasmid-Minipräparation oder genomische DNA, 0,125 µM Adapterprimer-5' und -3', 0,5 mM dNTP-Gemisch, 1x Pfu-Puffer und 0,075 U/µl

Pfu-Polymerase (Promega); Programm: 94 °C 2:00 min, 10x: 94 °C 0:15 Min.,  $T_{\text{anneal}}$  0:45 min, 72 °C 1:00 min pro 500 bp) der ausgewählte Bereich amplifiziert und in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Gateway<sup>TM</sup>-Primern attB1 und attB2 verlängert (10 µl PCR 1; 0,8 µM attB1 und attB2; 0,5 mM dNTP-Gemisch; 1x Pfu-Puffer und 0,075 U/µl Pfu-Polymerase (Promega); Programm: 94 °C 2:00 min, 5x: 94 °C 0:15 min, 45 °C 0:45 min, 72 °C 1:00 min pro 500 bp; 20x: 94 °C 0:15 min, 55 °C 0:45 min, 72 °C 1:00 min pro 500 bp). Das PCR-Produkt wurde mittels PEG Fällung (Kapitel 2.5.6) aufgereinigt und spektrophotometrisch die Konzentration bestimmt (Kapitel 2.5.3).

In der BP Reaktion wurde der *entry*-Klon erzeugt, indem das PCR-Produkt über Gateway<sup>TM</sup>-Rekombination in den Eingangsvektor pDONR201 (propagiert in *E. coli* DB3.1-Zellen) kloniert wurde. Dazu wurden 300 ng pDONR201, 100 fmol PCR-Produkt, 1x Rekombinasepuffer, mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht, über Nacht bei RT inkubiert. Nach Inaktivierung des Reaktionsansatzes mit 1 µl Proteinase K für 10 min bei 37 °C wurde ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* DH5α mit 5 µl dieser Reaktion transformiert (Kapitel 2.4.4.1). Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit Kanamycin.

Für die Erzeugung des die jeweilige DRK-DNA tragenden Expressionsvektors wurde nach Plasmid-Minipräparation des *entry*-Klons dieser über geeignete PCR und Restriktionen verifiziert und 100 bis 300 ng für die LR-Reaktion genutzt. Dazu wurden 300 ng des Expressionsvektors, 1x Rekombinationspuffer, 2 µl LR-Rekombinasegemisch und TE-Puffer pH 8,0 (zu einem Endvolumen von 10 µl) vermischt und 12 h bei RT inkubiert. Nach Inaktivierung des Reaktionsansatzes mit 1 µl Proteinase K für 10 min bei 37 °C wurde ebenfalls ein Aliquot kompetenter *E. coli* DH5α mit 5 µl des Gemisches chemisch transformiert (Kapitel 2.4.4.1). Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem entsprechenden Expressionsvektor-spezifischen Antibiotikum und als negative Gegenkontrolle auf LB-Agar mit Kanamycin, um auszuschließen, dass ein *Entry*-Klon kotransformiert wurde. Bei den verwendeten Gateway<sup>TM</sup>-kompatiblen Expressionsvektoren handelte es sich um pDEST15, pK7FWG2, pBGW und pGWB (Kapitel 2.4.2, Tabelle 2.4.2).

## **2.6 RNA-Analytik**

### **2.6.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen**

Um die Genexpression unter bestimmten Bedingungen zu testen, wurden *Arabidopsis* Pflanzen mit dem jeweiligen Pathogen infiziert (Kapitel 2.3.3), nach den jeweils angegebenen Zeitpunkten jeweils 2 infizierte Blätter geerntet und unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (Invitrogen), Auftauen unter vortexen und Extraktion mit 0,2 ml Chloroform wurde die wässrige Phase abgetrennt. Aus ihr wurden die Nukleinsäuren mit 50 % Isopropanol gefällt und das mit 70 % Ethanol gewaschene und luftgetrocknete Pellet in 35 µl DNase und RNase freiem Wasser (Promega) resuspendiert.

Für die Erstellung von Microarray-Daten erfolgte die RNA Aufreinigung mit Hilfe des RNeasy-Systems der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers.

### **2.6.2 DNase-Verdau isolierter RNA**

Zu etwa 10 µg RNA aus einer Präparation mittels Trizol-Reagenz (Kapitel 2.6.1) wurde 1x DNase Puffer und 1 U RNase freie DNaseI (Invitrogen) gegeben. Das Gemisch wurde bei RT für 15 min inkubiert. Zu anschließenden Reinigung wurde die RNA, wie in Kapitel 2.5.5 beschrieben, extrahiert und gefällt.

### **2.6.3 Ermittlung der Transkriptmenge über semiquantitative RT-PCR**

Nach Isolation der RNA aus Pflanzenmaterial (Kapitel 2.6.1) wird diese DNase verdaut (Kapitel 2.6.2). Anschließend erfolgte die Erststrangsynthese mit der M-MuLV Reversen Transkriptase (Fermentas) unter Verwendung eines oligo dT-Primers. Als Ausgangsmaterial wurden 5 µg RNA eingesetzt. Die darauf folgende konstruktsspezifische PCR wurde mit *Taq*-Polymerase (Biomaster) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM verwendet und die PCR-Bedingungen den Primern und der Länge des zu amplifizierenden Bereiches angepasst (Kapitel 2.5.7). Bei semiquantitativen Experimenten wurde ein Fragment des konstitutiv exprimierten Elongationsfaktors EF1α mit amplifiziert.

### **2.6.4 Erstellung von *Microarray*-Daten**

Für die Erzeugung von Proben für *Microarray*-Daten wurden unbehandelte Col-0 und *bak1-3* Pflanzen unter Kurztagbedingungen auf Erde angezogen. Nach 5 Wochen erfolgte die Sprühhinokulation mit  $5 \times 10^5$  Sporen/ml *A. brassicicola* in Wasser bzw. Wasser als Kontrolle. Nach 36-stündiger Inkubation wurden die Proben in Duplikaten geerntet und mit Hilfe des RNeasy-kit nach Herstellerangaben die RNA isoliert. Die Hybridisierung der Affymetrix ATH1-Genarrays wurde durch die Microarray Service Unit des RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) durchgeführt. Eine Analyse der Genexpression erfolgte über die Berechnung der absoluten Expressionswerte mit Hilfe der Affymetrix MAS5.0 Software. Die Daten wurden als Mittelwerte in die Genespring 7.2 Software geladen und dort gcRMA normalisiert. Absolute Expressionswerte, die kleiner als 50 waren, wurden als Hintergrundsignal herausgefiltert. Gene wurden als in der Expression verändert angenommen, wenn der Unterschied zur Wildtyp Kontrolle mehr als das Doppelte betrug.

## **2.7 Proteinanalytik**

### **2.7.1 Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentrationen der Lösungen wurden mit dem Bradford *protein assay* (BioRad) mit Eichkurven auf Basis von Standardalbuminlösungen nach den Angaben des Herstellers in einem *Bio kinetics Reader* EL 340 (Bio-TEK Instruments) bestimmt.

### **2.7.2 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Laemmli 1970 als diskontinuierliche Elektrophorese nach den Anweisungen von Sambrook 1998 durchgeführt. Das Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1) wurde als Rotiphorese Gel 30-Lösung von der Firma ROTH bezogen. Die Proteine wurden in 10 bzw. 8 %igen Trenngelen mit 5 %igen Sammelgelen in den Minigelelektrophoreseapparaturen der Firmen Biorad und PEQLAB bei 25 mA/Gel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue R-250 gefärbt (vgl. Kapitel 2.7.3). Als Größenmarker wurde die PageRuler™ Prestained Protein Ladder Firma Fermentas verwendet.

### **2.7.3 Proteinfärbung mit Coomassie**

Zur Anfärbung der in dem SDS-Gel befindlichen Proteine wurden diese mindestens 30 min mit Coomassie - Brilliant Blue R-250-Lösung (0,125 % Coomassie Brilliant Blue R-250; 50 % Methanol; 10 % Eisessig) inkubiert, mit Entfärbelösung (0,5 % Eisessig) überschüssiger Farbstoff wieder entfernt und entweder auf Blottingpapier bei 80 °C im Geltdrockner oder nach 30-minütiger Haltbarmachung in Trockenlösung (30 % Methanol, 5 % Glycerol, 65 % H<sub>2</sub>O) in Folie getrocknet.

### **2.7.4 Proteindetektion mit Hilfe des Western-Blot**

Es wurden etwa 100 mg Blattmaterial geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörsert. Nach Zugabe von 200 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % TritonX 100, pro 10 ml 1 Tablette Proteaseinhibitor (*complete* mini, Roche)) wurde der Aufschluss durch Mörsern fortgesetzt. Anschließend wurden die Proben 30 min bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Suspension zentrifugiert und 20 µl des Überstands über SDS-PAGE (Kapitel 2.7.2) aufgetrennt. Die Proteine wurden mittels Elektrobloiting auf eine PVDF Membran überführt. Diese Membran wurde für 1 h mit 5 % Milchpulver in PBST (0,45 M NaCl, 3 mM KCl, 5 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) equilibriert. Anschließend erfolgte die Zugabe des ersten, GFP-spezifischen Antikörpers (Kaninchen α-GFP, Acris) in einer Verdünnung von 1:2000 in PBST mit 5 % Milchpulver. Die Inkubation erfolgte über Nacht. Nach 3-maligem Waschen wurde 1 h mit dem zweiten Antikörper (α-Kaninchen IgG A 9169, Sigma) in PBST mit 5 % Milchpulver inkubiert, an welchen eine Peroxidase gekoppelt ist. Anschließend wurde die Membran wieder 3-mal mit PBST gewaschen und mit ECL Reagenz (GE healthcare) nach Herstellerangaben die GFP-haltigen Proteine spezifisch detektiert.

### **2.7.5 Kinaseaktivitätstest**

Für die Messung der Kinaseaktivität wurden die Kinasedomänensequenzen mit den jeweils angegebenen Primern über PCR (Kapitel 2.5.7) von genomischer DNA (Kapitel 2.5.1) amplifiziert und über Gateway<sup>TM</sup>-Rekombination in pDONR201 und von diesem in den Expressionsvektor pDEST15 rekombiniert (Kapitel 2.5.15). Dadurch wurde die Kinasedomäne aminoterminal mit GST (Glutathion-S-Transferase) versehen und das Fusionsprotein konnte nach der Expression über GS4B-Sepharose affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Mit dem erhaltenen Konstrukt wurden BL21-AI Zellen transformiert (Kapitel 2.4.4.1) und eine 5 ml Übernacktkultur bei 37 °C angezogen. Damit wurde eine 50 ml Kultur auf eine OD<sub>600nm</sub> von 0,05 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von

0,4-0,5 wachsen gelassen. Nach Induktion durch Zugabe von 0,01 % L-Arabinose wurde die Kultur erneut 2 h bei 28 °C inkubiert und die Zellen anschließend durch fünfminütige Zentrifugation bei 2200 x g und RT geerntet. Die Zellyse erfolgte durch Zugabe von 1 ml Lysispuffer (30 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 470 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % Glycerol, 0,5 % Triton X-100, 10 mM Imidazol; pH 7,8) und 15-minütiger Inkubation auf Eis. Anschließend erfolgte 3-maliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 42 °C Wasserbad. Schließlich wurde die Suspensio zweimal einer 10-sekündigen Ultraschallbehandlung mit 10 s Pausen zwischen den Einzelschritten (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury) mit einer Ausgangskontrolle von 3 unterzogen. Nach Zentrifugation wurde das Fusionsprotein aus dem Überstand mittels Glutathionsepharose GS4B (Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Expressions- und Reinigungseffizienz wurde mit Hilfe einer SDS-PAGE und darauffolgender Coomassiefärbung ermittelt. Die Kinaseassays wurden mit 1 µl [γ-<sup>32</sup>P]-ATP, 1 µg des jeweiligen Substrats (MBP [Sigma M1891], Kasein [Sigma C4765] + 0,01% TritonX-100 oder Histon [Sigma H5505]), 1 µg isolierter Kinase und dem Kinasepuffer (50 mM HEPES; 1 mM DTT; 10 µM ATP; 10 mM MgCl<sub>2</sub>) zu einem Endvolumen von 30 µl angesetzt und 1 Stunde bei RT (25 °C) inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 x SDS-Probenpuffer und 5-minütiger Erwärmung auf 95 °C gestoppt und einer SDS-PAGE unterzogen (Kapitel 2.7.2). Die Gele wurden im Gelrockner auf Filterpapier fixiert und anschließend die Radioaktivität mittels Autoradiographie durch einen Phospho-Imager detektiert.

---

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Auswahl geeigneter pathogeninduzierter LRR-RLK Kandidaten

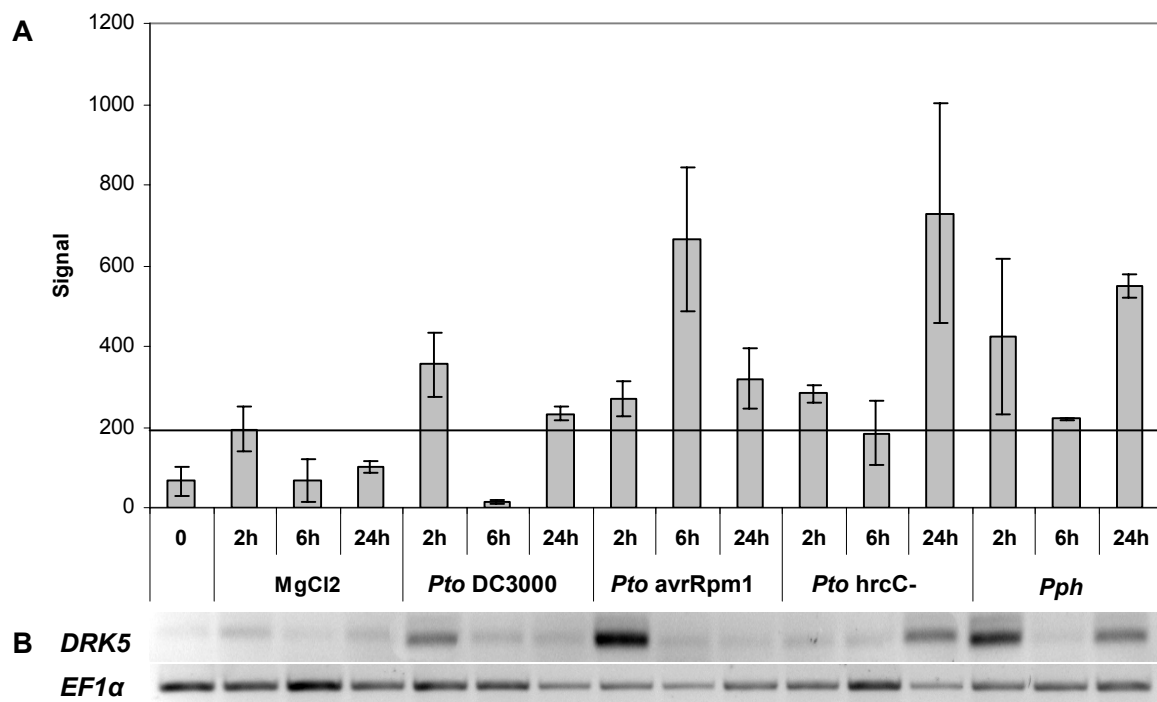
Ziel der vorgelegten Dissertation war die Bestimmung der biologischen Funktion ausgewählter leuzinreicher Rezeptorkinasen (LRR-RLKs) in Prozessen der Pathogenperzeption bzw. -abwehr. Durch Sequenzdaten des *Arabidopsis*-Genom-Projekts (*Arabidopsis-genome-initiative* 2000) war es möglich, in *Arabidopsis thaliana* 234 LRR-RLKs zu identifizieren (Shiu und Bleecker 2001b). Nur einige von ihnen haben jedoch eine nachgewiesene Funktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Von den wenigen bereits untersuchten pathogenrelevanten LRR-RLKs, wie z. B. FLS2, ist bekannt, dass sie durch Applikation ihres Liganden (flg22) in ihrer Expression reguliert werden (eFP Browser, <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>). Dieser Fakt ist hilfreich, um eine Auswahl weiterer, eventuell für die Pathogenabwehr relevanter LRR-RLKs zu treffen. Dazu wurde im Vorfeld der Arbeit durch Dr. Birgit Kemmerling eine hierarchische Gruppierung dieser LRR-RLKs auf Basis von *Microarray*-Daten des AtGenExpress Projektes nach Pathogeninfektion bzw. PAMP-Behandlung durchgeführt. Dabei wurde beobachtet, dass 49 Kandidatengene eine infektionsabhängig erhöhte Transkriptakkumulation zeigen (Dr. Kemmerling). Es stellt sich nun die Frage, ob diese für die Pathogenabwehr relevant sind und welche Funktion diesen LRR-RLKs bei der Pathogenperzeption und Regulation pflanzlicher Abwehrprozesse zukommt. Zu Beginn der Arbeit wurden fünf der Kandidaten ausgewählt. Für drei von ihnen konnten erste Hinweise dafür gefunden werden, dass sie während der Pathogeninfektion eine Rolle spielen. Sie sollen im Folgenden genauer betrachtet werden. Es handelt sich dabei um die bisher nicht erforschten LRR-RLKs DRK5 (*defence-related* LRR-RLK5) und DRK6 bzw. das bereits bekannte Protein BAK1 (siehe auch Kapitel 1.5).



## 3.2 DRK5

### 3.2.1 Expressionsmuster der *DRK5* nach Bakterieninjektion

Wie bereits einleitend erwähnt (Kapitel 3.1), basiert die Auswahl der *DRK5* auf ihrer verstärkten Expression nach Pathogenapplikation. Anhand der zur Verfügung stehenden *Microarray* Daten des AtGenExpress Projektes wird deutlich, dass die *DRK5*-Transkription durch Infektion mit verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen im Vergleich zu der verwendeten  $MgCl_2$  Kontrolle beeinflusst wird (Abbildung 3.2.1, A). Die daraufhin erstellte RT-PCR sollte diese Aussage verifizieren (Abbildung 3.2.1, B).



**Abbildung 3.2.1: Microarray-Daten und RT-PCR nach Infiltration von Wildtyppflanzen mit verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen**

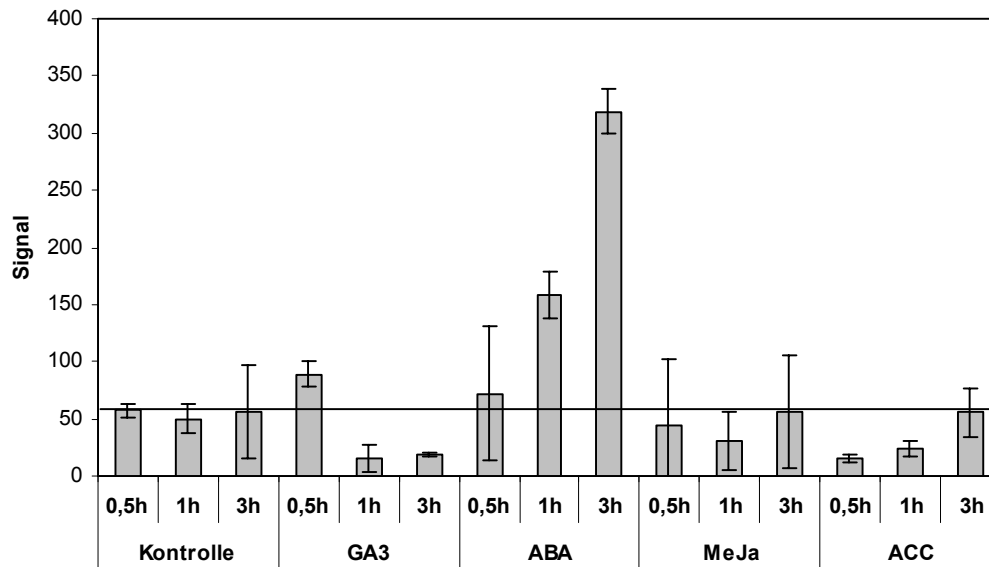
Nach Inokulation von  $10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000, *Pto* avrRpm1, *Pto* hrcC- und *Pph* bzw. der Kontrolle 10 mM  $MgCl_2$  wurde nach 2, 6 und 24 h Blattmaterial geerntet und RNA daraus isoliert (Kapitel 2.6.1). Im Vergleich dazu steht der unbehandelte Nullwert. **(A)** zeigt die als Teil der AtGenExpress Initiative erzeugten *Microarray*-Daten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes dar. **(B)** In einem unabhängigen Experiment erfolgte die Verifizierung dieser Daten über semiquantitative RT-PCR mit den *DRK5*-spezifischen Primern At1g66830-ver1 und -KD3 (Fragmentgröße 323 bp; Anhang, Tabelle 7.1.1). Die gleiche Menge Gesamt-RNA wurde über die Angleichung auf Basis des *EF1α*-Transkripts (Fragmentgröße 600 bp; Anhang, Tabelle 7.1.1) gewährleistet.

Besonders auffällig ist das *DRK5*-Expressionsmuster nach Infektion mit *Pto* DC3000. Nach einem kurzen Anstieg unmittelbar nach der Infektion folgt nach ca. 6 h eine Reduktion der Transkriptmenge unter den Wert der  $MgCl_2$ -Kontrolle und der unbehandelten Pflanzen. Im weiteren Verlauf steigt sie dann erneut an. Im Gegensatz dazu ist 6 h nach Inokulation des avirulenten Pathogens *Pto* avrRpm1 eine dreifach höhere *DRK5*-Expression als in den Kontrollproben zu erkennen, mit einer anschließenden Abnahme der Transkriptmenge. Im Vergleich dazu ist nach Applikation der nichtpathogenen Bakterien *Pto* hrcC- und *Pph* die *DRK5*-Transkriptionsrate nach 24 h am höchsten. Die RT-PCR Ergebnisse unterstützen die Beobachtungen aus den *Microarray*-Daten. Nur nach *Pto* avrRpm1-Infektion ist eine leichte Verschiebung des Expressionsmaximums in frühere Zeitbereiche nach der Infektion festzustellen.

### **3.2.2 DRK5-Expression nach Applikation von Hormonen und abiotischem Stress**

Es ist bekannt, dass nach Infektion mit Pathogenen die Phytohormone Salizylsäure, Ethylen und Jasmonsäure eine wichtige Rolle bei der Regulation der pflanzlichen Abwehrantwort spielen (O'Donnell *et al.* 2003a). In weiteren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass nach Inokulation dieses Bakteriums ebenfalls eine schnelle Zunahme der Auxin Konzentration erfolgt (Schmelz *et al.* 2003). Spätere Untersuchungen ergaben, dass die pathogeninduzierbare Synthese des Phytohormons Abszisinsäure (ABA) von einem funktionellen T3SS des Erregers abhängt (de Torres-Zabala *et al.* 2007). Daher liegt es nahe, die Wirkung unterschiedlicher Phytohormone auf die *DRK5*-Expression zu betrachten.

*Microarray*-Daten zeigen, dass die *DRK5*-Transkriptmenge durch Zugabe von ABA auf das Sechsfache des Kontrollwertes ansteigt (Abbildung 3.2.2). Die Behandlung der Pflanzen mit dem antagonistisch wirkenden Hormon Gibberellinsäure (GA3) hat den gegenteiligen Effekt, das Expressionsniveau sinkt unter das der Kontrolle. Eine Zugabe des physiologisch aktiven Jasmonsäurederivats Methyljasmonsäure (MeJa) ist nicht in der Lage die *DRK5*-Expression zu induzieren. Die Applikation einer Biosynthesevorstufe des Ethylens, der 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC), führt zu einer anfänglichen Repression des Transkripts. Nach 3 h ist die *DRK5*-Expression jedoch wieder auf dem Niveau der Kontrollen.

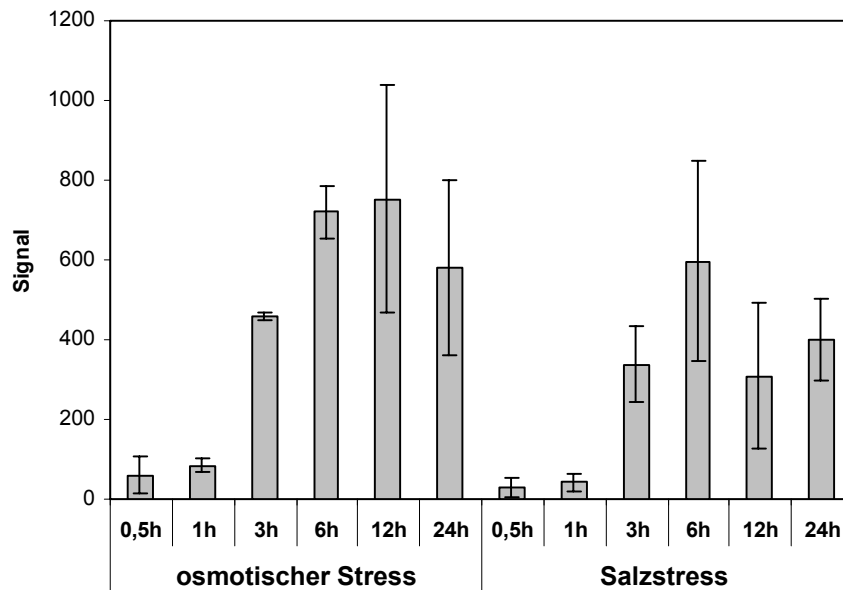


**Abbildung 3.2.2: DRK5-Microarray-Daten nach Hormonbehandlung von Col-0**

Wildtypkeimlinge wurden 7 Tage lang in flüssigem MS-Medium unter kontinuierlichem Licht angezogen. Nach Zugabe von  $1\ \mu\text{M}$  GA3,  $10\ \mu\text{M}$  ABA,  $10\ \mu\text{M}$  MeJa bzw.  $10\ \mu\text{M}$  ACC wurden die Proben geerntet, RNA daraus isoliert (Kapitel 2.6.1) und mit dieser jeweils ein ATH1-Chip hybridisiert. Die Daten sind GCOS normalisiert und die Mittelwerte der gemessenen Duplikate dargestellt. Sie wurden als Teil der AtGenExpress Initiative erstellt (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>).

Da viele ABA-responsive Gene ebenfalls durch abiotische Stressoren wie Kälte, Trockenheit oder Salz reguliert werden (Mansfield 1987; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994; Koornneef *et al.* 1998; Achard *et al.* 2006), wurde im Folgenden die Induzierbarkeit der *DRK5* durch diese Faktoren betrachtet.

Während Kälte und Trockenheit zu keinem signifikanten Anstieg des *DRK5*-Transkriptes führten (Daten nicht abgebildet), hatten osmotischer Stress und die Zugabe von NaCl einen stark induzierenden Effekt (Abbildung 3.2.2). Bereits 3 h nach Zugabe von Mannitol oder NaCl zeigt sich ein starker Anstieg des *DRK5*-Transkripts. Das Expressionsmaximum wird nach 12 bzw. 6 h erreicht. Anschließend sinkt die Transkriptmenge wieder leicht ab. Dieser Effekt ist in oberirdischem Gewebe besonders stark. In Wurzeln ist die Kinetik der Expression zwar ähnlich, die Induktion ist jedoch weniger stark ausgeprägt (Daten nicht abgebildet).



**Abbildung 3.2.3: Auswirkung von abiotischem Stress auf die *DRK5*-Expression in Col-0**

Stratifizierte Col-0 Keimlinge, die 11 Tage unter Langtagbedingungen auf MS-Agar aufgewachsen sind, wurden für weitere 5 Tage in flüssigem MS-Medium angezogen. Nach Zugabe von 300 mM Mannitol (osmotischer Stress) bzw. 150 mM NaCl (Salzstress) wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Proben genommen und der Spross von den Wurzeln getrennt. Mit der daraus extrahierten RNA (Kapitel 2.6.1) wurden ATH1 Chips hybridisiert und die Daten GCOS normalisiert. Im Diagramm sind die Daten der Sprossproben dargestellt. Die verwendeten *Microarray*-Daten wurden als Teil der AtGenExpress Initiative erstellt (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>).

### 3.2.3 Analyse der T-DNA-Insertionslinie

Zur Analyse der biologischen Funktion der *DRK5* *in vivo* stand die *Arabidopsis*-Linie N580404 (*drk5*) des SALK-Instituts (Alonso *et al.* 2003) zur Verfügung, in welcher durch Einfügen einer T-DNA die *DRK5*-Sequenz 51 Basenpaare nach dem Startcodon auf DNA-Ebene unterbrochen wird (Abbildung 3.2.4). Der genetische Hintergrund dieser Linie ist der Ökotyp Col-0.



**Abbildung 3.2.4: Genstruktur und Lokalisation der T-DNA-Insertion im *DRK5*-Gen**

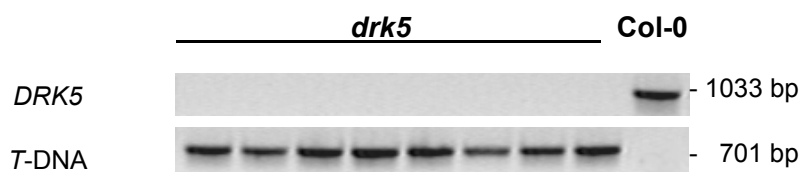
Die den Gendefekt erzeugende T-DNA-Insertion (schwarzes Dreieck, Pfeil zeigt die Orientierung an) befindet sich 51 bp nach dem Translationsstart im dem Schwarz markierten Exons, welcher für die LRR Domäne kodiert. Der weiße Abschnitt kennzeichnet die Promotorregion, das einzige Introns ist Grau unterlegt. Die jeweiligen Positionen sind als Zahl der Basenpaare nach dem Startcodon bezeichnet.

Mit Hilfe dieser Mutante sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Abwesenheit des Proteins auf das Verhalten der Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen hat. Dazu war es nötig sicherzustellen, dass dieser Gendefekt homozygot vorliegt. Weiterhin musste nachgewiesen werden, dass diese Pflanzenlinie kein funktionelles *DRK5*-Transkript erzeugen kann. Um später eine Aussage treffen zu können, mit welcher Sicherheit der Gendefekt für eventuell beobachtete Phänomene verantwortlich ist, war es nötig die Zahl weiterer, sekundärer *T*-DNA-Insertionen mit Hilfe einer Southern-Hybridisierung (Kapitel 3.2.3.3) zu bestimmen.

### 3.2.3.1 Genotypisierung

Da man nicht davon ausgehen kann, dass der *DRK5*-Gendefekt ein dominantes Allel darstellt, musste der durch die Insertion der *T*-DNA erzeugte Gendefekt homozygot vorliegen. Zu diesem Zweck wurden jeweils 8 Pflanzen der verwendeten *drk5*-Linie über PCR mit geeigneten Primerpaaren getestet (Kapitel 2.5.8, Anhang 7.1).

Es ist zu erkennen, dass nur von der Wildtyp-DNA das genspezifische 1033 bp Fragment amplifiziert werden kann. Im Gegensatz dazu lässt sich das *T*-DNA-spezifische 701 bp große Amplifikat nur von der *DRK5*-defizienten Linie erhalten, was zeigt, dass diese homozygot den *knockout* tragen (Abbildung 3.2.5).



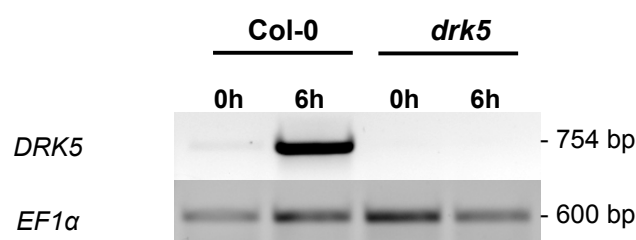
**Abbildung 3.2.5: PCR zur Genotypisierung der *DRK5*-defizienten Pflanzenlinien**

Das Blattmaterial 6 Wochen alter *Arabidopsis*-Pflanzen wurde geerntet und über die PCI-Methode (Kapitel 2.5.1) die genomische DNA extrahiert. Mit Hilfe des Primerpaares a- und b-N580404 (Anhang, Tabelle 7.1.1) wurde das *DRK5*-spezifische Fragment amplifiziert, das *T*-DNA-insertionsspezifische Produkt erhielt man mit den Primern b-N580404 und Lba1 (Anhang 7.1, Tabelle 7.1.1).

### 3.2.3.2 Nachweis der Inaktivierung auf Transkriptebene

Wie über *Microarray*-Daten und bestätigend durch semiquantitative RT-PCR gezeigt werden konnte, wird in Wildtyppflanzen die Transkription der *DRK5* 6 h nach Applikation des Bakteriums *Pto* avrRpm1 induziert (Kapitel 3.2.1). Um die zur Verfügung stehende *DRK5*-defiziente Pflanzenlinie daraufhin zu untersuchen, ob sie funktionelles Transkript erzeugen kann, wurde sie mit diesem Pathogen infiziert und zu den Zeitpunkten 0 und 6 h Blattmaterial für eine semiquantitative RT-PCR (Kapitel 2.6.3) geerntet. Für die sich anschließende PCR wurde das Primerpaar so gewählt, dass es einen Bereich amplifiziert, der sich 3' der *T*-DNA-Insertion befindet. Zusätzlich umschließt es einen Bereich in dem sich auf Ebene genomischer DNA ein Intron befindet. Dadurch lässt sich das von cDNA amplifizierte PCR Produkt gut von jenem unterscheiden, welches durch eventuelle Kontamination mit genomischer DNA entstehen würde. Als Kontrolle dient die cDNA parallel behandelte Wildtyppflanzen. Zur Sicherstellung gleicher cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben wurden diese über die Transkriptmenge des konstitutiv exprimierten Gens *EF1α* angeglichen. Auch in diesem Fall wurde das Primerpaar so gewählt, dass es auf DNA-Ebene ein Intron umschließt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass 6 h nach erfolgter Infektion der *Arabidopsis* Wildtypblätter die *DRK5*-Transkriptmenge stark zunimmt (Abbildung 3.2.6). Auch zum Zeitpunkt 0 h lassen sich bereits geringe Mengen *DRK5*-RNA nachweisen. Betrachtet man jedoch die parallel dazu behandelte *DRK5*-defiziente Linie, so stellt man zu beiden Zeitpunkten einen kompletten Verlust an *DRK5*-Transkript fest.

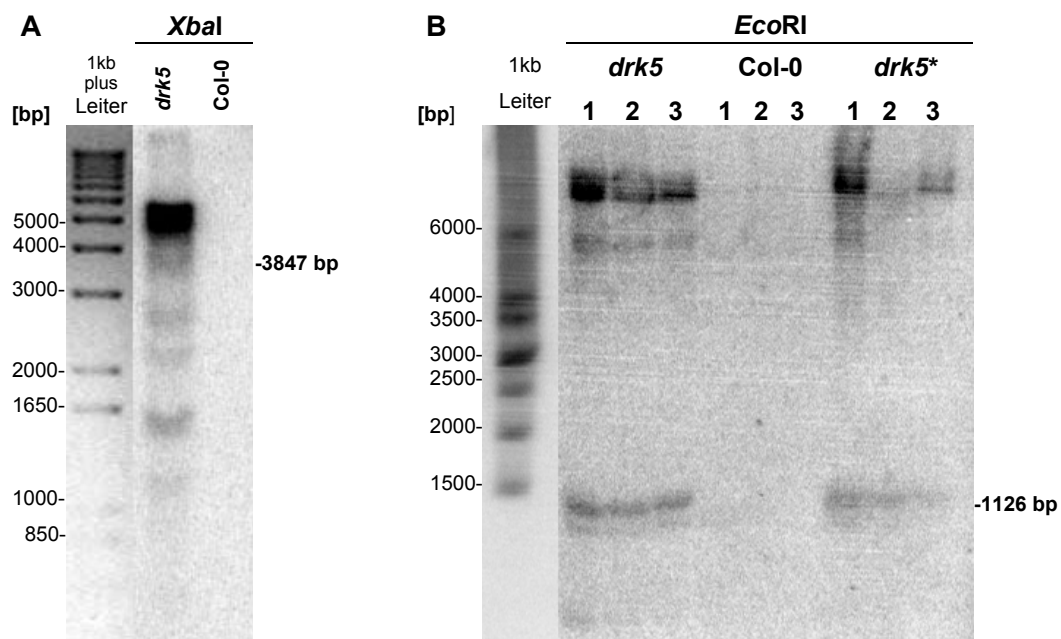


**Abbildung 3.2.6: RT-PCR zum Nachweis von *DRK5*-Transkript**

In 5 Wochen alte Pflanzen wurden  $10^8$  cfu/ml *Pto* avrRpm1 injiziert, das Blattmaterial unmittelbar danach bzw. 6 h nach Infektion geerntet und die RNA isoliert. Nach erfolgter cDNA Synthese wurden die Transkriptmengen mittels PCR quantifiziert (Kapitel 2.6.3). Für die Amplifikation des *DRK5*-Transkriptes wurden die Primer At1g66830-ver1 und -5' verwendet (Anhang 7.1, Tabelle 7.1.1). Zur Bestimmung der *EF1α* Transkriptmenge wurden die Primer *EF1α*-s und -as (Anhang 7.1, Tabelle 7.1.1) genutzt.

### 3.2.3.3 Bestimmung der Anzahl inserierter T-DNA-Fragmente

Um später eine Einschätzung eines eventuell beobachtbaren Phänotyps treffen zu können, war es wichtig nachzuweisen, ob die *drk5*-Linie über multiple T-DNA-Insertionen verfügt und wenn, wie viele. Dazu wurde die genomische DNA präpariert, durch geeignete Restriktionsenzyme fragmentiert (Kapitel 2.5.4) und mit einer für die Salk T-DNA-spezifischen Sonde, welche im *left border*-Bereich der Insertion bindet (Anhang 7.2.1), eine Southern-Hybridisierung durchgeführt (Kapitel 2.5.12).



**Abbildung 3.2.7: Southern-Hybridisierungen mit einer T-DNA-spezifischen Sonde**

Unter Verwendung von Blattmaterial 5 Wochen alter Pflanzen der verschiedenen Linien mit Hilfe der PCI-Methode (Kapitel 2.5.1) genomische DNA extrahiert.

**(A)** Zur Bestimmung der T-DNA-Insertionszahl wurde die DNA von Col-0 und *drk5* mit dem Enzym *XbaI* fragmentiert. Anschließend folgte eine Southern-Hybridisierung (Kapitel 2.5.12) mit einer T-DNA-spezifischen Sonde (Anhang 7.2.1). Das erwartete Fragment hat eine Größe von 3847 bp.

**(B)** Für die Ermittlung der Insertionszahl in den zurückgekreuzten *drk5\**-Pflanzen wurde deren DNA parallel mit der von Wildtyp Col-0 und *drk5*-Linie mit dem Enzym *EcoRI* inkubiert. Danach erfolgte ebenfalls eine Southern-Hybridisierung mit der T-DNA-spezifischen Sonde (Anhang 7.2.1). Es wurden jeweils Triplikate durchgeführt. Das erwartete Fragment ist 1126 bp lang.

Außer der erwarteten Bande von 3847 bp sind in der *drk5*-Linie mindestens fünf weitere Signale zu erkennen (Abbildung 3.2.7). Aus diesem Grund wurde versucht durch eine Rückkreuzung der *drk5* mit dem zugehörigen Wildtyp Col-0 die multiplen Insertionen zu reduzieren. Mit der homozygoten T2-Generation *drk5\** wurde wiederum eine Southern-Hybridisierung durchgeführt. Diesmal wurde zur besseren Auflösung des Bandenmusters

statt *Xba*I das Enzym *Eco*RI verwendet. Im Vergleich zu den ursprünglich verwendeten *DRK5-knockout*-Pflanzen ist eine Reduktion der Insertionszahl zu erkennen. Neben der erwarteten Bande bei 1126 bp ist jedoch mindestens ein weiteres Signal vorhanden. Daraus folgt, dass weiterhin zusätzliche *T*-DNA-Fragmente in diesen Pflanzen verblieben sind. Sie könnten eventuell durch weiterführende Rückkreuzungen entfernt werden.

### **3.2.4 Phänotypische Analysen der *DRK5*-defizienten *T*-DNA-Insertionslinie**

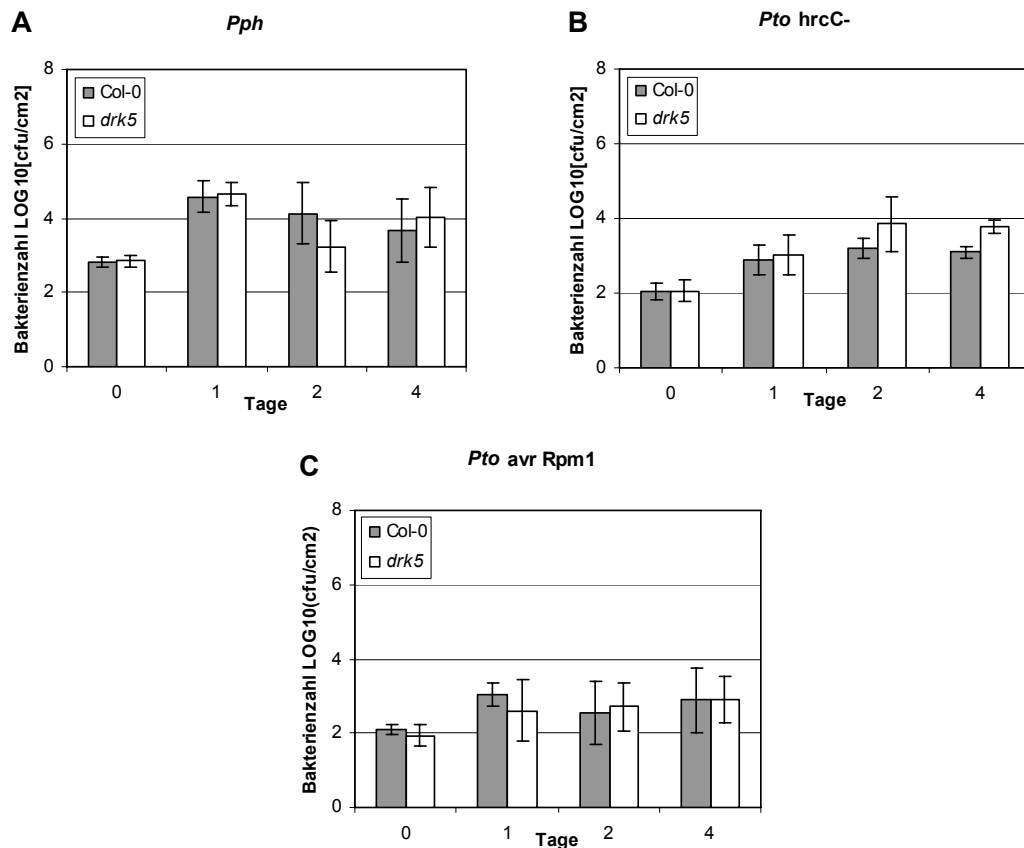
Nach erfolgter Verifizierung der *DRK5*-defizienten Linie stand diese für weitere Analysen zur Verfügung. Unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen (Kapitel 2.2) verhielt sie sich wie vergleichbare *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen. Es zeigten sich keine makroskopisch sichtbaren Unterschiede hinsichtlich Fertilität, Form und Größe der Pflanzen und ihrer Organe oder der Kinetik der Entwicklung (Daten nicht abgebildet). Auch die Anzucht unter verschiedenen Tageslängen (8, 16 oder 24 h) hatte im Vergleich zum Wildtyp keinerlei Einfluss auf das Pflanzenwachstum.

#### **3.2.4.1 Untersuchung des Wachstums bakterieller Pathogene in *drk5*-Pflanzen**

Wie sowohl aus den *Microarray*-Daten, als auch den durchgeführten semiquantitativen RT-PCRs ersichtlich ist, handelt es sich bei der *DRK5* um ein durch bakterielle Pathogene induzierbares Gen (Kapitel 3.2.1). Um die Funktion des Proteins innerhalb der Pathogenabwehr beschreiben zu können, wurden unter anderem Bakterien des Stammes *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) mit unterschiedlicher Pathogenizität verwendet. Dabei wurde das bakterielle Wachstum nach Infektion von *drk5*- bzw. Wildtyppflanzen über vier Tage betrachtet. Bei den verwendeten Bakterienstämmen handelt es sich um das virulente Pathogen *Pto* DC3000, das ein Avirulenzgen exprimierende Pathogen *Pto* avrRpm1, den nichtvirulenten Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) und die im Typ III-Sekretionssystem (T3SS) defiziente Mutante *Pto* hrcC-.

Vergleicht man das bakterielle Wachstum der jeweiligen Pathogene zwischen Wildtyp und *DRK5*-defizienten Pflanzen, zeichnet sich folgendes ab. Nach Applikation der verwendeten nichtpathogenen Bakterien *Pph* und *Pto* hrcC- zeigt sich in Wildtyp wie in den *DRK5*-defizienten Pflanzen eine geringe Zunahme der Zellzahl um maximal den Faktor 100 und eine anschließende Stagnation des Wachstums (Abbildung 3.2.8, A und B). Der avirulente Stamm *Pto* avrRpm1 ist gleichermaßen weder in Col-0 noch der *drk5*-Linie in der Lage diese erfolgreich zu besiedeln (Abbildung 3.2.8, C). Ähnlich wie die untersuchten nichtvirulenten Bakterien ändert sich die Zellzahl nach der Infektion um weniger als das 100-fache.





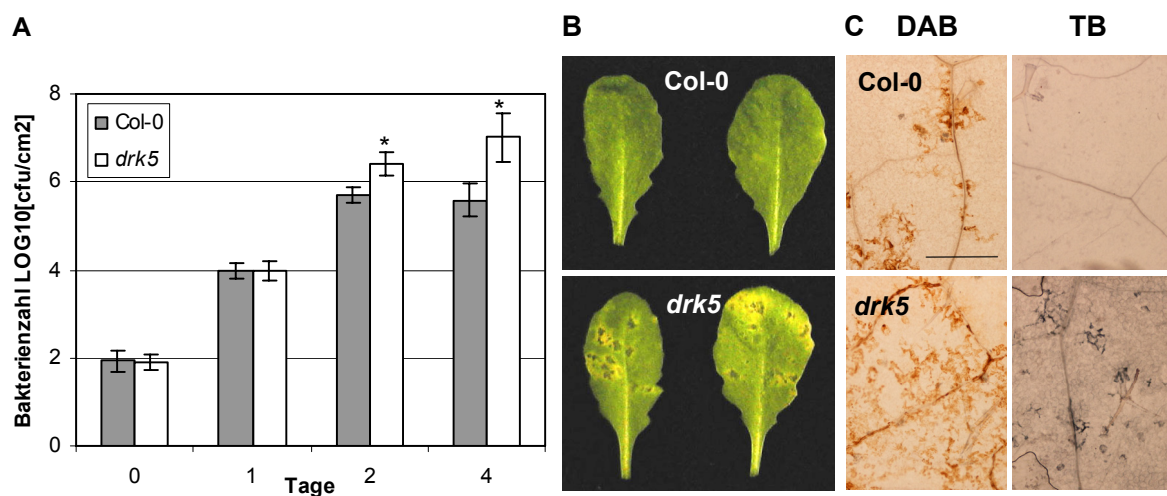
**Abbildung 3.2.8: Bakterienwachstum nach Inokulation verschiedener *Pseudomonas*-Stämme**

In den Abbildungen ist das bakterielle Wachstum von (A) *Pph*, (B) *Pto hrcC*- und (C) *Pto avrRpm1* dargestellt. Für die Versuche wurden 5 Wochen alte Pflanzen der Linien Col-0 bzw. *drk5* mit Bakteriensuspension der Dichten (A)  $10^5$  und (B, C)  $10^4$  cfu/ml inokuliert und das bakterielle Wachstum ermittelt (Kapitel 2.3.3). Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung über mindestens 6 Replikate. Die gezeigten Graphen sind repräsentativ für (A) 2, (B) 3, (C) 6 unabhängige Experimente.

Betrachtet man die Zunahme der Zellzahl nach Infektion mit dem virulenten Pathogen *Pto* DC3000, so zeigen sich signifikante Unterschiede (Abbildung 3.2.9). Bereits in den Kontrollpflanzen Col-0 zeigt sich ein starkes Bakterienwachstum auf das etwa 10.000-fache des Ursprungswertes. Vergleicht man parallel dazu die *DRK5*-defiziente Linie, so lässt sich ein um den Faktor 10 verstärktes Bakterienwachstum feststellen (Abbildung 3.2.9, A). Diese Beobachtung wird durch eine unterschiedlich starke Ausprägung der Symptome unterstützt (Abbildung 3.2.9, B). Bei geringen Inokulationsdichten lassen sich nach 2 bis 4 Tagen leichte Chlorosen erkennen. Vergleicht man die Krankheitssymptome der *drk5*-Linien mit denen der Wildtyppflanzen, so erkennt man die verstärkte Ausbildung von Chlorosen und wässrigen Läsionen in der *knockout*-Linie. Es ist anzumerken, dass der *Pto* DC3000

Wachstumsphänotyp sich nicht beobachten lässt, wenn das Bakterium durch Sprühinokulation appliziert wird (Daten nicht abgebildet).

Eine Analyse der *drk5*-Pflanzen nach *Pto* DC3000-Injektion mittels DAB-Färbung zeigt eine vermehrte Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Vergleich zu den Kontrollpflanzen Col-0 (Abbildung 3.2.9, C). Weiterhin zeigen die *knockout* Pflanzen eine stärkere Ausbreitung des Zelltods nach Infektion mit *Pto* DC3000 (Abbildung 3.2.9, C). Diese Beobachtung korreliert mit der Ausprägung der Symptome und dem vermehrten Bakterienwachstum (Abbildung 3.2.9).

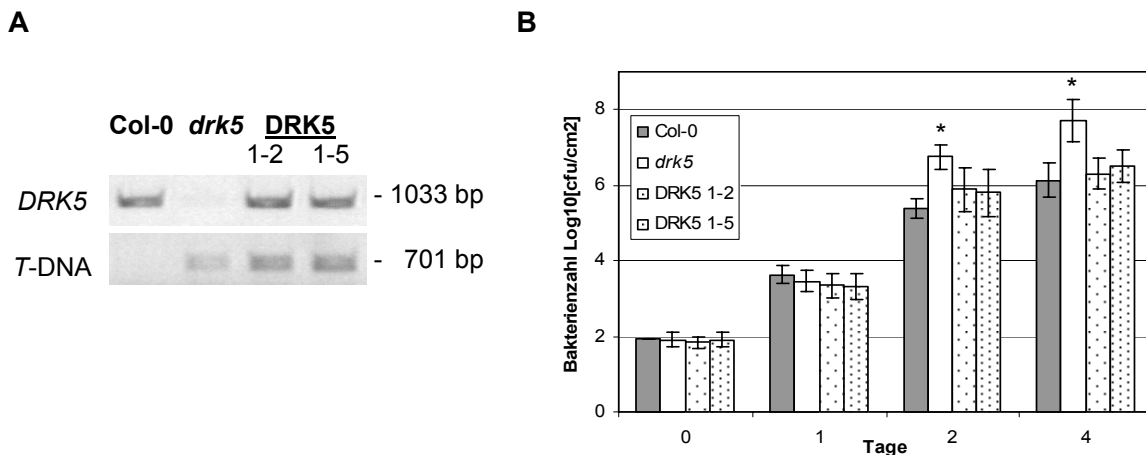


**Abbildung 3.2.9: Bakteriell Wachstum und Symptomatik nach *Pto* DC3000 Infektion**

(A) Zur Bestimmung der Bakterienzahl zu den Zeitpunkten 0, 1, 2 und 4 Tage nach Infektion wurden 6 Wochen alte Pflanzen mit  $10^4$  cfu/ml Suspension des Pathogens *Pto* DC3000 inokuliert. Die Bakterienzahl in Col-0 und der Mutante *drk5* wurde wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben ermittelt. In einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Kapitel 2.3.10) wurden die erhaltenen Wertepaare getestet. Mit „\*“ gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Wildtyp Kontrolle ( $p < 0,01$ ). Das gezeigte Experiment steht stellvertretend für 7 unabhängige Wiederholungen. (B) Parallel zum Bakterienwachstum wurden 4 Tage nach der Injektion die makroskopisch sichtbaren Symptome dokumentiert. (C) In 5 Wochen alte Pflanzen wurden  $10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000 Suspension infiltriert und nach 24 h repräsentative Blätter angefärbt. Zur Visualisierung reaktiver Sauerstoffspezies wurde 3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid (DAB, Kapitel 2.3.5) verwendet, die Färbung von Blattadern und toten Zellen erfolgte mit Trypanblau (TB, Kapitel 2.3.6). Der dargestellte Balken repräsentiert 1 mm.

Um auszuschließen, dass der beobachtete Wachstumseffekt auf eine der sekundären T-DNA-Insertionen zurückzuführen ist, wurde der *DRK5*-Gendefekt komplementiert (*DRK5*, Kapitel 2.2.3) und die erhaltenen Linien durch Genotypisierung verifiziert (Abbildung 3.2.10 A). Anschließend wurde das bakterielle Wachstum in diesen Pflanzen bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Komplementation der *drk5*-Pflanzen mit dem *DRK5*-Gen der Wildtypphänotyp wiederhergestellt werden kann (Abbildung 3.2.10 B). Dadurch ist

auszuschließen, dass eine der sekundären *T*-DNA-Insertionen (Kapitel 3.2.3.3) für das unterschiedliche Bakterienwachstum in den *drk5*-Pflanzen verantwortlich ist. Um sekundäre Effekte durch die Lokalisation der *DRK5*-Insertion auszuschließen, wurden zwei unabhängige Linien getestet (DRK5 1-2 und DRK5 1-5).



**Abbildung 3.2.10: Bestimmung des *Pto* DC3000-Wachstums nach Komplementation des *DRK5*-Gendefekts**

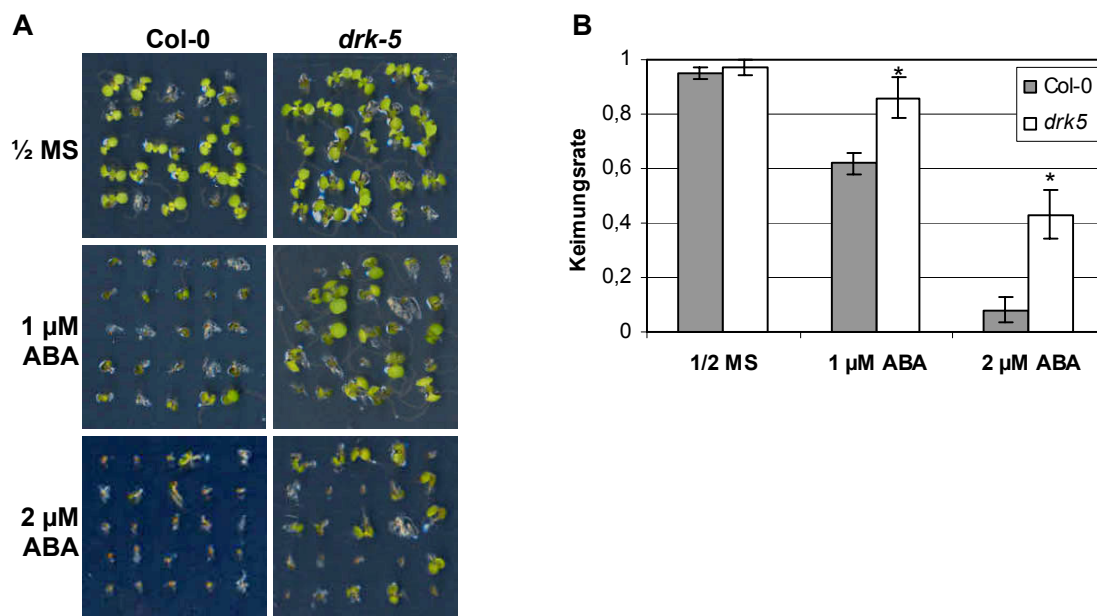
(A) Die Verifizierung der komplementierten Linien DRK5 1-2 bzw. 1-5 wurde mittels PCR wie in Abbildung 3.2.5 beschrieben durchgeführt. (B) Die Bestimmung des bakteriellen Wachstums erfolgte wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben. Neben den Linien Col-0 und *drk5* wurden die komplementierten Linien DRK5 1-2 und DRK5 1-5 (Kapitel 2.2.3) verwendet. Signifikante Unterschiede zu den Col-0-Werten wurden mit „\*“ gekennzeichnet (ANOVA,  $p < 0,01$ ).

### 3.2.4.2 Test weiterer Pathogene *in vivo*

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass der *DRK5*-Gendefekt einen Einfluss auf das Wachstum hemibiotropher Bakterien hat. Im Weiteren wurde in Kooperation mit dem Labor von V. Lipka der Einfluss des *DRK5-knockouts* auf die Virulenz anderer biotropher Pathogene wie *Erysiphe pisi* oder *Blumeria graminis* untersucht. Auch verschiedene *Colletotrichum* Arten wie *C. higginsianum*, *C. lagenarium*, *C. trifolii* oder *C. lindemuthianum* wurden appliziert. Keines dieser Pathogene verursachte jedoch von der Wildtyp Kontrolle abweichende Symptome in den *drk5*-Pflanzen. Zusätzlich wurde auch der Einfluss auf die Infektiosität der nekrotrophen Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* getestet. In jeweils zwei unabhängigen Experimenten konnte jedoch kein signifikanter Unterschied in der Ausprägung typischer Symptome nachgewiesen werden (Daten nicht abgebildet).

### 3.2.4.3 Einfluss pflanzlicher Hormone auf das *drk5*-Wachstum

Wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben wird die *DRK5* besonders stark nach Behandlung mit Abszisionsäure (ABA) induziert. Da keines der anderen getesteten Hormone einen ähnlichen Einfluss auf die *DRK5*-Expression hat, lag es nahe, die Sensitivität der *drk5*-Linie auf exogen appliziertes ABA zu prüfen. Dazu wurden Keimungsexperimente mit unterschiedlichen Hormonkonzentrationen durchgeführt (Kapitel 2.3.1).



**Abbildung 3.2.11: Keimung auf Abszisionsäure (ABA)-haltigem Medium**

(A) Das Saatgut wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben vorbehandelt und auf MES-gepuffertem 1/2 MS-Medium ohne Zusätze bzw. mit den angegebenen ABA-Konzentrationen unter Langtagbedingungen über 7 Tage angezogen. (B) Eine Quantifizierung der Keimungsrate nach 7 Tagen erfolgte in vierfacher Bestimmung über eine Probenmenge von jeweils 25 Samen. Mit „\*“ markiert sind Werte mit signifikantem Unterschied zum Wildtyp ( $p < 0,01$ , ANOVA). Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt.

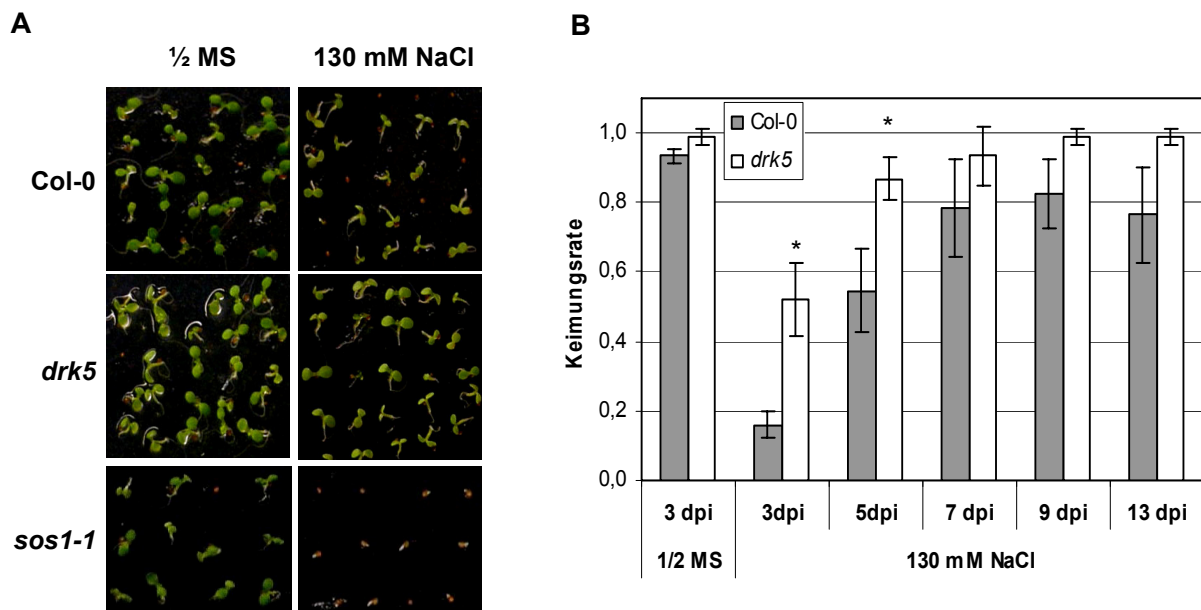
Es zeigte sich, dass die *drk5*-Pflanzen etwas weniger sensitiv gegenüber dem abszisionsäurehaltigen Medium sind (Abbildung 3.2.11, A). Während die Keimungsrate von Wildtyp und *drk5* in der Kontrolle annähernd 100 % erreicht, ist nach Zugabe von 1 µM ABA eine Reduzierung der Keimungsrate auf 60 % bzw. 80 % festzustellen (Abbildung 3.2.1, B). Dabei hat die Hormongabe einen Einfluss auf beide Linien. Der zu beobachtende Effekt ist jedoch in der *drk5*-Linie weniger stark ausgeprägt als in Col-0. Erhöht man die ABA-Konzentration auf 2 µM, so verstärkt sich die Keimungshemmung in beiden Linien. Es ist jedoch weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Keimungsraten zu erkennen. Bei

einer weiteren Erhöhung auf 5  $\mu$ M ABA stoppt die Keimung sowohl in *drk5*- als auch Wildtyppflanzen nach Ausbildung der Keimwurzel ab (Daten nicht abgebildet). Die *drk5*-Pflanzen sind also nicht grundsätzlich ABA insensitiv, sondern reagieren nur vermindert auf die Applikation dieses Hormons. Aus Zeitgründen steht eine Untersuchung der komplementierten *drk5*-Linien noch aus. Sie soll zeigen, ob der beobachtete Hormonphänotyp ebenfalls auf den *DRK5*-Gendefekt zurückzuführen ist, oder ob es sich um den Einfluss einer der sekundären T-DNA-Insertionen handelt.

Des Weiteren wurde die Wirkung von Methyljasmonsäure (MeJa), einem physiologisch aktiven Jasmonsäurederivat, betrachtet. Um zu untersuchen, ob die DRK5 in irgendeiner Weise in die durch Jasmonsäure vermittelte Signaltransduktion eingreift, wurde das Wurzelwachstum bei einer Konzentration von 5  $\mu$ M Methyljasmonsäure verglichen. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss des *DRK5*-Gendefekts auf die Sensitivität gegenüber MeJa festgestellt werden (Daten nicht abgebildet).

#### 3.2.4.4 Applikation abiotischer Stressoren

Das Pflanzenhormon ABA ist neben seiner Funktion in der Pathogenabwehr auch in der pflanzlichen Antwort auf Salzstress involviert (Mansfield 1987; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994; Koornneef *et al.* 1998; Achard *et al.* 2006). Verfolgt man anhand von *Microarray*-Daten die Expression der *DRK5* unter Salzstress (siehe Kapitel 3.2.2) kann man feststellen, dass das Gen sowohl durch Salz, als auch osmotischen Stress induziert wird. Daher lag es nahe zu prüfen, ob das Ausschalten der *DRK5* einen Einfluss auf die Sensitivität der Pflanze gegenüber NaCl hat.



**Abbildung 3.2.12: Keimungsexperiment auf NaCl haltigem Medium**

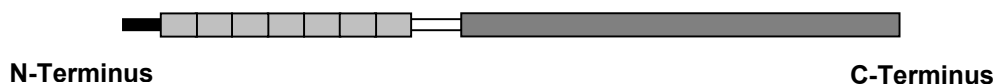
Oberflächensterilisierte, stratifizierte Samen wurden auf ½ MS bzw. ½ MS mit 130 mM NaCl ausgelegt und ihre Keimung unter Langtagbedingungen über einen Zeitraum von 11 Tagen verfolgt. In (A) sind die Keimlinge der Linien Col-0, *drk5* und *sos1-1* nach 7 Tagen abgebildet. (B) zeigt über den gesamten Zeitraum des Experiments die Rate der Keimlinge, welche mindestens Zweiblattstadium erreicht haben. Die hier abgebildeten Daten stehen stellvertretend für 3 unabhängig durchgeführte Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

In Keimungsexperimenten konnte ein signifikanter Unterschied der Sensitivität bezüglich NaCl zwischen den *drk5*- und den Wildtyppflanzen nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.12). Auf ½ MS Agar mit 130 mM NaCl ist die Keimungsrate der *DRK5*-defizienten Linie höher als die des vergleichbaren Wildtyps. Dieser Unterschied zeigt sich nicht, wenn das Saatgut auf Kontrollmedium ausgelegt wird. Anzumerken ist, dass es sich wie bei der verringerten Sensitivität gegenüber ABA auch beim Salzstress um graduelle Unterschiede handelt und nicht um vollständige Insensitivität. Als Positivkontrolle dient die *sos1-1* Mutante (*salt overly sensitive 1*, (Wu *et al.* 1996)), welche geringe Keimungsraten auf NaCl-haltigem Medium aufweist. Sie ist nicht im Diagramm dargestellt (Abbildung 3.2.12, B), da ihre Keimlinge auf salzhaltigem Medium niemals das Zweiblattstadium erreichen.

### 3.2.5 Molekulare Eigenschaften der DRK5

Anhand der DRK5-Proteinsequenz ist es möglich, bestimmte Aussagen über Struktur, Funktion und chemische Eigenschaften des Proteins zu treffen. Zu diesem Zweck wurde auf die Internetseiten TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://arabidopsis.org>, Rhee *et al.* 2003; Swarbreck *et al.* 2008) und PlantsP (<http://plantsp.sdsc.edu>, Gribskov *et al.* 2001) zurückgegriffen. Das 2135 bp große Gen enthält ein Intron von 77 bp welches sich im Bereich der vorhergesagten Kinasedomäne befindet (Kapitel 3.2.3, Abbildung 3.2.4). In seinem Grundaufbau entspricht die 685 Aminosäuren (AS) lange DRK5 dem Grundmodell einer LRR-RLK (Abbildung 3.2.13). Das 76 kDa große Protein wird mit 45 weiteren LRR-RLKs in die LRR III Unterfamilie eingeordnet (Shiu *et al.* 2004). Die nächsten Homologen LRR-RLKs sind At1g25320 und At2g01210 mit einer Gesamthomologie von jeweils 48 % (Aramemnon, Schwacke *et al.* 2003).

Die DRK5 verfügt über ein aminoterminalen Signalpeptid von 23 AS, welches vermutlich die Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran bestimmt (Kapitel 3.2.6). Es schließt sich eine kurze Sequenz an, der die 235 AS lange LRR Domäne folgt. Über eine 29 AS umfassende Transmembrandomäne ist diese mit einer Kinasedomäne von 292 AS Länge verbunden. Die Transmembrandomäne wird zu beiden Seiten von jeweils einer Juxtamembrandomäne flankiert.

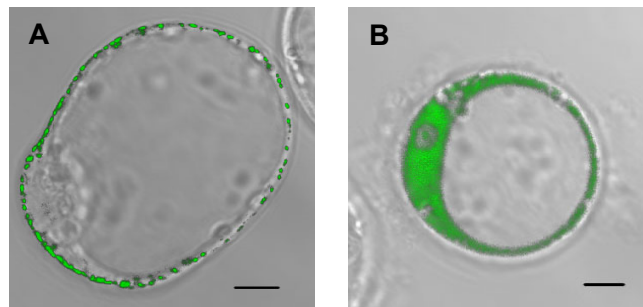


**Abbildung 3.2.13: Domänenstruktur des DRK5-Proteins**

Dargestellt ist die Domänenstruktur der DRK5 mit farblicher Unterscheidung von Signalpeptid (Schwarz), LRR-Domäne (Hellgrau), Transmembrandomäne (Weiß), Kinasedomäne (Dunkelgrau). Die Proteinsequenz ist in Anhang 7.3.3 dargestellt.

### 3.2.6 Lokalisation der DRK5

Basierend auf der Vorhersage der Domänenstruktur (Kapitel 3.2.5) lässt sich ableiten, dass es sich bei der DRK5 um ein membranständiges Protein handelt. Mit Hilfe eines DRK5-eGFP Fusionsproteins sollte die subzelluläre Lokalisation in pflanzlichem Material untersucht werden. Dazu wurde dieses Protein in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert (Kapitel 2.2.5) und mittels laserbasierter Konfokalmikroskopie (Kapitel 2.3.8) seine Verteilung in der Zelle visualisiert. Das Verteilungsmuster weist auf eine ausschließliche Lokalisierung des Fusionsproteins in der Plasmamembran hin, mit der Akkumulation in bestimmten, nicht genauer charakterisierbaren Bereichen (Abbildung 3.2.14). Im Vergleich dazu zeigt ein ebenfalls in Protoplasten exprimiertes GFP5 (GFP mit S65T) eine eindeutig zytoplasmatische Lokalisation.

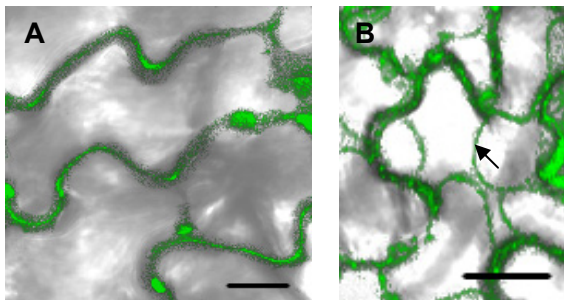


**Abbildung 3.2.14: Lokalisation der DRK5 in *Arabidopsis*-Protoplasten**

(A) Protoplasten wurden mit dem *35S:DRK5-eGFP*-Fusionskonstrukt transformiert. Als Kontrolle dient *35S:GFP5*. Die Fluoreszenz wurde mit einem Argon/Krypton Laser bei 488 nm angeregt und im Bereich von 500 bis 600 nm das emittierte Licht mit Hilfe des TCS SP2 der Firma LEICA gemessen und über die zugehörige Software visualisiert. Abgebildet sind jeweils die Überlagerungen des Durchlichtbildes mit dem durch das GFP erzeugten Fluoreszenzsignal. Der eingezeichnete Maßstab entspricht 10 µm.

Parallel wurde dasselbe DRK5-eGFP Fusionsprotein stabil in *Arabidopsis* Col-0 exprimiert. Die intrazelluläre Position des eGFP-Signals bestätigt die Lokalisierung des Fusionsproteins in der Plasmamembran (Abbildung 3.2.15). In Plasmolyseexperimenten (Kapitel 2.3.10) ist deutlich die Ablösung der Membran mit dem darin befindlichen Protein von der Zellwand zu erkennen. Auch in Pflanzen ist, wenn auch weniger ausgeprägt, eine Akkumulation des DRK5-eGFP-Proteins in einzelnen Bereichen zu beobachten. Es könnte sich dabei um die Aggregation des Proteins als Folge der verstärkten Expression unter dem *35S*-Promotor handeln. Andererseits ist es möglich, dass es sich um eine Ansammlung in DRK5-bindenden Proteinkomplexen handelt.





**Abbildung 3.2.15: Lokalisation der DRK5 in Arabidopsis Blattmaterial**

(A) Wildtyp *Arabidopsis*-Pflanzen wurden stabil mit dem *DRK5-eGFP*-Fusionskonstrukt transformiert. Die Fluoreszenz wurde wie in Abbildung 3.2.14 beschrieben visualisiert. (B) Eine Ablösung der Zellmembran (Pfeil) wurde über Plasmolyse durch Zugabe von 850 mM NaCl in 0,01 % Silwet erreicht. Die beiden Größenstandards repräsentieren 10 µm.

### 3.2.7 Struktur der LRR-Domäne der DRK5

Die LRR-Domäne der DRK5 ist carboxy- und aminoterminal von jeweils einem Cysteinpaar eingeschlossen und mit 7 Wiederholungen relativ klein, wobei eine strukturelle Besonderheit die Verschiebung des konservierten Isoleuzin-Prolin (IP) Paares am Ende des dritten Motivs in den Bereich des vierten hinein ist (unterstrichen). LRR-RLKs mit bekannter Ligandbindung, wie FLS2 oder auch BRI1 verfügen über 28 bzw. 25 LRRs. Im Vergleich dazu besitzt ein Korezeptor von BRI1 und FLS2, das BAK1-Protein, nur über 5 solcher Wiederholungen (Torii 2004).

```

55-                               C SWQ
GVT C NYDMRVVSI RLPNKRLSGSLDP
--SIGS LLSL-RHINLRDNDFQGKLP 1
VEL-FGLKGL-QSLVLSGNSFSGFVP 2
EEI-GSLKSL-MTLDLSENSFNGSIS 3
LSL-IPCKKL-KTLVLSKNSFSGDLP 4
TGLGSNLVHL-RTLNLSEFNRLTG TIP 5
EDV-GSLENLKGTLDLSHNFFSGMIP 6
TSL-GNLPEL-LYVDLSYNNLSGPIP 7
KFNVLLNAGPNAFQGNPFLGLPIKI
S C -281
--L --L--L---L-L--N-L-G-IP
    
```

**Abbildung 3.2.16: LRR-Domänenstruktur**

Analysiert wurde die LRR-Domäne der DRK5 im Bereich der Aminosäuren 55 bis 281. grau unterlegt sind die konservierten Leuzine, fett markiert weitere konservierte Aminosäuren (N, G, IP). Eingerahmt wird die Domäne durch schwarz unterlegte Cysteinpaare. In der untersten Zeile ist die Konsensussequenz dargestellt

### 3.2.8 Besonderheiten des DRK5-Promotors

Eine Betrachtung des *DRK5*-Promotors mit Hilfe des *PLACE signal scan* Programms (Higo *et al.* 1999) ergab das Vorkommen eines ABA responsiven Promotor Elements, ABREMOTIFAOSOSEM (Hattori *et al.* 1995), welches an Position 269 vor dem Start ATG beginnt (Anhang 7.3.1). Des Weiteren lassen sich eine Anzahl W-Boxen [(T)(T)TGAC(C/T)] finden. Das Kernmotiv (TGAC) ist essentiell für die Funktion und Bindung von WRKY-

Transkriptionsfaktoren (Eulgem *et al.* 2000). Von einigen dieser WRKY-Proteine ist bekannt, dass sie eine wichtige Rolle bei der Induktion von Genen der frühen Abwehrantwort spielen (Eulgem *et al.* 1999). Andererseits konnten Du und Chen 2000 zeigen, dass auch regulatorische Proteine, wie RLKs, ebenfalls durch W-Box bindende Faktoren transkriptionell reguliert werden.

### 3.2.9 Kinasefunktion der DRK5

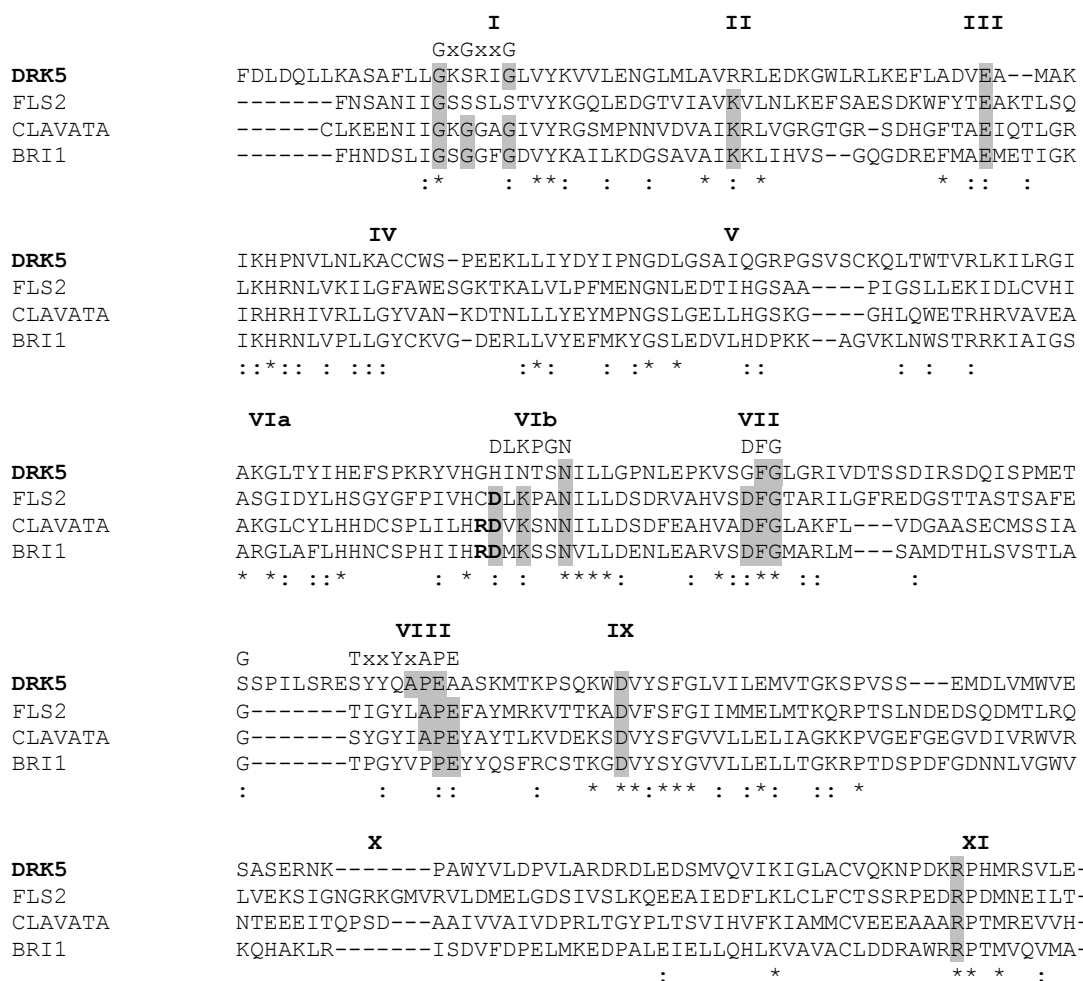


Abbildung 3.2.17: Sequenzabgleich der DRK5-Kinasedomäne mit der verwandter Proteine

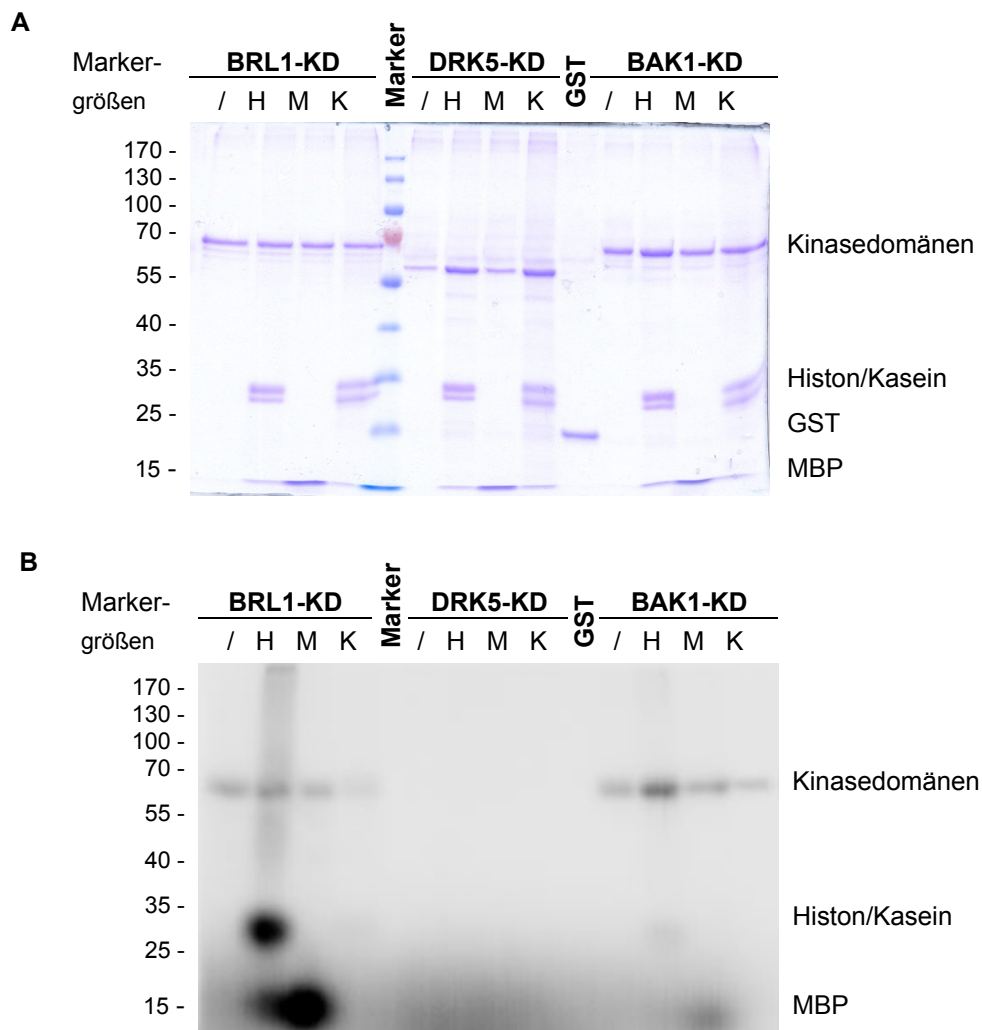
Mit Hilfe des Programms ClustalW (<http://align.genome.jp>) wurden die Sequenzen der LRR-RLKs DRK5, FLS2, CLAVATA und BRI1 abgeglichen und die konservierten Reste grau unterlegt. Das RD-Motiv in Unterdomäne VIb wurde fett markiert.

Die DRK5 wird durch die KinG-Datenbank in die Gruppe der Nicht-RD Kinasen eingeordnet (Dardick und Ronald 2006). Ihr fehlt die invariante Aminosäure Lysin in Subdomäne II, welche den Protonentransfer in der Phosphotransferreaktion vermittelt und essentiell für die Kinaseaktivität ist, ebenso wie die für die Katalyse essentiellen Asparaginsäurereste in Subdomäne VIb bzw. VII (KinG-Datenbank, Krupa *et al.* 2004). Auffällig ist auch eine Verschiebung des APE-Motivs in Subdomäne VIII relativ zum konservierten Asparaginsäurerest der Subdomäne IX. Dieses Motiv bestimmt, zusammen mit dem Lysin (K) in Unterdomäne VIb, die Serin-Threonin-Kinasespezifität. Obwohl die Kinasedomäne in ihrer Grundstruktur Sequenzhomologie zu bekannten pflanzlichen Rezeptorkinasen aufweist, ist es daher unwahrscheinlich, dass es sich um eine funktionelle Kinase handelt.

### **3.2.10 In vitro Kinaseaktivität der DRK5-Kinasedomäne**

Um zu untersuchen, ob es sich trotz der untypischen Kinasedomänensequenz bei der DRK5 um eine funktionelle Kinase handelt, wurde ein GST-DRK5-Kinasedomänen-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert und die Kinaseaktivität *in vitro* bestimmt (Kapitel 2.7.5). Dabei wurde sowohl die Fähigkeit des Proteins zur Autophosphorylierung untersucht, als auch die mögliche Phosphorylierung der artifiziellen Kinasesubstrate Histon, *myelin basic protein* (MBP) und Kasein betrachtet (Abbildung 3.2.18). Dazu wurde die DRK5-Kinasedomäne mit den Primern attB1At1g66830-KD und attB2At1g66830-MS von genomischer DNA amplifiziert und mit Hilfe der Gateway-Technologie in den Expressionsvektor pDEST15 kloniert (Kapitel 2.5.15). Alle verwendeten Proteine konnten heterolog exprimiert werden (Kapitel 2.7.5) und sind auch während des Kinaseaktivitätstests stabil (Abbildung 3.2.18, A). Während die Substrate Histon und Kasein als klar aufgetrennte Banden im Gel erschienen, befand sich das MBP auf Höhe der Lauffront. Die GST-Kinasedomänen Fusionsproteine zeigten ebenfalls die erwarteten Größen.

Für die beiden Kontrollprotein-Kinasedomänen BRL1-KD und BAK1-KD konnte sowohl eine Autophosphorylierung, als auch die Phosphorylierung der Substrate Histon und MBP nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.18, B). Die BRL1-KD ist außerdem, wenn auch schwach, in der Lage Kasein zu phosphorylieren. Im Gegensatz dazu konnte unter den gegebenen Bedingungen für die DRK5-Kinasedomäne keine Kinaseaktivität gezeigt werden. Die Negativkontrolle GST zeigt ebenfalls keine Phosphatanlagerung.



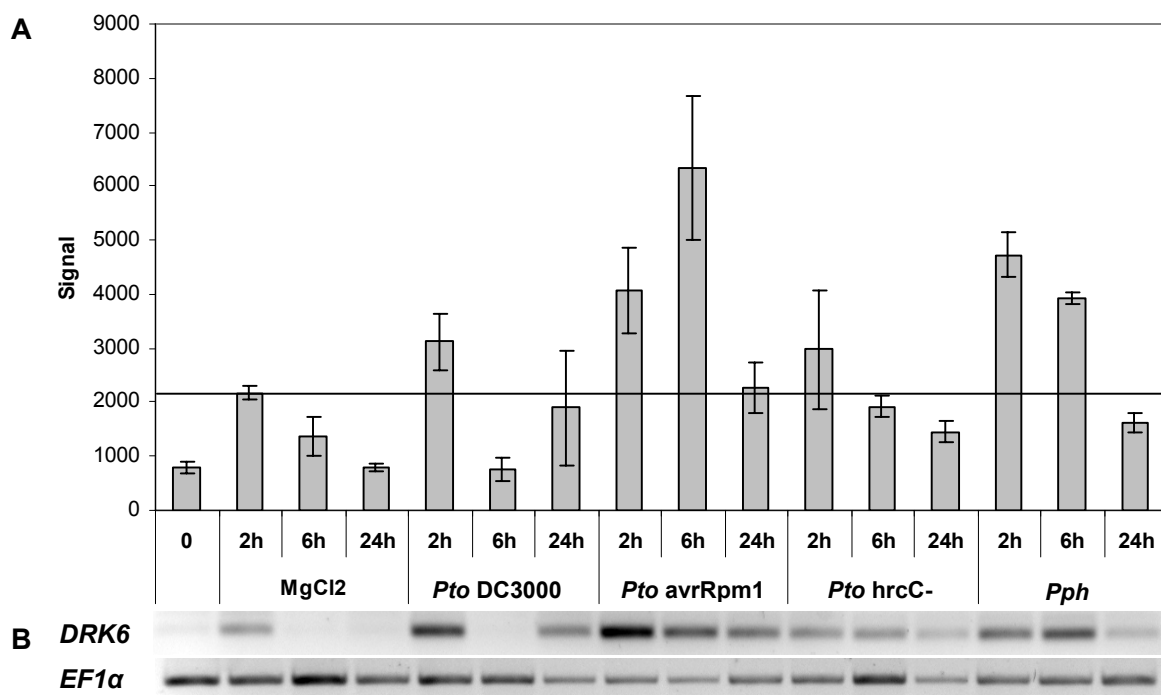
**Abbildung 3.2.18: *in vitro* Kinaseaktivitätstest der DRK5-Kinasedomäne**

Coomassie-Färbung (**A**) und Autoradiogramm (**B**) des Kinaseaktivitätstests. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte entweder ohne (/) oder nach Zugabe der Substrate Histon (H, 21,5-11,3 kDa), MBP (M, 18,4 kDa) bzw. Kasein (K, 25-19 kDa). Die GST-DRK5-Kinasedomäne ist bei etwa 62,5 kDa zu erwarten. Als Positivkontrollen dienten die ebenfalls heterolog exprimierte GST-Kinasedomänen-Fusionen von BRL1 (BRL1-KD, 69,5 kDa) und BAK1 (BAK1-KD, 70,5 kDa). Für die Negativkontrolle wurde nichtfusioniertes GST (28,5 kDa) verwendet.

### 3.3 DRK6

#### 3.3.1 DRK6-Expressionsmuster nach Behandlung mit Pathogenen

Eine weitere pathogeninduzierte LRR-RLK ist DRK6. Sie wurde ebenfalls als Kandidat aus der einleitend erwähnten hierarchischen Gruppierung ausgewählt (Kapitel 3.1). Das in den *Microarray*-Daten ermittelte Expressionsmuster nach Pathogeninfektion (Abbildung 3.3.1, Diagramm) sollte in einem unabhängigen Experiment durch RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.3.1, Gelfoto).



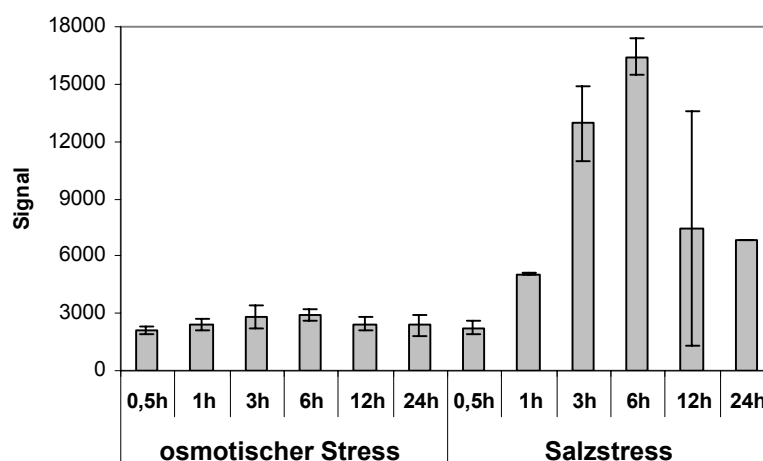
**Abbildung 3.3.1: *Microarray*-Daten und RT-PCR nach Infiltration mit verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen**

Nach Injektion von  $10^8$  cfu/ml der Bakterienstämme *Pto* DC3000, *Pto* avrRpm1, *Pto* hrcC- und *Pph* bzw. der Kontrolle 10 mM MgCl<sub>2</sub> wurde das Blattmaterial nach 2, 6 und 24 h geerntet und die RNA daraus isoliert. Als Nullwert wurden unbehandelte Proben verwendet. Die *Microarray*-Daten (**A**) wurden als Teil der AtGenExpress Initiative erstellt (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Die Verifizierung erfolgte in einem unabhängigen Experiment über eine RT-PCR (**B**) mit den *DRK6*-spezifischen Primern At5g25930-fw und -rev (300 bp). Die gleiche Menge Gesamt-cDNA wurde über die Angleichung auf Basis des *EF1α*-Transkripts (600 bp) gewährleistet.

Durch eine Infektion von *Arabidopsis*-Blättern mit dem virulenten Pathogen *Pto* DC3000 erfolgt innerhalb von 2 h eine *DRK6*-Induktion. Anschließend kommt es zur Verminderung der Transkriptmenge, welche nach 24 h wieder aufgehoben ist. Betrachtet man das Expressionsmuster nach Applikation der nichtvirulenten Bakterien *Pto* hrcC- bzw. *Pph*, so ist nach anfänglicher Induktion der *DRK6* nach 24 h ein Abfallen des Signals auf das Niveau der Kontrolle zu erkennen. Die stärkste Expression erfolgt durch eine Infektion mit dem avirulenten Pathogen *Pto* avrRpm1, wobei die Expressionsraten innerhalb der ersten 6 h stark ansteigen, nach 24 h jedoch annähernd auf das Kontrollniveau absinken. Die *Microarray*-Daten konnten durch semiquantitative RT-PCR bestätigt werden (Abbildung 3.3.1, B). Nur nach Infektion mit dem avirulenten *Pto* avrRpm1 lässt sich eine leicht Verschiebung des Expressionsmusters in frühere Zeitbereiche nach der Applikation beobachten.

### 3.3.2 Einfluss abiotischer Stressoren auf die *DRK6*-Expression

Da einige Gene im Verlauf einer allgemeinen Stressantwort ebenfalls durch abiotische Faktoren induzierbar sind, wurde mit Hilfe von *Microarray*-Daten die Expression der *DRK6* nach Applikation der unterschiedlichsten Stressoren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass es weder nach Kälte, Hitze, Trockenheit, Verwundung oder osmotischer Stress zu einer *DRK6*-Induktion kommt (Daten nicht abgebildet). Nur die Zugabe von Salz erhöhte die *DRK6*-Transkriptmenge und das ausschließlich im Wurzelgewebe (Abbildung 3.3.2).



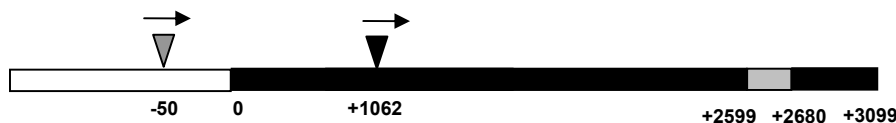
**Abbildung 3.3.2: Wurzelspezifische *DRK6*-Induktion unter Salzstress**

Die vorliegenden Daten wurden als Teil der AtGenExpress Initiative erstellt (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Aus den Proben der wie in Abbildung 3.2.3 beschrieben behandelten Proben wurde die RNA extrahiert. Mit dieser wurden ATH1 Chips hybridisiert und die Daten GCOS normalisiert. Im Diagramm sind die Daten der Wurzelproben dargestellt.

### 3.3.3 Analyse der T-DNA-Insertionslinien

Um die Funktion der DRK6 zu untersuchen, wurde auf kommerziell erhältliche *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien zurückgegriffen. Dabei handelt es sich einerseits um die Linie N591274 (*drk6-1*) des SALK-Institutes (Alonso *et al.* 2003) die über eine T-DNA-Insertion im Promotorbereich des Gens verfügt, andererseits stand die WiscDsLox-Linie N856397 (*drk6-2*; Woody *et al.* 2006) zur Verfügung, mit einer Unterbrechung des DRK6-Gens im Exonbereich, der für die LRR-Domäne kodiert. Während alle anderen in dieser Arbeit betrachteten *knockout*-Linien in einem Col-0 Hintergrund erzeugt wurden, handelt es sich bei der *drk6-2* um einen Col-2 Hintergrund.

Um eine phänotypische Betrachtung der T-DNA-Insertionslinie zu ermöglichen, war es wiederum einerseits notwendig, dass der Gendefekt homozygot vorliegt, andererseits musste ausgeschlossen werden, dass funktionelles Resttranskript erzeugt werden kann. Die Zahl der vorhandenen T-DNA-Insertionen sollte mit Hilfe der Southern-Hybridisierung ermittelt werden.



**Abbildung 3.3.3: Genstruktur und Positionen der T-DNA-Insertionen im DRK6-Gen**

Die Lokalisation der für den *knockout* verantwortlichen T-DNA-Insertionen sind durch graue, für die *drk6-1*, bzw. schwarze, im Fall der *drk6-2*, Dreiecke markiert (Pfeil zeigt die Orientierung an). Der weiße Abschnitt kennzeichnet die Promotorregion, schwarz unterlegt sind die Exonbereiche und das einzige Intron ist Grau hervorgehoben. Die jeweiligen Positionen sind als Basenpaare nach Beginn des Startcodons dargestellt.

#### 3.3.3.1 Genotypisierung

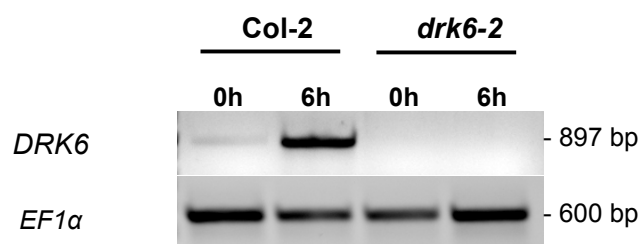
Für die Bestimmung geeigneter homozygoter *knockout*-Linien wurde Blattmaterial geerntet und mit der PCI-Methode die genomische DNA extrahiert und auf Homozygotie getestet (Kapitel 2.5.8). Zu Beginn der Arbeit war nur die *drk6-1* Linie erhältlich. Nach erfolgter Genotypisierung der ersten Generation konnten nur heterozygote Pflanzen und Wildtypen ermittelt werden. Auch in den nächsten beiden Generationen wurden nach dem Vermehren einer heterozygoten Pflanze keine homozygoten *drk6*-Mutanten gefunden (Abbildung 3.3.4). Das Verhältnis von heterozygoten zu Wildtyp Pflanzen war in jedem Fall etwa 1:1.





### 3.3.3.2 Nachweis der Inaktivierung auf Transkriptebene

Um sicherzugehen, dass in der *DRK6*-defizienten Linie kein funktionelles Transkript des betroffenen Gens erzeugt wird, wurden *Pto* avrRpm1-infizierte Pflanzen getestet (siehe auch Kapitel 3.2.1). Während in den parallel behandelten Wildtyppflanzen nach 6 h eine Induktion der *DRK6*-Transkription erfolgt, ist bei der *drk6-2*-Linie keine entsprechende RNA nachweisbar (Abbildung 3.3.6). Damit können die *drk6-2*-Pflanzen als vollständige *knockout*-Linie verwendet werden.

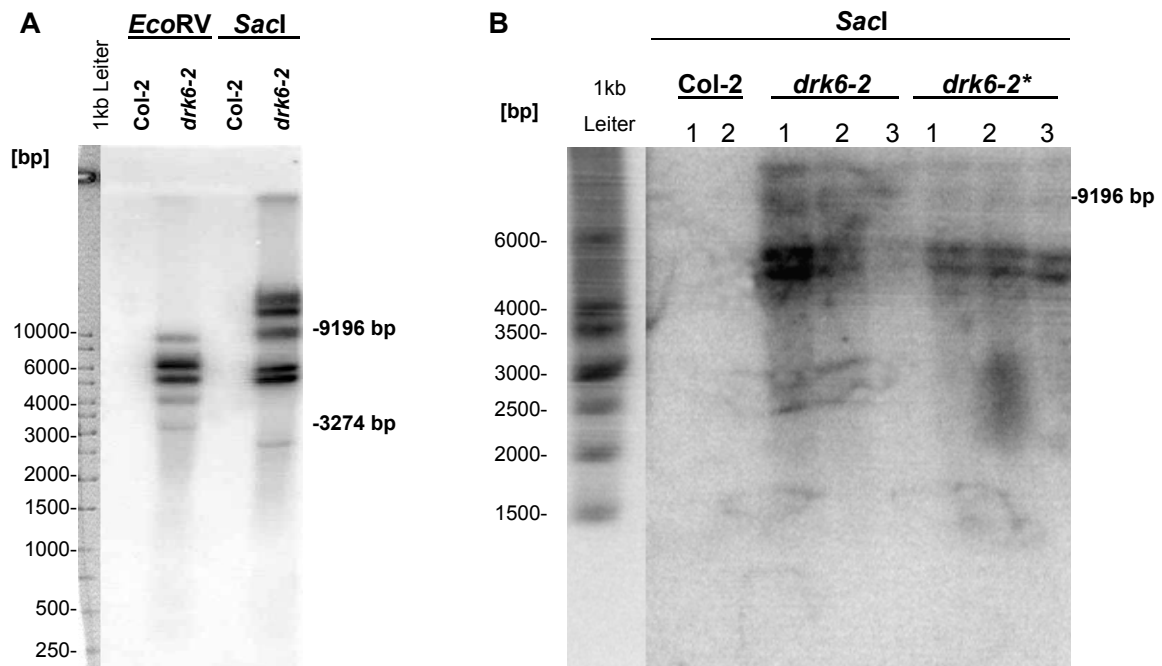


**Abbildung 3.3.6: RT-PCR zum Nachweis des *DRK6*-Transkriptes**

Die cDNA wurde wie in Abbildung 3.2.6 beschrieben hergestellt und die Transkriptmengen mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Für die Amplifikation des *DRK6*-Transkriptes wurden die Primer At5g25930-KD2 und -MS-ee verwendet (Anhang, Tabelle 7.1.1). Zur Bestimmung der *EF1α* Transkriptmenge wurden die Primer EF1α-s und -as benutzt (Anhang, Tabelle 7.1.1).

### 3.3.3.3 Bestimmung der Anzahl inserierter *T*-DNA-Fragmente

Damit man später eine Aussage treffen kann, mit welcher Wahrscheinlichkeit der erzeugte *DRK6*-Gendefekt für eventuell erkennbare Phänotypen verantwortlich ist, war es nötig festzustellen, ob und wie viele weitere Insertionen in der betrachteten Linie vorkommen. Dazu wurde jeweils 10 µg genomische DNA von Wildtyp und *drk6-2*-Pflanzen mit zwei geeigneten Restriktionsenzymen inkubiert (Kapitel 2.5.4). Anschließend wurden diese Proben auf einem Agarosegel aufgetrennt und auf eine Membran übertragen (Kapitel 2.5.12). Die Hybridisierung dieser Membran erfolgte mit einer radioaktiv markierten, *T*-DNA-spezifischen Sonde (Kapitel 2.5.11). Diese wurde über eine PCR (Kapitel 2.5.7) von der *drk6-2*-Linie mit dem Primerpaar Hyg<sub>c</sub>ds-f und -r amplifiziert (Anhang 7.2.2).



**Abbildung 3.3.7: Southern-Hybridisierungen mit einer T-DNA-spezifischen Sonde**

Aus den Blättern 5 Wochen alter Pflanzen wurde mit Hilfe der PCI-Methode (Kapitel 2.5.1) genomische DNA extrahiert. **(A)** Zur Bestimmung der T-DNA-Insertionszahl wurde die DNA von Col-2 und *drk6-2* mit den Enzymen *EcoRV* bzw. *SacI* fragmentiert. Anschließend folgte eine Southern-Hybridisierung (Kapitel 2.5.12) mit einer T-DNA-spezifischen Sonde. **(B)** Um die Zahl der Insertionen in den zurückgekreuzten *drk6-2\** Pflanzen zu ermitteln, wurden diese parallel zu dem Wildtyp Col-2 und der *drk6-2* Linie mit dem Enzym *SacI* inkubiert. Danach erfolgte eine Southern-Hybridisierung mit der T-DNA-spezifischen Sonde.

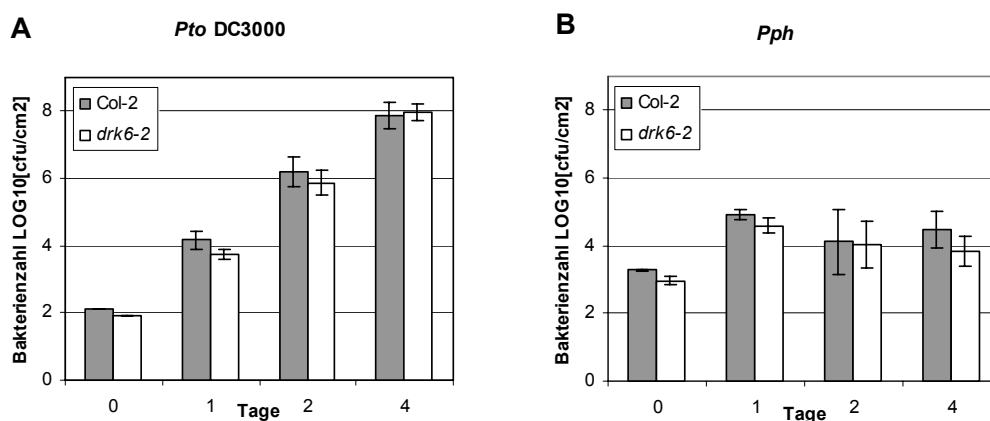
Es ist deutlich zu erkennen, dass in der *drk6-2* Linie mehr als die eine erwartete Bande von 3274 bp (*EcoRV*) bzw. 9196 bp (*SacI*) erscheinen (Abbildung 3.3.7, A). Da in der Wildtypkontrolle keine Signale auftreten, ist eine unspezifische Markierung des *Arabidopsis*-Genoms auszuschließen. Anhand der Bandenzahl lässt sich zurückführen, dass die *drk6-2* etwa fünf zusätzliche T-DNA-Insertionen enthält. Um diese zu entfernen wurde versucht die *drk6-2*-Linie gegen den entsprechenden Wildtyp zurückzukreuzen. Eine anschließende Southern-Hybridisierung der T2-Generation (*drk6-2\**) zeigte jedoch keine drastische Reduktion der Anzahl zusätzlicher T-DNA-Insertionen (Abbildung 3.3.7, B). In weiterführenden Rückkreuzungen muss versucht werden, die Insertionszahl stärker zu reduzieren.

### 3.3.4 Phänotypische Analysen der *DRK6*-defizienten *T*-DNA-Insertionslinie

Wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben wurde, wird die Transkription der *DRK6* durch verschiedene *Pseudomonas* Stämme induziert. Sowohl die Induktion nach Inokulation von nicht pathogenem *Pph*, als auch das Expressionsmuster nach *Pto* DC3000 Infektion gaben Anlass, den Effekt des *DRK6*-*knockouts* auf die Virulenz dieser Bakterien zu untersuchen. Besonders interessant erschien weiterhin die starke Induzierbarkeit durch das avirulente Bakterium *Pto* avrRpm1.

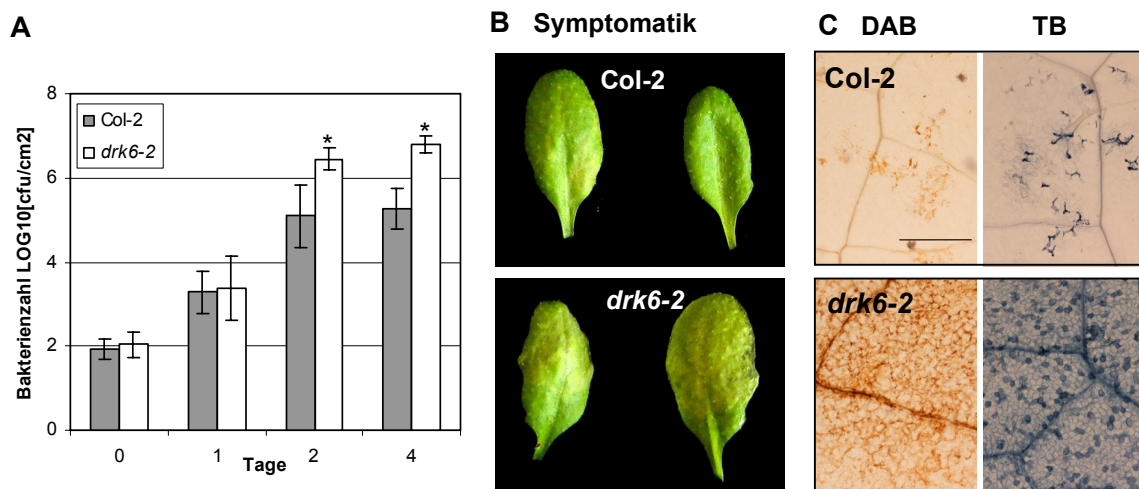
#### 3.3.4.1 Untersuchung des Wachstums bakterieller Pathogene in *drk6-2*-Pflanzen

Da die Expression der *DRK6* durch die Infektion mit virulenten (*Pto* DC3000) und auch nichtpathogenen Erregern (*Pph*) beeinflusst wird, sollte umgekehrt getestet werden, ob der *knockout* der Rezeptorkinase einen sichtbaren Einfluss auf das Bakterienwachstum dieser Stämme hat (Abbildung 3.3.8). Nach Infektion von Wildtyp und *drk6-2* mit *Pto* DC3000 ist ein deutlicher Anstieg der Pathogenzahl zu messen (Abbildung 3.2.8, A). Das Pathogen ist demnach in beiden Linien in der Lage, die Basisresistenz erfolgreich zu überwinden. Dabei ist kein signifikanter Unterschied in der Kinetik der Besiedlung zwischen Col-0 und *drk6-2* festzustellen. Die Untersuchung des *Pph*-Wachstums nach Infiltration in die untersuchten Pflanzenlinien zeigt ebenfalls ein typisches Bild (Abbildung 3.2.1, B). Nach kurzem Anstieg der Bakterienzahl während der ersten 24 h, bleibt die Zellzahl in beiden Linien annähernd konstant bzw. sinkt etwas ab.



**Abbildung 3.3.8: Bakterienwachstum von *Pto* DC3000 und *Pph***

In die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden  $10^5$  cfu/ml des jeweiligen Pathogens (**A**) *Pto* DC3000 bzw. (**B**) *Pph* injiziert und das bakterielle Wachstum wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben bestimmt. Die abgebildeten Werte stehen repräsentativ für 8 (A) bzw. 3 (B) unabhängige Versuche.



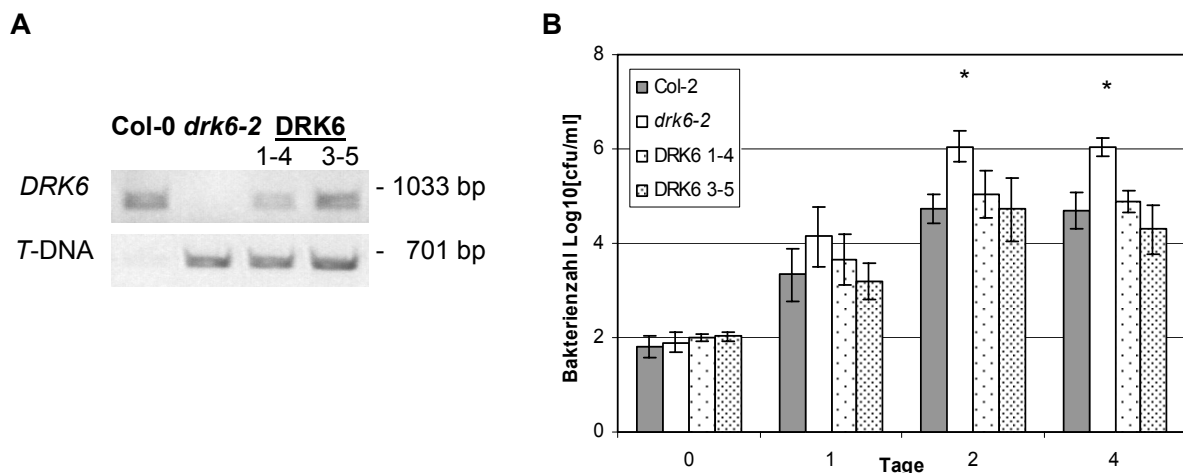
**Abbildung 3.3.9: Bakterienwachstum und Symptomatik nach *Pto avrRpm1*-Infektion**

In 5 Wochen alte Pflanzen wurden  $10^4$  cfu/ml *Pto avrRpm1*-Suspension infiltriert. **(A)** Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde das Bakterienwachstum wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Col-2 und *drk6-2* wurden mit „\*“ gekennzeichnet ( $p < 0,01$ , ANOVA, Kapitel 2.3.10). Die abgebildeten Daten stehen stellvertretend für 12 unabhängige Experimente mit ähnlichem Ergebnis. **(B)** Weiterhin wurden die makroskopisch sichtbaren Symptome 4 Tage nach der Infektion verglichen. **(C)** Parallel dazu wurden repräsentative Blätter auf reaktive Sauerstoffspezies (mittels DAB, Kapitel 2.3.5) bzw. Zelltodausrprägung (mit Trypanblau; TB, Kapitel 2.3.6) untersucht. Der dargestellte Balken repräsentiert die Länge von 1 mm.

Wie bereits in Kapitel 3.3.1 erwähnt, erreicht die *DRK6* ein sehr hohes Expressionsniveau nach Applikation des avirulenten Bakteriums *Pto avrRpm1*. Es war daher besonders interessant die Wirkung des Gendefekts bezüglich des Bakterienwachstums dieses Pathogens zu untersuchen. Verfolgt man das bakterielle Wachstum, so zeigt sich in Wilttyppflanzen nach anfänglichem Anstieg der Zellzahl nach den ersten 1 bis 2 Tagen eine deutliche Stagnation. Im Vergleich dazu ist das Pathogen im *drk6-2*-Hintergrund in der Lage sich um das bis zu 100-fache stärker zu vermehren (Abbildung 3.3.9, A). Diese Beobachtung wird begleitet von der Ausprägung von Chlorosen, einem typischen Krankheitssymptom der Pflanze. Der Phänotyp korreliert mit der verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Abbildung 3.3.9, B) und erhöhten Zelltoderaten (Abbildung 3.3.9, C). Ein Versuch die Zelltoderate über die Freisetzung von Ionen zu messen ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Col-2 und *drk6-2*-Pflanzen (nicht abgebildet).

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben, stand keine unabhängige weitere *DRK6*-defiziente Pflanzenlinie zur Verfügung. Weiterhin war es nicht möglich, die sekundären *T*-DNA-Insertionen der *drk6-2* durch Rückkreuzung zu beseitigen. Daher war es nötig den

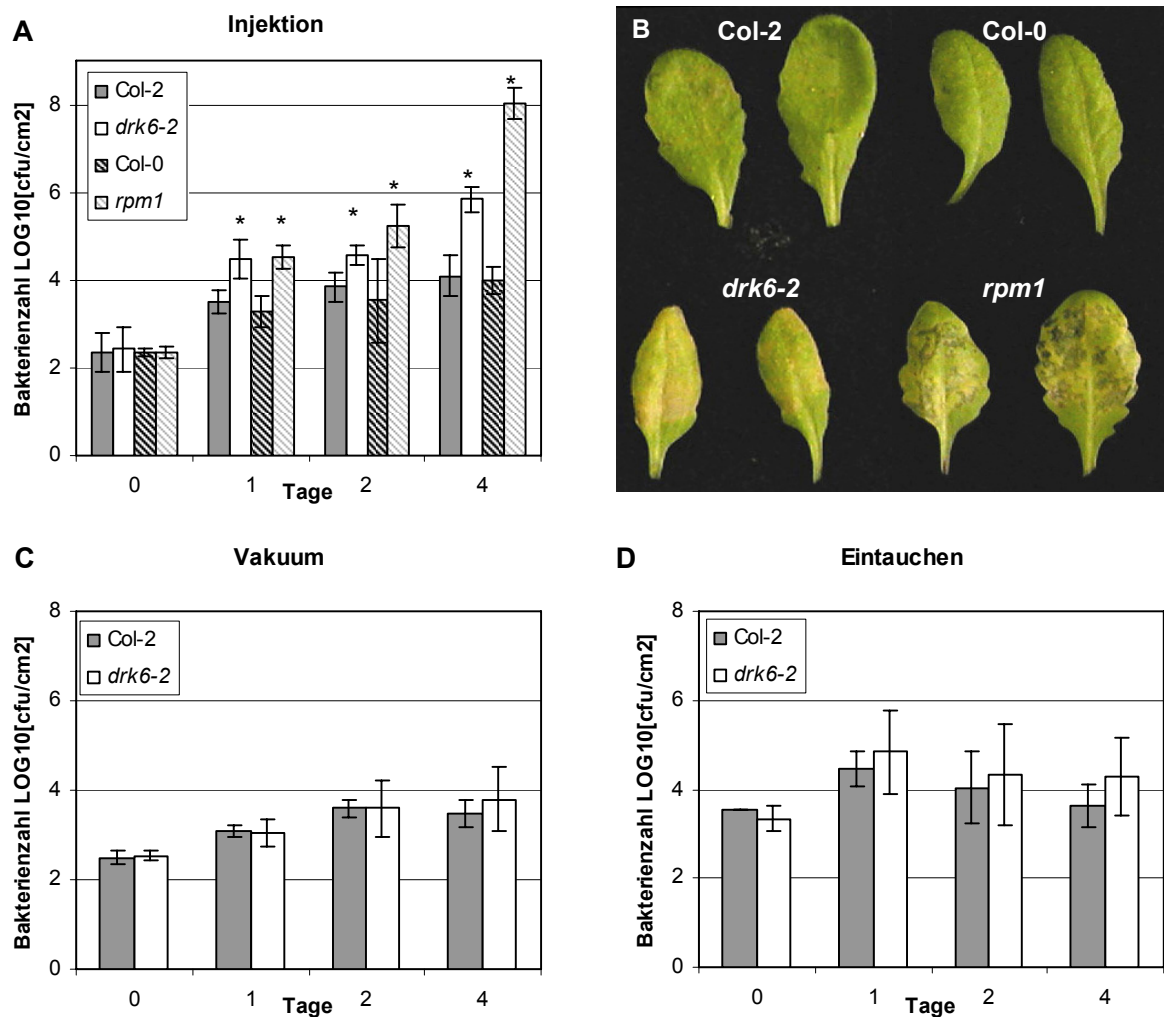
Gendefekt durch Transformation des *DRK6*-Gens mit seinem endogenen Promotor zu komplementieren und die Wiederherstellung des Wildtypphänotyps nachzuweisen (Kapitel 2.2.3). Die Verifizierung der komplementierten Linien erfolgte durch Genotypisierung der Linien (Abbildung 3.3.10, A). Nach Bestimmung des bakteriellen Wachstums ist ein signifikanter Unterschied zwischen der *drk6-2* und den anderen Linien zu erkennen (Abbildung 3.3.10, B). Das Bakterienwachstum in den beiden komplementierten Pflanzenlinien (DRK6 1-4, DRK6 3-5) ist vergleichbar mit dem im entsprechenden Wildtyp Col-2.



**Abbildung 3.3.10: *Pto avrRpm1*-Wachstum nach Komplementation des *DRK6*-Gendefekts**

(A) Die Verifizierung der komplementierten Linien DRK6 1-4 bzw. 3-5 wurde mittels PCR wie in Abbildung 3.3.5 beschrieben durchgeführt. (B) In 5 Wochen alte Pflanzen wurden  $10^4$  cfu/ml *Pto avrRpm1*-Suspension infiltriert. Über einen Zeitraum von 4 Tagen wurde das Bakterienwachstum wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben ermittelt. In einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Kapitel 2.3.10) wurden die erhaltenen Wertepaare getestet. Signifikante Unterschiede sind mit „\*“ gekennzeichnet ( $p < 0,01$ ).

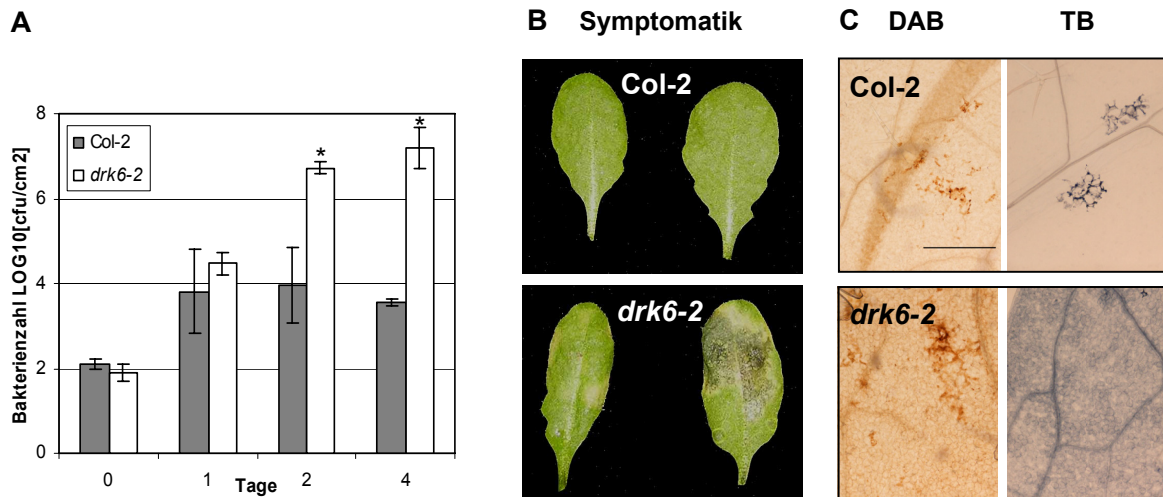
Weitere Untersuchungen zeigten, dass der Wachstumseffekt und die damit einhergehende Symptomausprägung nicht so stark ausgeprägt ist wie bei der Resistenzgen (*R*-Gen) Mutante *rpm1* (Abbildung 3.3.11, A, B). Während in dieser die Pathogenizität des Bakteriums vollständig wiederhergestellt ist, ist in *drk6-2*-Pflanzen lediglich eine partielle Aufhebung des Avirulenzeffekts festzustellen. Weiterhin ist anzumerken, dass ausschließlich bei der verwendeten Applikationsmethode der Unterschied zwischen Wildtyp und *drk6-2* zu beobachten ist (Abbildung 3.3.11, A, C, D). Nur die direkte Injektion geringer Inokulum Konzentrationen macht es möglich die Wachstumsdifferenz aufzulösen. Andere in der Literatur verwendete Methoden, wie eine Vakuuminfiltration gleicher Bakterienmengen oder das Eintauchen der Pflanzen in eine hochkonzentrierte Pathogensuspension (Whalen *et al.* 1991), zeigten nicht den durch manuelle Infiltration erzielten Effekt.



**Abbildung 3.3.11: Variation der *Pto avrRpm1* Applikationsmethode**

Die 5 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen der jeweiligen Linien wurden auf die angegebene Weise mit der Bakteriensuspension inokuliert und das bakterielle Wachstum wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben bestimmt. Betrachtet wurden (A) ein Vergleich des bakteriellen Wachstums in den Linien *drk6-2* und *rpm1* mit den dazugehörigen Wildtypen und (B) die dabei ausgeprägten Symptome. Andererseits wurde (C, D) der Einfluss der Applikationsmethode auf die Suszeptibilität der *drk6-2* überprüft. Dabei wurden die Pflanzen entweder (A, B) mit  $10^4$  cfu/ml Bakteriensuspension manuell infiltriert, (C)  $10^4$  cfu/ml mit 0,004 % Silwet durch Vakuum inokuliert oder aber (D) die Rosette in  $10^8$  cfu/ml mit 0,02 % Silwet eingetaucht. In einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Kapitel 2.3.10) wurden die erhaltenen Wertepaare getestet. Werte die mit einem „\*“ gekennzeichnet wurden, weisen signifikante Unterschiede zum Wildtyp auf ( $p < 0,01$ ). Die gezeigten Ergebnisse konnten in (A) 2, (C) 4 bzw. (D) 3 unabhängigen Experimenten wiederholt werden.

Da bekannt ist, dass das Avirulenzprotein AvrB durch dasselbe *R*-Gen in *Arabidopsis* erkannt wird wie AvrRpm1 sollte untersucht werden, ob mit dem Pathogen *Pto* *avrB* ebenfalls eine Wachstumsdifferenz zwischen Col-2 und *drk6-2* nachgewiesen werden kann. Wie in Abbildung 3.3.12 deutlich zu erkennen ist, zeigen sich nach der Applikation des Bakteriums dieselben Symptome, die vorher mit *Pto* *avrRpm1* beobachtet werden konnten. Es ist ein signifikanter Wachstumsunterschied zu beobachten, der durch deutliche Symptome in der *drk6-2*-Linie begleitet wird. Eine Analyse der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und der Ausprägung pathogenverursachten Zelltods ergibt ein ähnliches Resultat wie nach Injektion von *Pto* *avrRpm1*. Während es in den Wildtyppflanzen nur geringfügig zur ROS-Produktion und dem Absterben der Zellen kommt, sind in der *drk6-2* größere Bereiche davon betroffen. Das Pathogen ist also in der Lage sich in der Pflanze in gewissem Maße zu vermehren. Es wird jedoch prinzipiell immer noch durch diese erkannt und eine hypersensitive Reaktion (HR) ausgelöst. Die Beobachtung von Ereignissen wie verstärkter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entwicklung und vermehrten Zelltodereignissen ist somit eventuell auf die erhöhte Bakteriendichte zurückzuführen. Aus zeitlichen Gründen konnte noch nicht untersucht werden, ob eine Komplementation des *DRK6*-Gendefektes ebenfalls zur Wiederherstellung des Wildtypphänotyps führt.

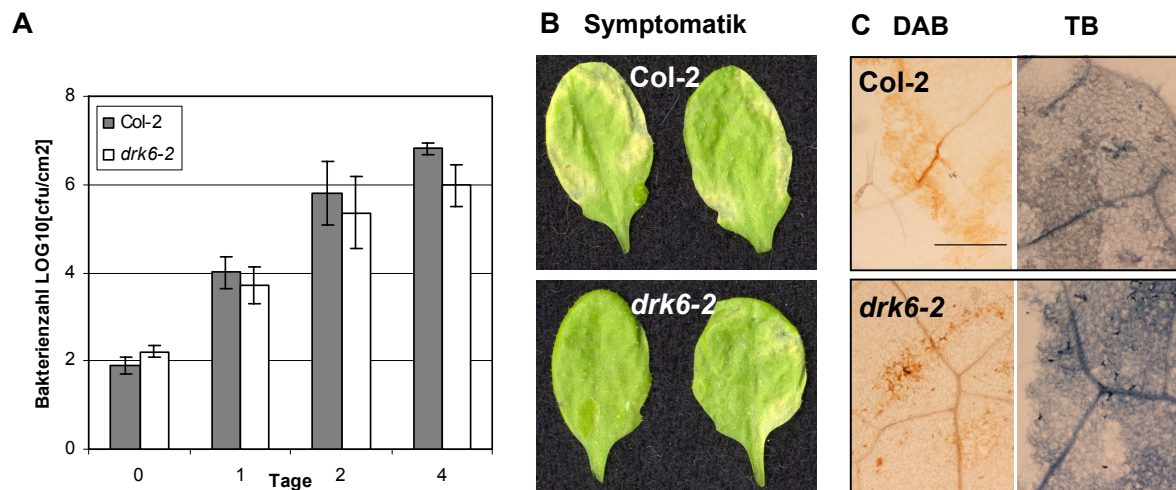


**Abbildung 3.3.12: Bakterienwachstum und Symptomatik nach *Pto* *avrB*-Applikation**

Die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden mit 10<sup>4</sup> cfu/ml *Pto* *avrB* Suspension infiltriert. **(A)** Die Bestimmung des Bakterienwachstums erfolgte wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben über einen Zeitraum von 4 Tagen. Signifikante Unterschiede wurden mit „\*“ gekennzeichnet (p<0,01, (ANOVA, Kapitel 2.3.10). Die gezeigten Daten stehen repräsentativ für 2 unabhängige Experimente **(B)** Parallel wurden die makroskopisch sichtbaren Symptome 4 Tage nach der Infektion dokumentiert. **(C)** Parallel dazu wurden repräsentative Blätter auf reaktive Sauerstoffspezies (mittels DAB, Kapitel 2.3.5) bzw. Zelltodausprägung (mit Trypanblau; TB, Kapitel 2.3.6) untersucht. Die Länge des eingefügten Balkens entspricht einer realen Länge von 1 mm.



Im Folgenden galt es zu ermitteln, ob es sich um einen generellen Effekt bei der *Avr-R*-Gen Interaktion und der durch sie vermittelten HR handelt, oder er spezifisch für die RPM1-abhängige HR-Vermittlung ist. Dazu wurde die Wirkung eines unabhängigen *Avr*-Genproduktes, des *AvrRpt2*, auf das bakterielle Wachstum überprüft.



**Abbildung 3.3.13: Analyse von Bakterienwachstum und Symptomatik nach *Pto avrRpt2*-Infektion**

Die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen der jeweiligen Linie wurden mit  $10^4$  cfu/ml *Pto avrRpt2*-Suspension infiltriert. In **(A)** ist die in Kapitel 2.3.3 beschriebene Bestimmung des Bakterienwachstums dargestellt. Das gezeigte Experiment steht stellvertretend für 7 unabhängige Wiederholungen. **(B)** zeigt die makroskopisch sichtbaren Symptome 4 Tage nach der Infektion. **(C)** Parallel dazu wurden repräsentative Blätter auf reaktive Sauerstoffspezies (mittels DAB, Kapitel 2.3.5) bzw. Zelltodausprägung (mit Trypanblau; TB, Kapitel 2.3.6) untersucht. Die Länge des eingezeichneten Balkens beträgt 1 mm.

Eine Expression des *AvrRpt2*-Proteins in *Pto* führt sowohl in Col-2 als auch in der *drk6-2* zu einem Wachstumsstopp innerhalb der ersten 2 Tage nach der Infektion (Abbildung 3.3.13, A). Die Ausprägung leichter Chlorosen erfolgt in beiden Linien in gleichem Maße. Eine Kontrolle von ROS-Produktion (Abbildung 3.3.13, B) und Zelltodereignissen (Abbildung 3.3.13, C) zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Pflanzenlinien. Aus den Untersuchungen lässt sich schlussfolgern, dass der beobachtete Wachstumseffekt spezifisch für den Mechanismus der Erkennung von *AvrRpm1* bzw. *AvrB* ist.

### 3.3.4.2 Analyse weiterer Pathogene

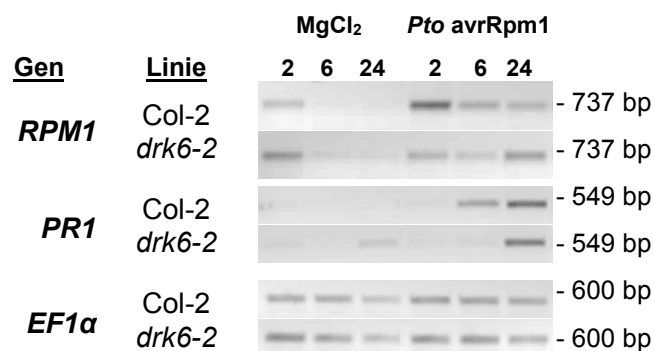
Neben der Untersuchung des *DRK6*-Gendefekts auf das Wachstum verschiedener *Pseudomonas*-Stämme, war es wichtig weitere Pathogene auf veränderte Virulenz zu



untersuchen. So wurden im Weiteren das Wachstum der nekrotrophen Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* getestet, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied im Vergleich zum Wildtyp beobachten zu können. In Kooperation mit V. Lipka konnte zusätzlich der Einfluss auf die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber den Pathogenen *Erysiphe pisi* und *Blumeria graminis* bzw. verschiedener *Colletotrichum* Arten wie *C. higginsianum*, *C. lagenarium*, *C. trifolii* oder *C. lindemuthianum* untersucht werden. Keines der genannten Pathogenen zeigte jedoch makroskopische Unterschiede beim Befall von Col-2 im Vergleich zur *drk6-2*-Linie.

### 3.3.5 Markergenexpression der *drk6-2*

Es konnte gezeigt werden, dass nach Infektion von *drk6-2*-Pflanzen mit *Pto avrRpm1/Pto avrB* ein verstärktes Bakterienwachstum im Vergleich zum Wildtyp auftritt. Die in diesen Pathogenen exprimierten Avirulenzfaktoren AvrRpm1 und AvrB werden beide durch das R-Protein RPM1 erkannt. Daher lag es nahe zu überprüfen, ob der *DRK6*-Gendefekt einen Einfluss auf die Expression von *RPM1* hat. Dazu wurden die Pflanzen mit *Pto avrRpm1* und *Pto avrRpt2* infiziert und im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit  $MgCl_2$  das Expressionsmuster überprüft (Abbildung 3.3.14). Ein verbreitetes Phänomen in Mutanten mit veränderter Pathogenabwehr ist die abnorme Expression von *PR*-Genen. Vor diesem Hintergrund und um den Erfolg der Infektion nachweisen zu können, wurde parallel die Expression des *PR1*-Gens kontrolliert.



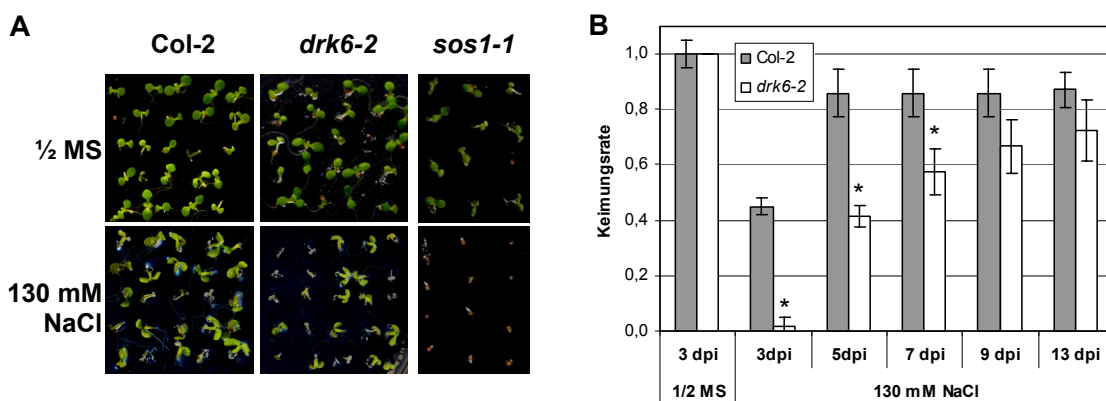
**Abbildung 3.3.14: Expression der Markergene *RPM1* und *PR1***

In die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden 10 mM  $MgCl_2$  bzw.  $10^8$  cfu/ml der angegebenen Bakterien injiziert. Dabei wurden die Linien Col-2 und *drk6-2* verglichen. Nach 2, 6 und 24 h wurden die Proben geerntet und über semiquantitative RT-PCR die Transkriptmengen untersucht (Kapitel 2.6.3). Die PCR erfolgte mit den Primerpaaren *RPM1*-5' und -3' bzw. *PR1*-s und -as. Als interne Kontrolle für die Menge Gesamt-cDNA diente das Transkript des konstitutiv exprimierten Gens *EF1α*. Das dargestellte Ergebnis steht repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

Es ist zuerkennen, dass *RPM1* sowohl im Wildtyp, als auch in der *DRK6-knockout*-Linie exprimiert werden kann. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Induktion durch *Pto avrRpm1* schwächer ausfällt als in der Col-2 Kontrolle. Des Weiteren fällt auf, dass auch die *PR1*-Expression nach Infektion mit *Pto avrRpm1* später einsetzt bzw. in geringerem Maße stattfindet. Diese Ergebnisse konnten in derselben Form reproduziert werden.

### 3.3.6 Einfluss des *DRK6*-Gendefektes auf die Wirkung abiotischer Stressoren

Wie bereits erwähnt wurde, erfährt die *DRK6* eine starke Induktion der Expression nach Applikation von Salzstress, nicht jedoch unter osmotischem Stress (Kapitel 3.3.2, Abbildung 3.3.2). Aufgrund dieser Beobachtung wurden Keimungsexperimente auf NaCl-haltigem Medium durchgeführt (Abbildung 3.3.15). Als Positivkontrolle wurde die Mutante *sos1-1* herangezogen, eine Mutante des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters SOS1 (AtNHX7, At2g01980), welche Salz-hypersensitiv ist Wu *et al.* 1996.



**Abbildung 3.3.15: Keimungsexperiment auf NaCl-haltigem MS-Agar**

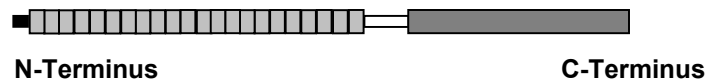
Oberflächensterilisierte, stratifizierte Samen der Linien Col-2, *drk6-2* und *sos1-1* wurden unter Langtagbedingungen über einen Zeitraum von 13 Tagen auf 1/2 MS bzw. 1/2 MS mit 130 mM NaCl angezogen. In (A) sind 7 Tage alte Keimlinge abgebildet, (B) zeigt die Zeitabhängigkeit der Keimung von Col-2 und *drk6-2*. Signifikante Unterschiede zwischen den Keimungsraten beider Linien wurde über einfaktorische Varianzanalyse getestet ( $p < 0,01$ , Kapitel ) und mit „\*“ gekennzeichnet.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sowohl Col-2, als auch die beiden Mutanten im Vergleich zur Kontrolle verminderte Keimung auf salzhaltigem Medium zeigen. Die Ausprägung dieses Effekts ist jedoch unterschiedlich stark. Während Col-2 Pflanzen leicht verspätet keimen und nach etwa 5 Tagen das 0,8-fache der normalen Keimungsrate erreichen, benötigt die *drk6-2*-Linie mehr Zeit und erreicht erst nach mindestens 13 Tagen eine ähnliche Keimungsrate. Die *sos1-1*-Pflanzen wiederum sind auf NaCl-haltigem Medium übermäßig stark in ihrer Keimung gehemmt. Sie erreichen in der gesamten Versuchszeit niemals das Zweiblattstadium. Es lässt sich demnach feststellen, dass eine *DRK6*-Defizienz zur schwach erhöhten Sensitivität gegenüber Salzstress führt. Ob eine Komplementation des Gendefekts diesen Phänotyp wieder aufheben kann, konnte aus zeitlichen Gründen nicht mehr untersucht werden.

### **3.3.7 Proteinstruktur und Molekulare Eigenschaften der DRK6**

Wie bereits erwähnt, gehört die DRK6 zur Proteinfamilie der LRR-RLKs (Abbildung 3.3.16). Zusammen mit weiteren 28 Proteinen wird es in die Unterfamilie LRR-XI eingeordnet, zu der auch CLV1 (Clark *et al.* 1993; Clark *et al.* 1997) und HAESA (Walker 1993) gehören (Shiu und Bleecker 2001b). Betrachtet man ausschließlich die LRR-Domäne, so ist das nächste homologe Protein At5g25910 (69 % Homologie). Ein *knockout* dieses Proteins zeigte eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Erysiphe cichoracearum* (Ramonell *et al.* 2005). Analysiert man die Gesamtsequenz, so ist eines der nächsten Verwandten die Rezeptorkinase HAESA (At4g28490) mit ca. 40 % Homologie (Aramemnon, Schwacke *et al.* 2003). Dieses LRR-Rezeptorprotein ist im Trenngewebe der Blüte exprimiert und reguliert z. B. das Abwerfen der Blütenorgane (Walker 1993; Jinn *et al.* 2000).

Die DRK6 verfügt über ein aminotermiales, hydrophobes Signalpeptid von 21 AS Länge. Die sich anschließende leuzinreichen Regionen (LRRs) umfassen einen Bereich von etwa 522 AS. In bekannten LRR-RLKs wie z. B. FLS2 oder CLV1 dient dieser Bereich der Bindung eines peptidischen Liganden bzw. eines Interaktionspartners. Der folgende Abschnitt besteht aus aminoterminaler Juxtamembrandomäne (25 AS), der Transmembrandomäne (Aminosäuren 628-651) und der carboxyterminalen Juxtamembrandomäne (34 AS). Dieser Bereich verbindet die LRR-Domäne mit der carboxyterminal gelegenen, intrazellulären Kinasedomäne, welche 301 AS lang ist. An sie schließt sich bei der DRK6 aminoterminal eine weitere kurze Sequenz von 20 AS an.



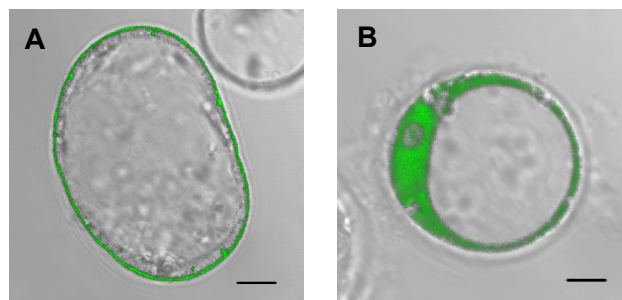
**Abbildung 3.3.16: Domänenstruktur des DRK6-Proteins**

Dargestellt ist die Domänenstruktur der DRK6 bestehend aus Signalpeptid (Schwarz), LRR-Domäne (Hellgrau), Transmembrandomäne (Weiß) und Kinasedomäne (Dunkelgrau). Die Aminosäuresequenz ist im Anhang 7.4.2. abgebildet

### **3.3.8 Lokalisation der DRK6**

Aufgrund der vorhergesagten Domänenstruktur (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>, Gribskov *et al.* 2001) handelt es sich bei der DRK6 um ein membranständiges Protein. Es musste daher untersucht werden, ob das Protein in der Plasmamembran oder der Membran eines anderen Kompartiments integriert ist.

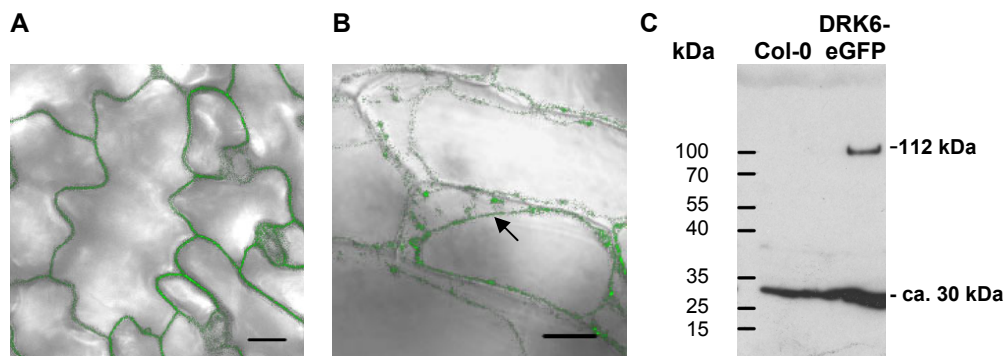
Dazu wurde an das Volllängenprotein carboxyterminal der Fluoreszenzmarker eGFP fusioniert und mit diesem Konstrukt Protoplasten transformiert (Kapitel 2.2.5). Die Visualisierung erfolgte mittels laserbasierter Konfokalmikroskopie (LCSM, Kapitel 2.3.8). In Abbildung 3.3.17 lässt sich in einer Überlagerung von GFP-Signal und Durchlichtbild erkennen, dass das DRK6-eGFP Fusionsprotein in der Plasmamembran lokalisiert ist. Die GFP5 (GFP mit S65T) Kontrolle hingegen ist eindeutig im Zytoplasma lokalisiert.



**Abbildung 3.3.17: DRK6-Lokalisation in *Arabidopsis* Protoplasten**

**(A)** *Arabidopsis*-Protoplasten wurden mit dem 35S:DRK6-eGFP Fusionskonstrukt transformiert und die intrazelluläre Verteilung des Proteins wie in Abbildung 3.3.17 beschrieben visualisiert. **(B)** Zum Vergleich dient die Lokalisation von 35S:GFP5 in Protoplasten. Der angegebenen Balken repräsentiert eine Länge von 1 mm.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob eine stabile Expression desselben Konstrukts in Pflanzen des Wildtyps Col-0 zum gleichen Ergebnis führt. Dazu wurden Agrobakterien mit dem *DRK6-eGFP* Konstrukt transformiert (Kapitel 2.4.4.2) und damit *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen stabil transformiert (Kapitel 2.2.6). Mit Hilfe der LCS Mikroskopie (Kapitel 2.3.8) war es möglich, die Lokalisation des DRK6-eGFPs in der Plasmamembran zu visualisieren (Abbildung 3.3.18, A). Eine durch Plasmolyse (Kapitel 2.3.10) hervorgerufene Ablösung der Zellmembran von der Zellwand verdeutlicht diese Beobachtung (Abbildung 3.3.18, B). Nach einem Aufschluss der Zellen lässt sich das 112 kDa große DRK6-GFP-Fusionsprotein mit Hilfe eines Western-*blot* nachweisen (Abbildung 3.3.18, C; Kapitel 2.7.4). Im Bereich von etwa 30 kDa detektiert der verwendete Antikörper, sowohl in Wildtyp- als auch DRK6-eGFP-Probe, unspezifisch ein weiteres Protein.



**Abbildung 3.3.18: Zelluläre Lokalisation des DRK6-eGFP-Fusionsproteins in *Arabidopsis*-Blättern**

(A) *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen wurden stabil mit dem *DRK6-eGFP*-Fusionskonstrukt transformiert und die intrazelluläre Verteilung des Proteins durch LCS-Mikroskopie visualisiert. (B) Die Plasmolyse erfolgte mittels Zugabe von 850 mM NaCl in 0,01 % Silwet. Dargestellt sind Überlagerungen von Fluoreszenzsignal und Durchlichtbild. Ein Pfeil markiert die abgelöste Plasmamembran. Die eingezeichneten Balken repräsentieren eine Länge von 1 mm. (C) Das 112 kDa große Fusionsprotein lässt sich in einem Western-*blot* (Kapitel 2.7.4) mit Hilfe eines  $\alpha$ -GFP Antikörpers spezifisch in den DRK6-eGFP-Pflanzen detektieren.

### 3.3.9 Struktur der DRK6-LRR-Domäne

(A)		(B)			
50-	SSPQNW	DRK6	CNWSEITC	--LRR--	CADNPVLSLPDC
SEIT	TAGNVTGINFKNQFTGTVP	Xa21	CTWVGVC	--LRR--	CGGIPDLHLPRC
TTICDLS	NLNF <sup>■</sup> LDLSFN <sup>■</sup> YFAGEFP	HAESA	CKWLVGVC	--LRR--	CVDL <sup>■</sup> DGLC
TVLYNCT	KLQYLDLSQNLN <sup>■</sup> GSIP	CLV1	CSFSGVSC	--LRR--	CLPHRVSC
VDIRLSPELDYLDLAANGFSGDIP	3	BRI1	CTFDGVTC	--LRR--	CGYPLPRC
KSLGRIS	KLKVLNLYQSEYD <sup>■</sup> GTFPSEI				
GDLSELE	ELRLALNDKFTPAKIP	<b>Konsensus</b>	C-F-G--C		
IEFGK <sup>■</sup> LK	KLKYMWLEEMNLIGEIS		W		
PVVFENMTDLEHVDLSVNNLTGRIP	7				
DVLFGLK	NLTEFYLFANGLTGEIP				
KSISAT	--NLVFLDLSANNLTGSIP				
VSIGNLT	KLQVNLNLFNNKLTGEIP				
PVIGKL	PGLKEFKIFNNKLTGEIP				
AEIGVHS	KLERFEVSENQLTGKLP				
ENLCKGG	KLQGVVVSNNLTGEIP				
ESLGDCG	TLT <sup>■</sup> VQLQNNDFSGKFP				
SRIWNAS	SMYSLQVSNNSFTGELP				
ENVAWNMS	---RIEIDNNRFSGEIP				
KKIGTWSS	LVEFKAGNNQFSGEFP				
KELTSLS	NLISIFLDENDLTGELP				
DEIISWK	SLITLSLSKNKLSGEIP				
RALGLL	PRLLNLDLSENQFSGGIP				
PEIGSL	--KLTFNVSSNRLTGGIP				
EQLDNLA	--YERF <sup>■</sup> LNN <sup>■</sup> NLQADNP				
VLSLPD	QRKQRRGSRGFP <sup>■</sup> GKILAMI				
--L--L---	L--L--N-L-G-IP				

Abbildung 3.3.19: Struktur der LRR-Domäne

(A) Alignment der leuzinreichen Bereiche der DRK6-LRR-Domäne. Die paarigen Cysteine sind schwarz unterlegt, die konservierten Leuzine grau markiert und andere, der Konsensussequenz entsprechende Reste (N, G, IP) fett gekennzeichnet.

(B) Vergleich der paarigen Cysteine verschiedener LRR-RLKs nach Torii 2004. Dargestellt sind die Sequenzen zwischen dem ersten bzw. zweiten Cysteinpaar (C), welche die LRR-Domäne (--LRR--) umschließen. Dabei beschreibt „-“ variable Aminosäuren.

Um eine genauere Vorstellung über die Wirkungsweise der DRK6 zu bekommen, ist es nötig die molekularen Eigenschaften der DRK6 genauer zu betrachten. Die Zahl der leuzinreichen Wiederholungen der DRK6 ist mit 22 vergleichbar hoch wie bei anderen bekannte Mitglieder der LRR XI Unterfamilie wie CLV1 (21 LRRs) und auch HAESA (21 LRRs). Wie bei diesen beiden RLKs wird auch die LRR-Domäne der DRK6 von zwei Cysteinpaaren umschlossen. Vergleicht man die Bereiche zwischen den paarigen Cysteinen der DRK6-LRR-Domäne mit denen anderer LRR-RLKs derselben Unterfamilie (CLV1, HAESA), stellt man deutliche Unterschiede in den eingeschlossenen Sequenzen fest. Ein Vergleich mit der LRR-Domäne von Xa21 aus Reis (*oryza sativa*) zeigt jedoch erstaunliche Ähnlichkeiten. Während die Sequenz zwischen dem ersten Cysteinpaar in allen genannten Fällen derselben Konsensussequenz entspricht, besitzen DRK6 und Xa21 zwischen dem zweiten Cysteinpaar 10 AS statt wie CLV1 und HAESA nur 6 AS. Xa21 ist eine der wenigen bekannten LRR-RLKs, die an der R-Gen-vermittelten Resistenz beteiligt ist (Song *et al.* 1995). Es verfügt über 23 LRR-Kopien und eine Kinasedomäne (Song *et al.* 1995; Liu *et al.* 2002). Die strukturelle Ähnlichkeit zur DRK6 könnte demnach ein weiteres Indiz für eine Beteiligung der DRK6 an der R-Gen-vermittelten Resistenz sein.

### 3.3.10 Kinasefunktion der DRK6

Nach Datenbankangaben verfügt die DRK6 über über alle konservierten Aminosäuren, die für die ATP-Bindung bzw. Kinaseaktivität essentiell sind. (<http://plantsp.genomics.purdue.edu>). Nach Aussage der KinG-Datenbank (Krupa *et al.* 2004) gehört die DRK6 zu den RD-Kinasen (Dardick und Ronald 2006). Sie verfügt sowohl über den konservierten Glyzin-*loop* (AS 692-697) als auch die katalytische Asparaginsäure (AS 819, Abbildung 3.3.16 bzw. Abbildung 3.3.20)

```

                                GxGxxG V
DRK6      RVDFAES-----DIVSNLMEHYVI GSGGSGKV
HAESA     KLHFSEH-----EIADCLDEKNVIGFGSSGKV
CLV1      KLDLFKSE-----DVLECLKEENIIGKGGAGIV
BRI1      SGRDTANNTNWKLTGVKEALSINLAAFEKPLRKLTFADLLQATNGFHNSDLIGSGGFGDV
          .                               : . : . : * * * *
          I           II           III
DRK6      YKIFVSSGQCVAVKRIWDSKK-----LDQKLEKEFIAEVEILGTIRHSNIVKLLCCI
HAESA     YKVELRG-GEVVAVKLNKSVKGGDDEYSSDSLNRDVFAAEVETLGTIRHKSIVRLWCCC
CLV1      YRGSMPN-NVDVAIKRLVGRGTG-----RSDHGFTAETIQTGLRIRHRHIVRLLYGV
BRI1      YKAILKD-GSAVAIKKLIHVSGQ-----GDREFMAEMETIGKIKHRNLVPLLYGC
          * : . * * : . * * * : * * * : * *
          IV           V           VIa
DRK6      SREDSKLLVYEYLEKRSLDQWLHGKKKGGTVEANNLTWSQRLNIAVGAAQGLCYMHHDCT
HAESA     SSGDCKLLVYEYMPNGSLADVLHGDRKGGVVLG----WPERLRRIALDAAEGLSYLHHDVC
CLV1      ANKDTNLLLYEYMPNGSLGELLHGSKGG-----HLQWETRHRVAVEAAKGLCYLHHDSC
BRI1      KVGDERLLVYEFMKYGSLEDVLDHPKAGVKLN----WSTRRKIAIGSARGLAFLHHCNS
          * . * * * : * * : * * . : . * * * . : * * * : * * *
          VIb           VII           VIII
DRK6      DVKxxN           DFG           GSxxYxAPE
HAESA     PAIIHRDVKSSNILLDSEFNAKIADFLAKLLIKQ-NQEPHTMSAVAGSFGYIAPEYAYT
CLV1      PPIVHRDVKSSNILLDSYGAKVADFGIAKVGQMSGSKTPEAMSGIAGSCGYIAPEYVYT
BRI1      PLILHRDVKSSNILLDSDFEAHVADFLAKFLVDG--AASECMSSIAGSYGYIAPEYAYT
          PHIIHRDMKSSNVLLDENLEARVSDFGMARLMSAM--DTHLSVSTLAGTPGYVPPEYYQS
          * * : * * * : * * . : * * * : * * * : * * * : * * * :
          IX           X
DRK6      SKVDEKIDVYSFGVVLLELVTGREGNGD-----EHTNLADWSWKHYQSGKPTAEAFDE
HAESA     LRVNEKSDIYSGFVVLLELVTGKQPTDS-----ELGDKDMAKVVCTALDKGLEPVID
CLV1      LKVDEKSDVYSFGVVLLELIAGKKPVGEFGEVDIVRWRNTEEEITQPSDAAIVVAIVD
BRI1      FRCSTKGDVYSYGVVLELLTGRKPTDSP---DFGDNNLVGWVKQHAKLRI SDVFDPEL
          : . * * * : * * * * * : * * .
          XI
DRK6      DIKEASTTEAMTTVFKLGLMCTNTLPSHRPSMKEVLYVLRQQGLEATKKTATEAYEAPLL
HAESA     PKLDLKFKEEISKVIHIGLLCTSPLPLNRPMSMRKVVIMLQEVSGAVPCSSPNTSKRSKTG
CLV1      PRLTGYP LTVIHVFKIAMMVEEEAARPTMREV VVHMLTNP P KSVANLIAF-----
BRI1      MKEDPALEIELLQHLKVAVACLDDRAWRRPTMVQVMAMFKEIQAGSGIDSQSTIRSIEDG
          : : : : : * . . * * * * : * : : :
          VLSGRRTSKRVEDEDLGFV
DRK6      VLSGRRTSKRVEDEDLGFV
HAESA     GKLSPYT-----EDLNSV
CLV1      -----
BRI1      GFSTIEMVMSIKEVPEGKL

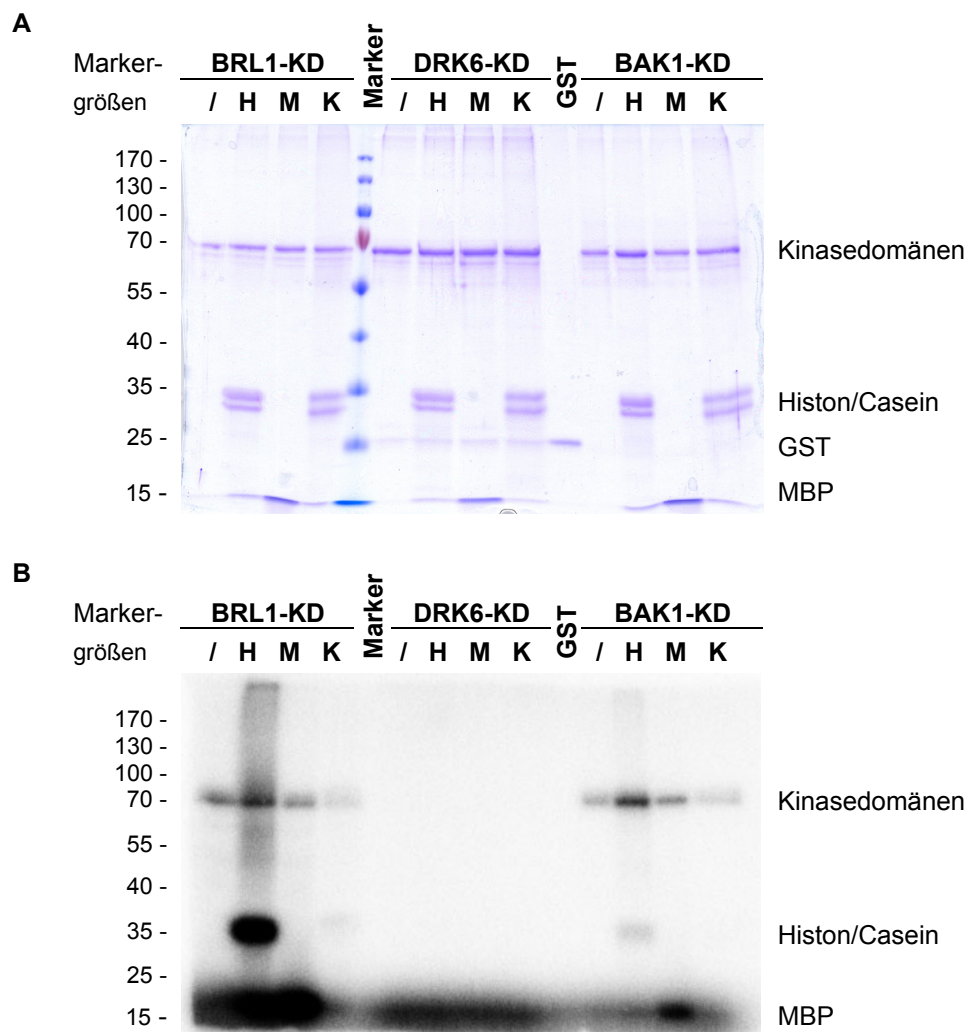
```

Abbildung 3.3.20: Sequenzvergleich der DRK6-Kinasedomäne mit der verwandter Proteine

Mit Hilfe des Programms ClustalW (<http://align.genome.jp>) wurden die Sequenzen der LRR-RLKs DRK6, HAESA, CLV1 und BRI1 verglichen und die konservierte Reste grau unterlegt. Das RD-Motiv in Unterdomäne VIb wurde fett markiert.

### 3.3.11 *In vitro* Kinaseaktivität der DRK6-Kinasedomäne

Da es sich bei der DRK6 um eine funktionelle Kinase handeln sollte, lag es nahe die Kinaseaktivität *in vitro* zu überprüfen. Dazu wurde ein GST-DRK6-Kinasedomänen Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert (Kapitel 2.7.5). Es sollte festgestellt werden, ob die DRK6-Kinasedomäne in der Lage ist sich selbst bzw. die artifizialen Substrate Histon, *myelin basic protein* (MBP) und Kasein zu phosphorylieren (Abbildung 3.3.21).



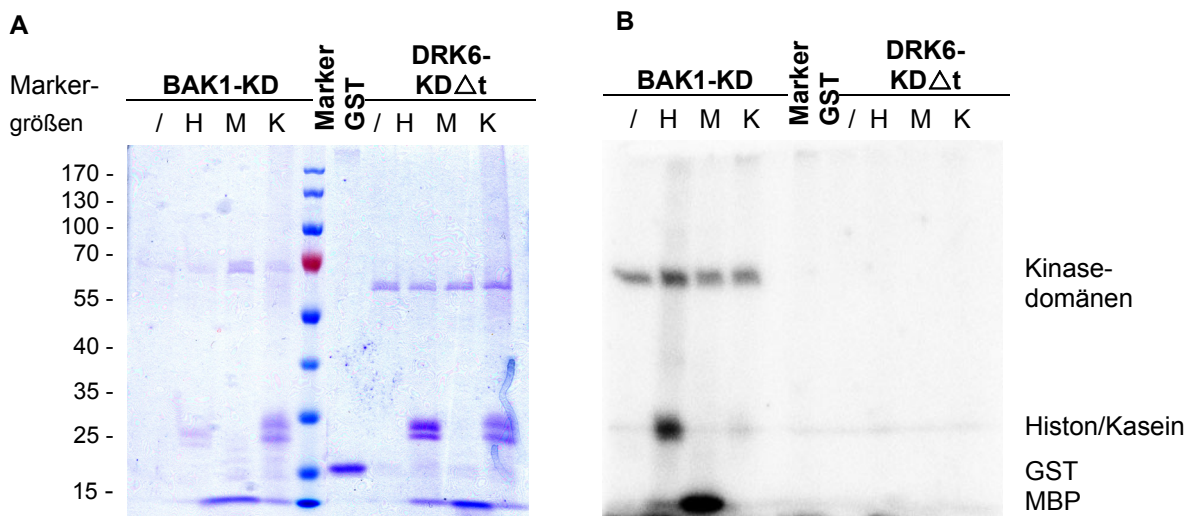
**Abbildung 3.3.21: *in vitro* Kinaseaktivitätstest der DRK6-Kinasedomäne**

(A) Coomassie-Färbung und (B) Autoradiogramm des Kinaseaktivitätstests. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgt entweder ohne (/) oder nach Zugabe der Substrate Histon (H, 21,5-11,3 kDa), MBP (M, 18,4 kDa) bzw. Kasein (K, 25-19 kDa). Die GST-DRK6-Kinasedomäne ist bei etwa 66 kDa zu erwarten. Als Positivkontrollen dienten die ebenfalls heterolog exprimierten GST-Kinasedomänen-Fusionen von BLR1 (BRL1-KD, 69,5 kDa) und BAK1 (BAK1-KD, 70,5 kDa). Für die Negativkontrolle wurde nichtfusioniertes GST (28,5 kDa) verwendet.



Zu diesem Zweck wurde der Kinaseklon mit den Primern attB1At5g25930-KD und attB2At5g25930-MS von genomischer DNA amplifiziert und mit Hilfe des Gateway-Systems in den Expressionsvektor pDEST15 kloniert (Kapitel 2.5.15). Alle verwendeten Proteine konnten heterolog exprimiert werden (Kapitel 3.2.10) und sind auch während des Kinaseaktivitätstests stabil (Abbildung 3.2.18, A). Während die Substrate Histon und Kasein als klar aufgetrennte Banden im Gel erscheinen, befindet sich das MBP auf Höhe der Lauffront. Die GST-Kinasedomänen Fusionsproteine zeigen ebenfalls die erwarteten Größen. GST dient als Negativkontrolle, um die unspezifische Bindung von radioaktivem Phosphat an das *tag* zu kontrollieren.

Für die beiden Kontrollprotein-Kinasedomänen BRL1-KD und BAK1-KD konnte sowohl eine Autophosphorylierung als auch die Phosphorylierung der Substrate Histon und MBP nachgewiesen werden (Abbildung 3.2.18, B). Die BRL1-KD ist außerdem, wenn auch schwach, in der Lage Kasein zu phosphorylieren. Obwohl für die DRK6 eine Kinaseaktivität vorausgesagt wurde, war es nicht möglich diese *in vitro* zu bestätigen. Die Negativkontrolle GST zeigt ebenfalls keine Phosphatanlagerung.



**Abbildung 3.3.22: *in vitro* Kinaseaktivitätstest der verkürzten DRK6-Kinasedomäne**

(A) Coomassie-Färbung und (B) Autoradiogramm des Kinaseaktivitätstests. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgt entweder ohne (/) oder nach Zugabe der Substrate Histon (H, 21,5-11,3 kDa), MBP (M, 18,4 kDa) bzw. Kasein (K, 25-19 kDa). Die verkürzte GST-DRK6-Kinasedomäne (DRK6-KD $\Delta$ t) ist bei etwa 63,5 kDa zu erwarten. Als Positivkontrollen diente die ebenfalls heterolog exprimierten Kinasedomäne von BAK1 (BAK1-KD, 70,5 kDa). Für die Negativkontrolle wurde nichtfusioniertes GST (28,5 kDa) verwendet.

Ein Grund für die fehlende *in vitro* Kinaseaktivität könnte sein, dass die DRK6 an ihrem Carboxyterminus eine 20 AS lange, so genannte *tail*-Sequenz besitzt. Solche Endbereiche können, wie für BRI1 gezeigt wurde (Wang *et al.* 2005b), eine regulierende Funktion der Proteinaktivität übernehmen. Eine Deletion des Carboxyterminus erhöht bei BRI1 die *in vitro* Kinaseaktivität. Auch für die DRK6 wurde parallel ein Aktivitätstest mit dem verkürzten Kinasedomänen-Fusionsprotein durchgeführt (DRK6-KD $\Delta$ t, Abbildung 3.3.22). Dazu wurde der Kinaseklon mit den Primern attB1At5g25930-KD und attB2At5g25930-ee von genomischer DNA amplifiziert und mit Hilfe des Gateway-Systems in den Expressionsvektor pDEST15 kloniert (Kapitel 2.5.15). Anschließend erfolgte die heterologe Expression des GST-Fusionsproteins. Die Überprüfung der Kinaseaktivität zeigte, dass auch nach Entfernen der *tail*-Sequenz *in vitro* keine Kinaseaktivität nachweisbar war. Vermutlich ist die DRK6-Kinasedomäne, anders als BRI1, unter den getesteten Bedingungen nicht funktionell und deshalb hat auch die Verkürzung des Carboxyterminus keinen Einfluss auf ihre Aktivität.

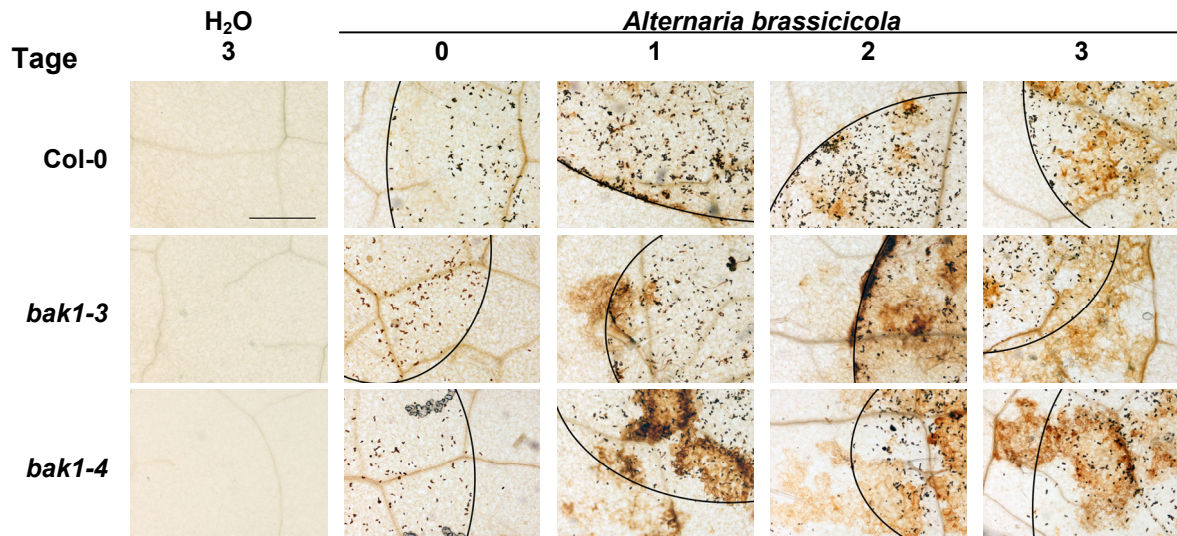
### 3.4 BAK1

Die Rezeptorkinase BAK1 (BRI1-assoziierte Rezeptorkinase) wurde ursprünglich als Interaktionspartner der LRR-RLK BRI1 (Brassinosteroid insensitiv 1) in der Brassinosteroid-perzeption identifiziert (Li *et al.* 2002; Nam und Li 2002). Neuere Arbeiten konnten jedoch zeigen, dass BAK1 darüber hinaus eine wichtige, brassinolidunabhängige Funktion bei der Regulation des pathogeninduzierten Zelltods spielt (Chinchilla *et al.* 2007; He *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007; Kemmerling *et al.* 2007). Ziel dieser Arbeit war es die dabei ablaufenden Vorgänge genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck standen zwei *BAK1*-defiziente Pflanzenlinien zur Verfügung. Dabei handelt es sich um die *T*-DNA Insertionslinien *bak1-3* und *bak1-4*. Die Insertionen sind im 4. Intron bzw. 9. Exon des Gens lokalisiert und weisen keinerlei Resttranskript auf (Kemmerling *et al.* 2007).

#### **3.4.1 Zeitverlauf der zellulären Reaktionen auf die *A. brassicicola*-Infektion**

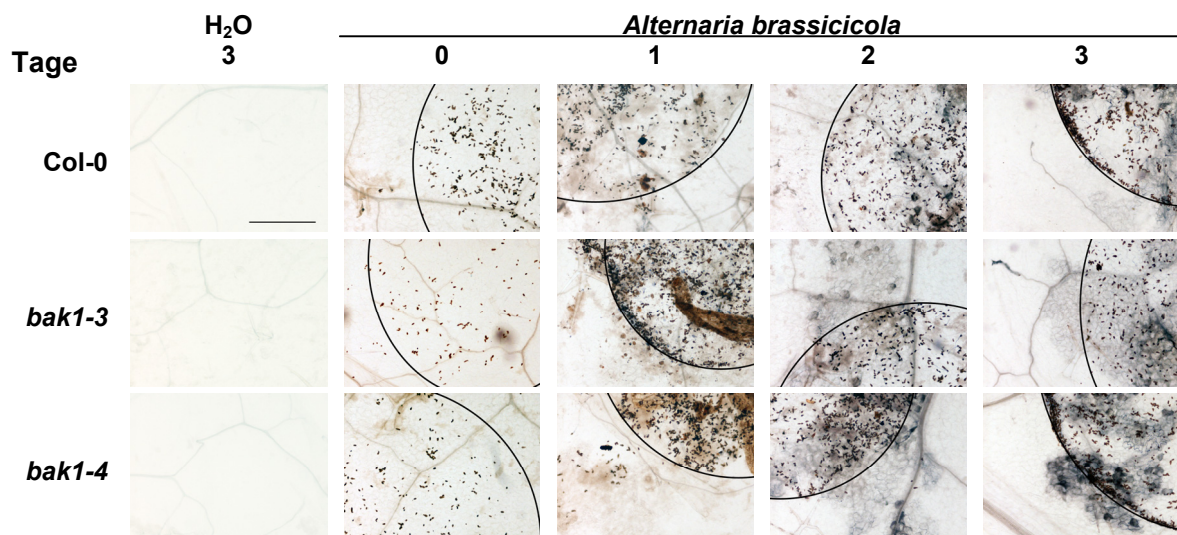
In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass *bak1*-Mutanten anfälliger gegenüber den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* sind (Kemmerling *et al.* 2007). Um dieses Phänomen zu erklären, war es nötig die pflanzlichen Reaktionen genauer zu charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden über mehrere Tage die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, Abbildung 3.4.1) und die Ausprägung von Zelltod (Abbildung 3.4.1) an der Infektionsstelle überprüft.

Bereits einen Tag nach der Infektion sind in den Col-0 Blättern sowohl ROS als auch Zelltod nachzuweisen. Zu späteren Zeitpunkten nehmen die Zahl betroffener Stellen und die Intensität der Färbung zu. Während der gesamten Dauer des Experimentes sind die davon betroffenen Bereiche im Wildtyp auf die Infektionsstelle beschränkt. Vergleicht man dazu die beiden *BAK1*-defizienten Linien, zeigt sich nach einem Tag einerseits eine intensivere Färbung als bei der zugehörigen Wildtypprobe, andererseits gehen ROS-Produktion und Zelltod weit über die Applikationsstelle hinaus. Besonders deutlich wird dies nach fortschreitender Infektion in den Tagen 2 und 3. Die Pflanzen sind nicht mehr in der Lage diese Reaktionen vollständig zu kontrollieren, wodurch es zu einer Überreaktion des die Infektionsstelle umgebenden Gewebes kommt. Es muss festgehalten werden, dass diese Beobachtung ausschließlich in Pathogen behandelten Blättern gemacht wurde, es sich daher nicht um spontane Zelltodreaktionen handelt.



**Abbildung 3.4.1: ROS-Akkumulation nach *A. brassicicola*-Infektion**

Auf die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen der Linien Col-0, *bak1-3* und *bak1-4* wurden mit *A. brassicicola* Sporensuspension infiziert (Kapitel 2.3.4.1). Nach 0, 1, 2 und 3 Tagen wurden Proben entnommen und mit DAB auf die Produktion von ROS getestet (Kapitel 2.3.5). Als Kontrolle wurden parallel dazu Blätter mit Wasser betropft, wobei die hier abgebildeten Proben 3 Tage nach der Inokulation geerntet wurden. Die Infektionsstelle der *A. brassicicola*-behandelten Blätter wird durch eine eingezeichnete Linie markiert. Als Größenskala dient der Balken im ersten Bild, welcher eine Länge von 1 mm repräsentiert.

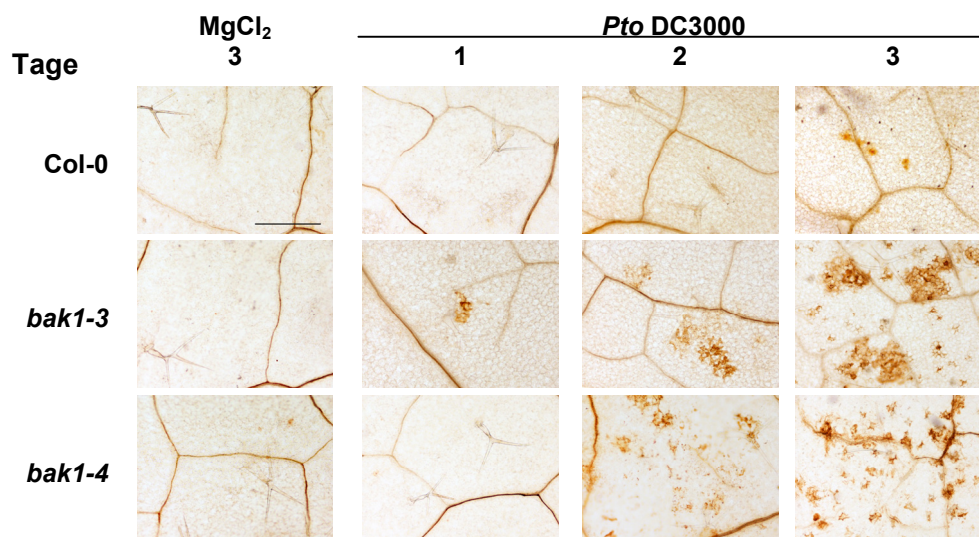


**Abbildung 3.4.2: Ausprägung *A. brassicicola*-induzierten Zelltods**

Die wie in Abbildung 3.4.1 beschriebenen behandelten Proben wurden mit Hilfe des Farbstoffes Trypanblau auf die Entstehung von Zelltodereignissen untersucht (Kapitel 2.3.6). Auch hier sind die Infektionsbereiche durch schwarze Linien markiert und ein Größenstandard von 1 mm in der ersten Abbildung dargestellt.

### 3.4.2 Zeitverlauf der zellulären Reaktionen auf die *Pto* DC3000 Infektion

Während in Col-0 Pflanzen vier Tage nach der Infektion mit *Pto* DC3000 nur geringe Krankheitssymptome auftreten, zeigen die *BAK1*-defizienten Linien starke Chlorosen (Kemmerling *et al.* 2007). Das folgende Experiment sollte Aufschluss darüber geben, wann und in welcher Menge reaktive Sauerstoffspezies (ROS) nachweisbar sind. Des Weiteren wurde die Ausprägung von Zelltod nach Pathogenapplikation zwischen den *BAK1*-defizienten Linien und Col-0 verglichen.



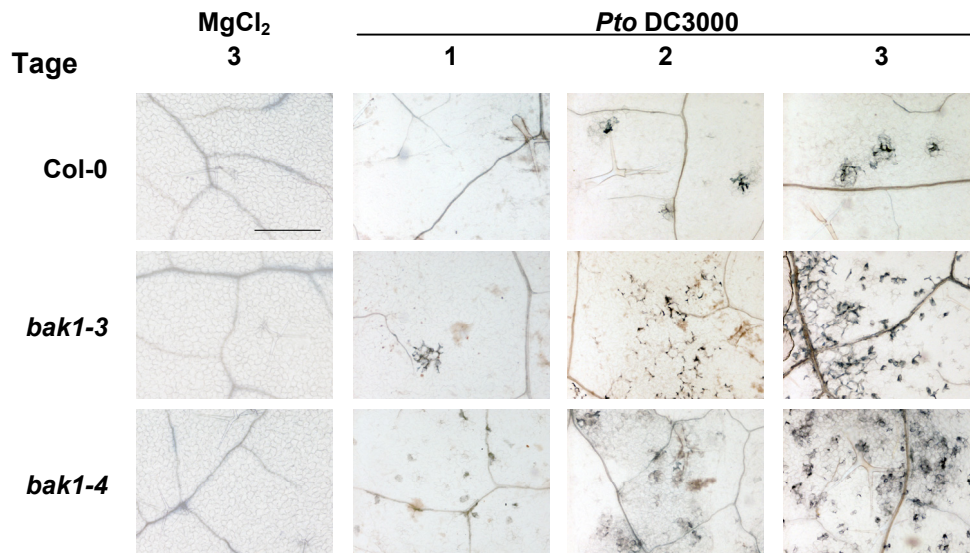
**Abbildung 3.4.3: ROS-Bildung nach *Pto* DC3000-Infektion**

5 Wochen alte Pflanzen wurden mit  $10^8$  cfu/ml einer *Pto* DC3000 Suspension, die 0,02 % Silwet enthielt, besprüht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden repräsentative Blätter geerntet und mit Hilfe des Farbstoffes DAB die Bereiche der ROS-Produktion angefärbt (Kapitel 2.3.5). Als Kontrolle wurden parallel angezogenen Pflanzen mit 0,02 % Silwet enthaltendem 10 mM  $MgCl_2$  besprüht. Die hier abgebildeten Proben wurden 3 Tage nach der Inokulation geerntet. Der in der ersten Abbildung eingezeichnete Balken repräsentiert 1 mm.

In Abbildung 3.4.3 kann man erkennen, dass in den Wildtyp Col-0-Pflanzen 2 bis 3 Tage nach der Infektion mit dem Pathogen *Pto* DC3000 die Akkumulation von ROS erstmals nachweisbar ist. Dabei sind nur vereinzelte, kleine angefärbte Bereiche zu erkennen. Vergleicht man diese Beobachtung mit der ROS-Färbung in den *bak1*-Pflanzen, so ist festzustellen, dass bereits 1 bis 2 Tage nach der Infektion erste Spuren reaktiver Sauerstoffspezies nachzuweisen sind. Im weiteren Verlauf der Infektion nimmt die Zahl und Farbintensität dieser Stellen zu bzw. breiten sich diese über größere Flächen aus. Die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies erfolgt demnach in *bak1*-Pflanzen früher und



breitet sich im Folgenden weiter aus als im vergleichbaren Wildtyp. In unbehandelten Blättern ist in keiner der Linien eine spontane ROS-Produktion zu beobachten.



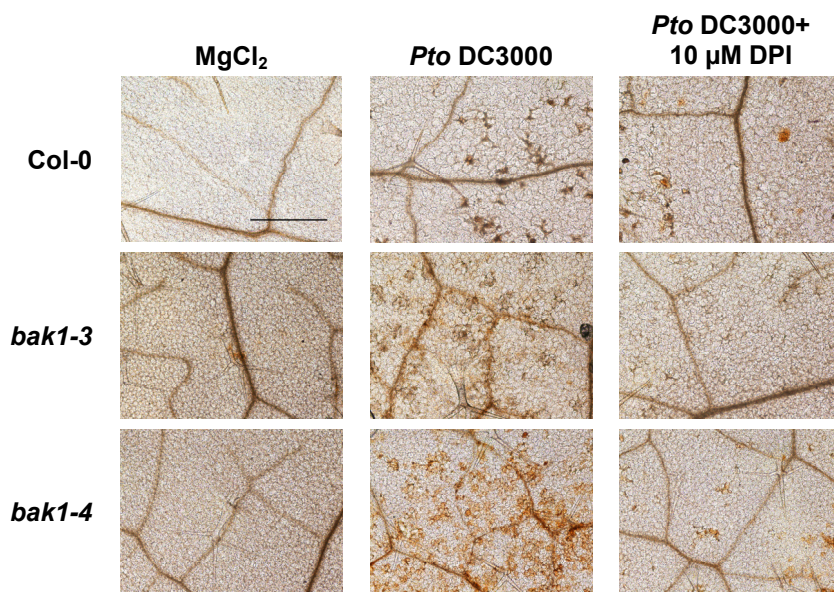
**Abbildung 3.4.4: Zelltodausbildung nach *Pto* DC3000-Infektion**

Die wie in Abbildung 3.4.3 beschriebenen behandelten Blätter wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und mit Hilfe der Trypanblau-Färbung ein Nachweis toten Gewebes durchgeführt (Kapitel 2.3.6). In der ersten Abbildung ist der Größenmaßstab von 1 mm eingezeichnet.

Die Anfärbung toten Pflanzengewebes mit Trypanblau ergibt ein ähnliches Ergebnis (Abbildung 3.4.4). Erste Zelltodereignisse sind im Wildtyp Col-0 frühestens 2 Tage nach der *Pto* DC3000 Inokulation nachweisbar. Auch hier handelt es sich wie bei der ROS-Entwicklung (Abbildung 3.4.3) um kleine, vereinzelte Stellen, an denen diese auftreten. Im Vergleich dazu sind in den beiden verwendeten *BAK1*-defizienten Linien bereits einen Tag nach der Infektion kleine Bereiche toten Gewebes nachzuweisen. Diese nehmen in Zahl und Größe in den darauffolgenden zwei Tagen stark zu. Damit korreliert das Auftreten von Zelltod mit der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies. In den zur Kontrolle mit 0,02 % Silwet in 10 mM MgCl<sub>2</sub> besprühten Pflanzen ist kein Zelltod nachzuweisen.

### 3.4.3 DPI Einfluss auf die Ausprägung pflanzlicher Abwehrreaktionen

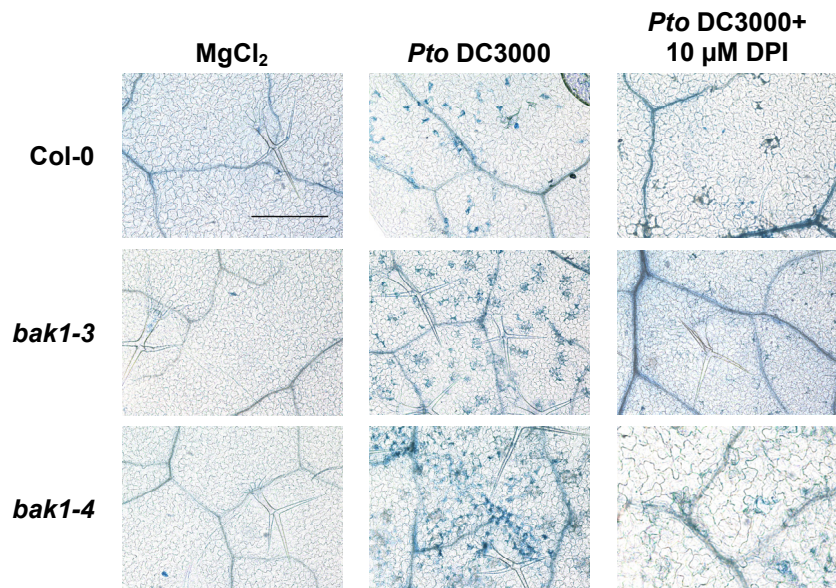
Die pathogeninduzierte Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) wird zu einem großen Teil durch die plasmamembranständige NADPH-Oxidase vermittelt (Kapitel 1.3). DPI (Diphenylen Iodonium) ist ein Inhibitor der Säugetier NADPH-Oxidase (O'Donnell et al. 1993), welcher auch pflanzliche NADPH-Oxidasen hemmt (Levine *et al.* 1994). Eine Applikation von 10  $\mu\text{M}$  DPI sollte daher zur verminderten Bildung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  führen und den dadurch vermittelten Zelltod reduzieren.



**Abbildung 3.4.5: DPI-abhängige ROS-Produktion nach *Pto* DC3000-Infektion**

Die Blätter 6 Wochen alter Pflanzen wurden mit 10  $\mu\text{M}$  DPI infiltriert und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden  $10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000 Suspension bzw. 10 mM  $\text{MgCl}_2$  mit 0,02 % Silwet mit Hilfe eines Pumpsprühers auf die Blattoberflächen appliziert. Die Ernte der Blätter und die Anfärbung der reaktiven Sauerstoffspezies mittels DAB (Kapitel 2.3.5) erfolgte 3 Tage nach der Infektion. In der ersten Abbildung ist der Größenmaßstab von 1 mm eingezeichnet.

Die Anfärbung der ROS-Bildung (Abbildung 3.4.5) in nichtinfizierten und infizierten Blättern zeigt, dass, wie bereits in Kapitel 3.4.2 beschrieben, 3 Tage nach der Infektion die Zahl und Ausbreitung betroffener Areale in den beiden *bak1*-Linien größer ist als im vergleichbaren Wildtyp Col-0. Nach Applikation von DPI sind in allen Pflanzen nur noch wenige angefärbte Bereiche erkennbar.

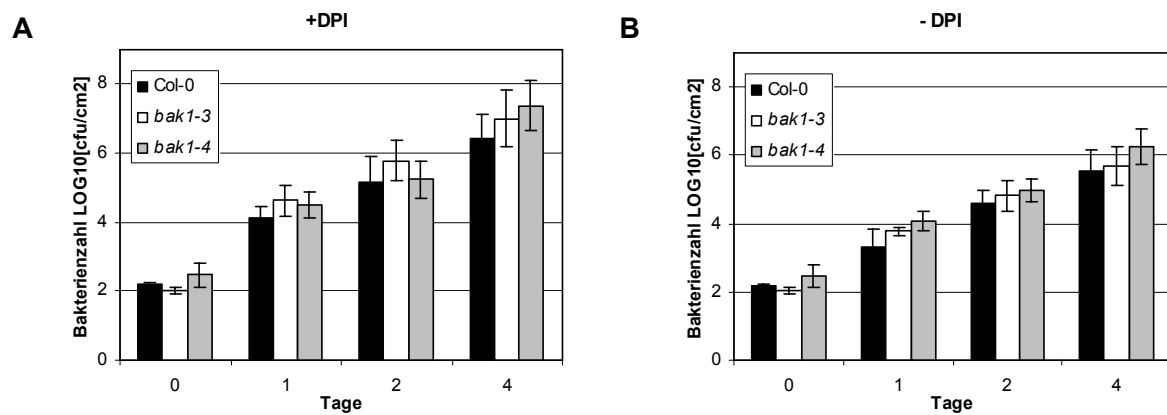


**Abbildung 3.4.6: DPI-Abhängigkeit des *Pto* DC3000-induzierten Zelltods**

Die Blätter 6 Wochen alter Pflanzen wurden mit 10  $\mu$ M DPI infiltriert und für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurden  $10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000 Suspension bzw. 10 mM  $MgCl_2$  mit 0,02 % Silwet mit Hilfe eines Pumpsprühers auf die Blattoberflächen appliziert. Nach zwei Tagen wurden die Blätter geerntet und eine Anfärbung des toten Gewebes mit Trypanblau (Kapitel 2.3.6) durchgeführt. In der ersten Abbildung ist der Größenmaßstab von 1 mm eingezeichnet.

Ein Vergleich der DAB-Färbung mit der parallel durchgeführten Färbung auf Zelltod (Abbildung 3.4.6) zeigt, dass dieser mit der beobachtbaren Akkumulation von ROS einhergeht. In infizierten *bak1*-Mutanten sind die Zelltodraten nach 3 Tagen höher, als in Col-0 Pflanzen. Die vorangestellte Inokulation von DPI reduziert die Zahl und Ausbreitung von Zelltodereignissen nach Pathogenapplikation.





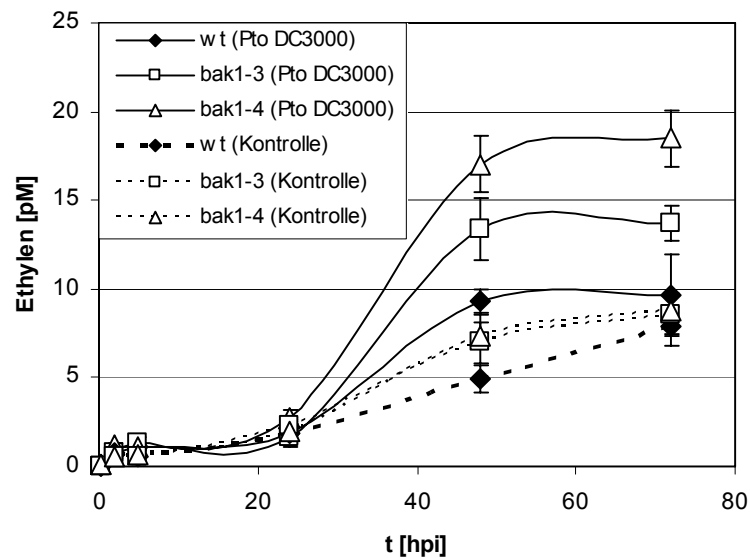
**Abbildung 3.4.7: *Pto* DC3000 Wachstum nach DPI-Applikation**

(A) Die Blätter 6 Wochen alter Pflanzen wurden mit  $10 \mu\text{M}$  DPI infiltriert und für 1 Stunde inkubiert. (A, B) Anschließend wurden  $10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000 Suspension bzw.  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  mit  $0,02 \%$  Silwet mit Hilfe eines Pumpsprühers auf die Blattoberflächen appliziert und über 4 Tage das bakterielle Wachstum wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben bestimmt.

Um den Einfluss der DPI-Infiltration auf die Virulenz des Bakteriums *Pto* DC3000 zu ermitteln, wurde parallel das bakterielle Wachstum in Col-0 und *bak1*-Pflanzen bestimmt (Abbildung 3.4.7). Sowohl mit als auch ohne die vorangegangene Applikation des NADPH-Oxidasehemmers zeigt sich kein signifikanter Wachstumsunterschied zwischen den verschiedenen Pflanzenlinien. Es fällt jedoch auf, dass das Bakterienwachstum nach DPI-Gabe leicht erhöht ist im Vergleich zu den Kontrollpflanzen. Der beobachtete Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

### **3.4.4 Ethylenbiosynthese nach Pathogeninfektion**

Ein wichtiger Faktor der pflanzlichen Basisantwort auf Pathogenbefall ist die Produktion von Ethylen (Kapitel 1.3). Da die Ausprägung von Krankheitssymptomen durch dieses Phytohormon vermittelt wird (O'Donnell *et al.* 2003b), sollte überprüft werden, ob in *Pto* DC3000-infizierten *bak1*-Mutanten veränderte Ethylenmengen gemessen werden können.



**Abbildung 3.4.8: Ethylenbiosynthese nach *Pto* DC3000-Infektion**

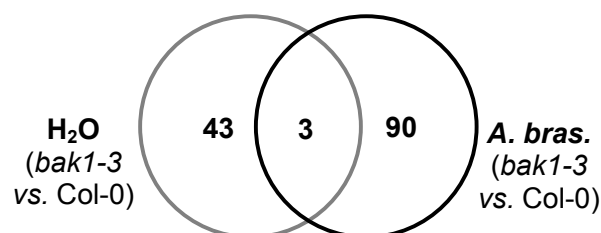
Die Blätter 5 Wochen alter Pflanzen der Linien Col-0, *bak1-3* und *bak1-4* wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> bzw. 10<sup>8</sup> cfu/ml Bakteriensuspension infiltriert und wie in Kapitel 2.3.7 angegeben die Ethylenkonzentration zu den jeweiligen Zeitpunkten bestimmt.

In allen unbehandelten Proben kommt es zu einem leichten Anstieg der Ethylenkonzentration nach den ersten 24 h. Dabei ist kein signifikanter Unterschied zwischen Col-0 und den *BAK1*-defizienten Linien festzustellen. Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf Alterungsprozesse bzw. das durch Nährstoffmangel begründete Absterben der Blätter zurück zu führen. Im Vergleich dazu steigt die Ethylenmenge in den *Pto* DC3000 behandelten Wildtyppflanzen innerhalb von 48 h etwas stärker an, erreicht nach 72 h jedoch die gleiche Konzentration wie in den unbehandelten Proben. In den infizierten *bak1-3* bzw. *-4* Proben zeigen sich nach 24 h deutlich höhere Ethylenkonzentrationen als in den Wildtypproben. Diese erreichen nach etwa 50 h jeweils ihr Maximum, welches höher liegt, als das von infiziertem Wildtyp Col-0 bzw. der unbehandelten Parallelen. Die erhöhte Ethylenkonzentration in den beiden *bak1*-Mutanten korreliert direkt mit der zu beobachtenden Ausbildung von Chlorosen und Zelltod (siehe Kapitel 3.4.2).

### 3.4.5 Vergleich von *bak1-3* und Col-0 durch Analyse von *Microarray*-Daten

Um eine Vorstellung zu bekommen, welche Veränderung der Genexpression in *BAK1*-defizienten Pflanzen vorliegt, bzw. wie diese mit bekannten Effekten zu verknüpfen sind, wurden *Microarray*-Daten erstellt (Kapitel 2.6.4). Die Analyse der Ergebnisse ergab, dass bereits in unbehandelten *bak1-3* Pflanzen 46 Gene signifikant unterschiedlich reguliert werden als im vergleichbaren Wildtyp ( $H_2O$  *bak1-3* vs. Col-0, Kemmerling *et al.* 2007, Anhang Tabelle 7.5.1). Unter diesen befinden sich viele Gene, deren Expressionsmuster mit mikrobiellen Infektionen und Seneszenz assoziiert sind (Kemmerling *et al.* 2007). Ein Beispiel dafür ist die DUF26-Domäne tragende Rezeptorkinase RLK5 (synonym CRK6). Einige andere Proteine sind wiederum durch ihre Funktion in Pathogenabwehr oder Signaltransduktion bekannt. Prominente Beispiele sind hier PR5 (Thaumatin-ähnliches Protein; Uknes *et al.* 1992) und das Peptidtransportprotein PTR3 (Karim *et al.* 2005; Karim *et al.* 2007). Auffällig ist ebenfalls die verstärkte Expression von putativen Cytochrom P450 Proteinen.

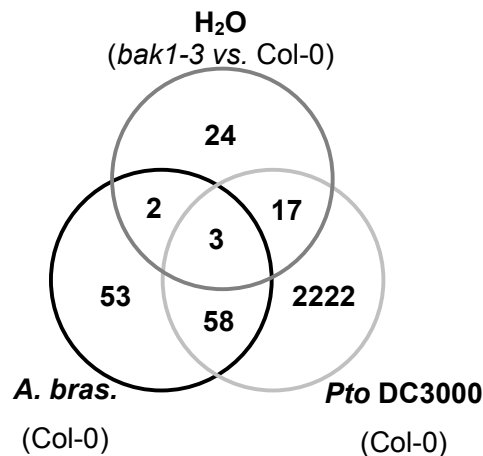
Eine Vergleich der Expressionsmuster von *bak1-3* und Col-0 nach Applikation von *A. brassicicola* ergab einen Unterschied von 93 Genen (*A. bras. bak1-3* vs. Col-0; Anhang Tabelle 7.5.1). Unter ihnen befinden sich pathogen- und seneszenzinduzierte Gene (Kemmerling *et al.* 2007, S2) aber auch Proteine, die an der Lichtreaktion der Photosynthese beteiligt sind, wie ATP-Synthase Untereinheiten (ATPI, ATPH) oder Bestandteile des Photosystem I (PSAA, PSAC). Des Weiteren wird eine Peroxidase (EC 1.11.1.7) verstärkt exprimiert. Des Weiteren wird ein Vertreter der LTP Familie (Lipid Transfer Protein, AT1G62510) in *bak1-3* verstärkt exprimiert.



**Abbildung 3.4.9: Vergleich der in *bak1-3* verschieden zum Wildtyp exprimierten Gene in unbehandelten bzw. *A. brassicicola* behandelten Pflanzen**

Vergleich der Zahl induzierter bzw. reprimierter Gene in *bak1-3* im Vergleich zu Col-0 nach Kontrollbehandlung ( $H_2O$ ) und *A. brassicicola* Infektion (*A. bras.*)

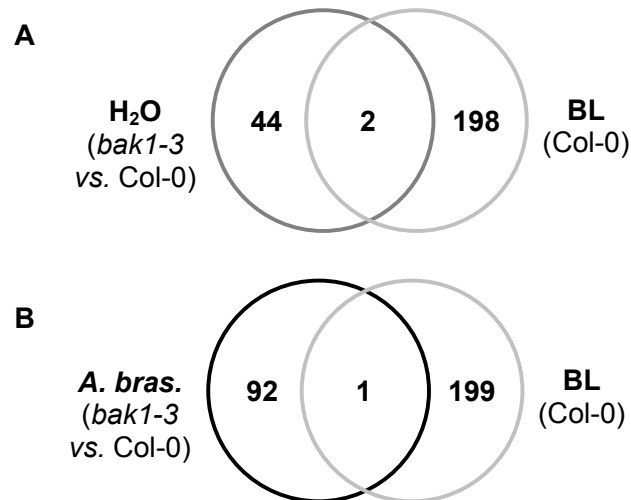
Überlagert man die beiden oben beschriebenen Gengruppen (Abbildung 3.4.9) zeigt sich, dass drei Gene sowohl nach Wasser als auch *A. brassicicola* Behandlung in *bak1-3*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp dereguliert sind (Anhang Tabelle 7.5.1). Dies sind die bereits erwähnte annotierte Peroxidase, ein Jacalin-Lektin ähnliche Protein und BAK1. BAK1 erscheint in der Auflistung, da es in jedem Fall im Wildtyp stärker exprimiert ist als in den *bak1-3*-Pflanzen.



**Abbildung 3.4.10: Vergleich der Gene, welche in unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen dereguliert sind mit Wildtyp-Pathogenexpressionsprofilen**

Die Expressionsprofile infizierter Col-0 Pflanzen nach Infektion mit *Pto D3000* (2, 6, und 24 hpi, <http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) bzw. *Alternaria brassicicola* (24 hpi, De Vos *et al.* 2005) wurden mit den in unbehandelten *bak1-3* differentiell exprimierten Genen (H<sub>2</sub>O) in einem Venn-Diagramm verglichen.

Im Folgenden wurden die Gene, die in kontrollbehandelten *bak1-3*-Pflanzen unterschiedlich exprimiert sind als in vergleichbaren Wildtypen (H<sub>2</sub>O *bak1-3* vs. Col-0) mit den in Wildtyp durch Pathogenbehandlung induzierten bzw. reprimierten Genen verglichen (*A. bras.* Col-0 bzw. *Pto DC3000* Col-0, Abbildung 3.4.10). Etwa die Hälfte der bereits in der *bak1-3*-Kontrolle induzierten/reprimierten Gene ist in Col-0 durch Pathogenapplikation reguliert (Anhang Tabelle 7.5.1). Zu ihnen gehören Proteine wie RLK5 (CRK6, At4g23140, siehe oben), ein pathogen induzierbares LTP (At4g12470, Chassot *et al.* 2007) oder auch ein Cf-like Protein, welches zur Gruppe der *disease resistance like* Proteine zählt.



**Abbildung 3.4.11: Vergleich der Genexpression in *bak1-3* mit brassinolidregulierten Genen in Col-0**

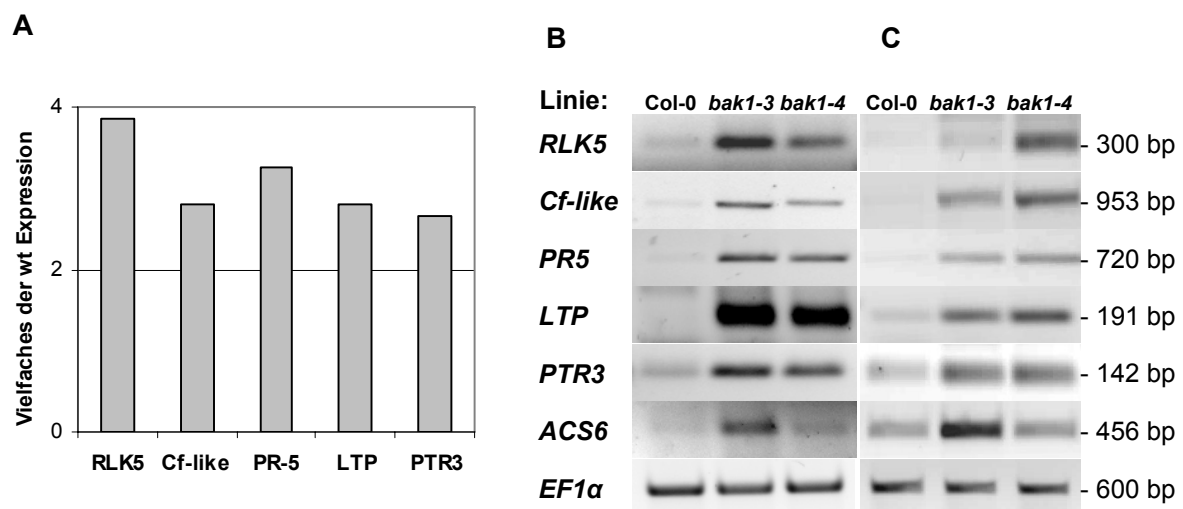
**(A)** Als (H<sub>2</sub>O) sind die in *bak1-3* im Vergleich zum Wildtyp deregulierten Gene dargestellt. **(B)** Im Gegensatz dazu stehen die nach *A. brassicicola* spezifisch in *bak1-3* regulierten Gene (*A. bras.*). Zum Vergleich wurde das Transkriptionsprofil Brassinolid behandelter Col-0 Pflanzen (0,5, 1 und 3 h nach Applikation, <http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) herangezogen (BL).

Da BAK1 eine wichtige Rolle in der Perzeption dieses Phytohormons zukommt (siehe Kapitel 1.5) und ein *BAK1*-Gendefekt Zwergwachstum hervorruft, war es wahrscheinlich, dass in den *bak1-3*-Pflanzen eine veränderte Expression Brassinolid (BL)-regulierte Gene vorliegt. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, welche der bereits in *bak1-3* konstitutiv deregulierten Gene in Wildtyp BL-reguliert sind. Vergleicht man jedoch die Expressionsdaten kontrollbehandelter *bak1-3* mit BL-behandelten Col-0, so zeigt sich nur eine geringe Überlagerung (Abbildung 3.4.11, A; Anhang Tabelle 7.5.1). Nur DIN11 (Fujiki *et al.* 2001) und ein Protein unbekannter Funktion mit einem Helix-Loop-Helix (HLH) Motiv werden sowohl durch den *BAK1-knockout*, als auch durch Brassinolid reguliert. Ein ähnliches Bild zeichnet sich ab, wenn man die in *bak1-3* deregulierten Gene nach *A. brassicicola* Infektion mit den brassinolidinduzierbaren Genen in Col-0 vergleicht (Abbildung 3.4.11, B). Nur ein Gen, der Glukosetransporter STPI (AT1G11260), erscheint als Schnittmenge der Überlagerung dieser beiden Expressionsprofile.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *BAK1*-Gendefekt der Linie *bak1-3* einen Einfluss auf die Expression vieler pathogeninduzierbarer Gene hat, wobei einige von diesen wahrscheinlich eine Rolle bei der Regulation von Seneszenz oder oxidativem Stress spielen. Eine Überlagerung des *bak1-3*-Expressionsmusters mit Brassinolid regulierten Genen ist so gut wie nicht gegeben.

### 3.4.6 Verifizierung der *Microarray*-Daten durch RT-PCR

Zur Verifizierung der *Microarray*-Daten wurden einige der Gene ausgewählt, welche eine signifikant erhöhte Expression in unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen zeigten. Die in Kapitel 3.4.5 beschriebenen Proteine RLK5 (At4g23140), das *Cf-like* Protein (At2g32680), PR-5 (At1g75040), das Lipid Transfer Protein (LTP, At4g12470) und ein Peptidtransporter (PTR3, At5g46050) dienten dabei als Kandidatengene. Als zusätzliche Kontrolle wurde die an Seneszenzprozessen beteiligte ACC-Synthase ACS6 ausgewählt (Miller *et al.* 1999).



**Abbildung 3.4.12: Expression ausgewählter Markergene in unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen**

(A) Vielfaches der Expression der angegebenen Gene in *bak1-3* im Vergleich zum Wildtyp (B) Unbehandelte Blätter auf Erde gewachsener Pflanzen und (C) auf  $\frac{1}{2}$  MS angezogene Keimlinge wurden geerntet, die RNA extrahiert und über reverse Transkription cDNA erzeugt. Anschließend wurden die Transkriptmengen der angegebenen Gene mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Amplifiziert wurden Fragmente der angegebenen Größen.

Da die für die *Microarrays* verwendeten Pflanzen auf Erde angezogen wurden, konnte nicht garantiert werden, dass die Proben frei vom Einfluss eventuell kontaminierender Organismen waren, welche einen Einfluss auf das Expressionsmuster der *bak1*-Mutanten hat. Um diesen Verdacht zu entkräften, wurden parallel Col-0 und *bak1*-Keimlinge auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar steril angezogen und für die ausgewählten Markergene wiederum die Transkriptmenge überprüft (Abbildung 3.4.12, B, zweite Spalte). Ein Vergleich der durchgeführten RT-PCR mit den Arraydaten, bestätigt die zuvor erhaltenen Ergebnisse. Alle angeführten Gene sind nur schwach oder gar nicht in kontrollbehandelten Col-0 exprimiert, werden in *bak1-3*-Pflanzen jedoch unter den gleichen Bedingungen induziert. Bei der Überprüfung dieser Daten mit Material aus steril angezogenen Keimlingen erhält man dasselbe Ergebnis. Die anhand der Beispielgene beobachteten Effekte sind demnach unabhängig von den Anzuchtbedingungen.

## 4 DISKUSSION

Wie alle lebenden Organismen sind auch Pflanzen in der Lage, Veränderungen ihrer Umwelt wahrzunehmen und gegebenenfalls entsprechende Reaktionen auszulösen. Dazu gehört neben der Erkennung einer Vielzahl abiotischer Faktoren auch die Perzeption der Anwesenheit potentieller Krankheitserreger über Mechanismen der angeborenen Immunität und die Aktivierung geeigneter Abwehrmaßnahmen. Eine wichtige Rolle spielen dabei die leuzinreichen Rezeptorkinasen (LRR-RLKs). In ihrem modularen Aufbau zeigen diese große Ähnlichkeit zu den in tierischen Systemen verwendeten PR (*pattern recognition*)-Rezeptoren. Während in *Drosophila* und Mensch jedoch nur wenige verschiedene LRR-Rezeptoren bekannt sind, existieren beispielsweise in *Arabidopsis* über 230 LRR-RLKs (Shiu und Bleecker 2001a). Nur für wenige von ihnen konnte bisher eine biologische Funktion ermittelt werden. Einige sind an der pflanzlichen Entwicklung (CLV1; Clark *et al.* 1997) und der Hormonantwort (BRI1; Li und Chory 1997) beteiligt. Andere spielen scheinbar eine Rolle in der Etablierung von Symbiosen (SYMRK; Stracke *et al.* 2002) und der PAMP-Perzeption (FLS2, EFR; Gomez-Gomez und Boller 2000; Zipfel *et al.* 2006). Im Rahmen der AFGN (*Arabidopsis Functional Genomics Network*)-Initiative der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) ist es eines der Ziele die Funktion weiterer LRR-RLKs in der Pathogenabwehr aufzuklären. Nach einer Vorauswahl von 49 pathogeninduzierten LRR-RLKs auf Basis der Analyse von *Microarray*-Daten (Kemmerling *et al.* 2007) wurden in dieser Arbeit fünf von ihnen genauer betrachtet. Trotz der Gefahr von Redundanz durch die Vielzahl eng verwandter LRR-RLKs gelang es für drei dieser Gene mindestens eine biologische Funktion nachzuweisen und ihre Relevanz in Prozessen der Pathogenabwehr zu belegen.

### 4.1 DRK5

#### 4.1.1 Regulation der DRK5-Genexpression

Eine aufgrund ihres Expressionsmusters ausgewählte LRR-RLK ist die DRK5 (*defense related receptor-like kinase 5*). Die Analyse der *Microarray*-Daten nach Pathogeninfektion sollte erste Anhaltspunkte für eine eventuelle Funktion der DRK5 in der Pathogenabwehr liefern. Sie ergibt, dass die *DRK5*-Transkription durch die nichtpathogenen Bakterien *Pph* und *Pto hrc-* bzw. den avirulenten Stamm *Pto avrRpm1* induziert wird (Kapitel 3.2.1, Abbildung 3.2.1). Ihre Expression wird demnach speziell in nichtkompatiblen Interaktionen aktiviert. Damit verglichen wird ihr Transkript nach Infektion mit dem virulenten *Pto* DC3000

stark reduziert. Truman und seine Kollegen konnten zeigen, dass durch bakterielle Effektoren eine Reihe von Genen in ihrer Expression herabreguliert werden, welche in der inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion induziert sind (Truman *et al.* 2006). Unter diesen waren auch viele LRR-RLK-Proteine, während deren funktionelle Antagonisten, die Proteinphosphatasen (PP2C), transkriptionell aktiviert werden. Es ist denkbar, dass auch die *DRK5*-Expression eventuell durch *Pto* DC3000-Effektoren aktiv reprimiert werden könnte. Es besteht die zu belegenden Vermutung, dass der *DRK5* eine Aufgabe in der Etablierung der Basisresistenz zukommt und ihre Reprimierung in der kompatiblen Interaktion für das Pathogen von Vorteil ist. Die Reduktion der *DRK5*-Expression erfolgt jedoch nur in den ersten Stunden nach der Infektion, was darauf hindeutet, dass es besonders in diesem Zeitraum für das Bakterium von Nutzen sein könnte, das *DRK5*-Transkript zu reduzieren.

Eine weitere Besonderheit in der *DRK5*-Expression ist ihre Hormonresponsivität. Nach Applikation unterschiedlicher Phytohormone stimuliert ausschließlich Abszissinsäure (ABA) die *DRK5*-Transkription, während das antagonistisch wirkende Hormon Giberrellinsäure (Finkelstein und Zeevaart 1994) den gegenteiligen Effekt hat. Die genauere Betrachtung des *DRK5*-Promotors zeigt, dass dieser über ein ABA-responsives Promotorelement verfügt (Kapitel 3.2.8). Es ist bekannt, dass ABA an der Regulation von Stress- und Abwehrgenen beteiligt ist (Anderson *et al.* 2004). Eventuell besteht also eine Verbindung zwischen Pathogen- und ABA-Responsivität der *DRK5*. Wie andere ABA-regulierte Gene, z.B. *ABI1* (de Torres-Zabala *et al.* 2007), kann die *DRK5* ebenfalls durch hohe Konzentrationen von NaCl induziert werden. Da als Folge von Salzstress die ABA-Konzentration in der Zelle steigt (Fricke *et al.* 2004), ist es durchaus vorstellbar, dass es sich dabei ebenfalls um eine ABA-abhängige Induktion der *DRK5*-Expression handelt.

### **4.1.2 Phänotypische Analysen zur Funktionsbestimmung der DRK5**

Um einen Einblick zu bekommen, ob der *DRK5* eine Funktion in der Pathogenperzeption bzw. –abwehr zukommt, wurde mittels reverser Genetik die Auswirkung eines *DRK5*-Gendefektes auf die Sensitivität der Pflanze gegenüber verschiedenen abiotischen und biotischen Faktoren untersucht. Zu diesem Zweck stand eine homozygote *T*-DNA-Insertionslinie (*drk5*) zur Verfügung (Kapitel 3.2.3.1), für welche das vollständige Verschwinden funktionellen *DRK5*-Transkripts nachweisbar war (Kapitel 3.2.3.2). Da die *drk5* über multiple *T*-DNA-Insertionen verfügt und keine weitere unabhängige *DRK5*-defiziente Linie erhältlich war, wurde für die Verifizierung eventuell beobachteter Phänotypen der Gendefekt durch *DRK5*-Expression komplementiert (Kapitel 2.2.3).



#### **4.1.2.1 Einfluss des *DRK5*-Gendefektes auf die Hormonsensitivität**

Wie in Kapitel 1.3 erläutert, spielen Phytohormone eine wichtige Rolle in der Regulation von Abwehrprozessen. Die Analyse des *DRK5*-Expressionsmusters nach Hormonapplikation zeigte eine spezifische Induktion durch Abszisininsäure, nicht jedoch durch andere Hormone wie beispielsweise Methyljasmonsäure (Kapitel 3.2.2). Daher lag es nahe, die Auswirkungen des *DRK5*-Gendefektes auf die Sensitivität der Pflanzen bezüglich dieses Hormons zu überprüfen. Keimungsexperimente mit der *drk5*-Linie ergaben, dass diese weniger sensitiv gegenüber ABA ist als der vergleichbare Wildtyp (Kapitel 3.2.4.3). Dieser Effekt des *DRK5-knockouts* auf die Keimungsfähigkeit auf ABA-haltigem Medium korreliert mit den Beobachtungen, welche bei anderen Mutanten ABA-induzierbarer Gene, wie beispielsweise der ABA-Signaltransduktionsmutante *abi1-1*, gemacht wurden. Auch das *ABI1*-Gen wird durch ABA induziert, nicht jedoch durch Methyljasmonsäure (de Torres-Zabala *et al.* 2007). Die Mutante *abi1-1* wiederum ist ABA-insensitiv (Achard *et al.* 2006). Anders als bei *abi1* ist die verminderte Sensitivität der *drk5*-Linie jedoch graduell und stellt keine vollständige Unempfindlichkeit dar. Im Gegensatz zu seiner Funktion bei der Adaption an abiotischen Stress ist die Rolle von ABA im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr weit weniger verstanden. Es ist je nach Pflanzenspezies sowohl an der Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen wie biotrophen Pathogenen beteiligt (Koga *et al.* 2004; Mauch-Mani und Mauch 2005; Truman *et al.* 2006; de Torres-Zabala *et al.* 2007). Einige der bekannten Effektoren und Phytotoxine zielen auf die ABA-Signaltransduktion ab (Mohr und Cahill 2007). Ein Beispiel hierfür ist der bakterielle Effektor AvrPto (Tang *et al.* 1996). Er begünstigt das bakterielle Wachstum, erhöht den pflanzlichen ABA-Gehalt und unterdrückt die Expression PAMP-responsiver Gene (Truman *et al.* 2006; de Torres-Zabala *et al.* 2007). Die Herabregulierung der *DRK5*-Transkription nach Infektion mit dem virulenten Bakterium *Pto* DC3000 könnte mit solch einer Effektorwirkung in Zusammenhang stehen. Nach Induktion der *DRK5*-Expression durch den erhöhten ABA-Spiegel nach *Pto* DC3000-Infektion könnte die Wirkung bestimmter Effektoren (wie AvrPto) die *DRK5*-Transkription unterdrücken.

Wie viele ABA-responsive Gene wird die *DRK5*-Expression ebenfalls durch Salzstress induziert (Kapitel 3.2.2). Keimungsexperimente mit *drk5*-Pflanzen zeigen, dass diese weniger sensitiv bezüglich NaCl sind (Kapitel 3.2.4.4). Diese Korrelation ist vermutlich auf die Funktion von ABA in der Kontrolle des pflanzlichen Wasserhaushaltes zurückzuführen (Mansfield 1987; Yamaguchi-Shinozaki und Shinozaki 1994). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass ABA und Salz bzw. Trockenstress die Anfälligkeit der Pflanzen

gegenüber *B. cinerea*, *H. parasitica* und dem avirulenten *P. syringae*-Stamm 1065 erhöhen (Audenaert *et al.* 2002; Mohr und Cahill 2003; Thaler und Bostock 2004). Ob auch die Responsivität der *DRK5* bezüglich ABA mit der gegenüber Pathogenen und Salzstress in Zusammenhang steht, wird man in Zukunft zeigen müssen.

#### **4.1.2.2 Einfluss des *DRK5*-Gendefektes auf die Pathogenabwehr**

Das *DRK5*-Expressionsmuster zeigt, dass eine Vielzahl von Pathogenen die *DRK5*-Transkription beeinflussen (Kapitel 3.2.1). Aus diesem Grund wurde die veränderte Ausprägung von Symptomen und Pathogenwachstum nach Infektion von *drk5*-Pflanzen untersucht. Dazu wurden einerseits pilzliche aber auch bakterielle Pathogene getestet (Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2). Unter ihnen befanden sich sowohl virulente als auch avirulente sowie nichtpathogene Stämme. Trotz Untersuchung einer großen Bandbreite von Erregern und obwohl einige dieser Pathogene die Transkription der *DRK5* zum Teil stark beeinflussen (Kapitel 3.2.1), hat der *DRK5*-Gendefekt scheinbar keine signifikante Auswirkung auf die Suszeptibilität der Pflanze gegenüber den meisten von ihnen. (Kapitel 3.2.4.1 und 3.2.4.2).

Ausschließlich die Applikation des virulenten Bakteriums *Pto* DC3000 ergab phänotypische Unterschiede. Ein *DRK5*-Gendefekt bewirkt eine leicht erhöhte Suszeptibilität gegenüber diesem Pathogen, welche sich in vermehrtem Wachstum des Erregers widerspiegelt. Die Komplementation des *DRK5*-Gendefekts hebt diesen Wachstumsunterschied auf, was zeigt, dass keine der sekundären *T*-DNA-Insertionen (Kapitel 3.2.4.1) an der Ausprägung des beobachteten Phänotyps beteiligt ist. Diese Tatsachen beweisen, dass die *DRK5*-Expression nicht nur wie in Kapitel 4.1.1 beschrieben durch Pathogeninfektion reguliert wird, sondern die *DRK5* eine nachweisbare Funktion in der Abwehr derselben übernimmt, welche jedoch noch genauer zu definieren ist.

Es fällt auf, dass der *Pto* DC3000-Wachstumsunterschied in *drk5*-Pflanzen nur nach Injektion, nicht jedoch nach Sprühhinokulation beobachtet werden kann. Dieser Fakt steht im Widerspruch zu Beobachtungen, die bei Mutanten des PAMP-Rezeptors *FLS2* gemacht wurden (Zipfel *et al.* 2004). Diese zeigen ausschließlich nach Sprühen der Bakteriensuspension auf die Blattoberfläche, nicht jedoch nach Infiltration derselben in das Blatt, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Pto* DC3000. Die Flagellinperzeption trägt somit dazu bei, die bakterielle Invasion in das Blatt zu beeinträchtigen (Zipfel *et al.* 2004). Ein wichtiger Faktor ist dabei die flagellinvermittelte, ABA-abhängige Schließung der Stomata (Melotto *et al.* 2006). Dieser Unterschied zur *drk5*-Linie weist darauf hin, dass die *DRK5*-

Defizienz keinen entscheidenden Einfluss auf die Invasion dieses Bakteriums in das Gewebe hat, sondern erst beim Befall der einzelnen Zellen nachweisbar von Bedeutung ist.

Das erhöhte *Pto* DC3000-Wachstum in *drk5*-Pflanzen wird durch eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und das verstärkte Auftreten von Zelltod begleitet. Bei *Pto* DC3000 handelt es sich um ein hemibiotrophes Pathogen, d. h. nach einer biotrophen folgt eine nekrotrophe Lebensphase. Pathogene haben Strategien entwickelt, um die Mechanismen des pflanzlichen Zelltods für ihre Zwecke zu regulieren. So steigern beispielsweise die *Pto* DC3000-Effektoren AvrPto und AvrPtoB die pflanzliche Ethylenproduktion (Cohn und Martin 2005), welche für die Symptomausprägung in der kompatiblen Interaktion von Bedeutung ist (Bent *et al.* 1992). Sowohl die pathogeninduziert verstärkte ROS-Produktion als auch die vermehrte Zahl toter Zellen in der *drk5*-Linie können somit als Folge erhöhter Bakteriendichte und die durch sie ausgelösten Krankheitssymptome erklärt werden.

### **4.1.3 Mögliche Funktion der DRK5**

Die bisher bekannten, an der Pathogenabwehr beteiligten LRR-RLKs sind hauptsächlich plasmamembranlokalisiert. So konnte beispielsweise für das GFP-Fusionsprotein des Flagellinrezeptors FLS2 gezeigt werden, dass es sich in den meisten Geweben homogen verteilt in der Zellmembran befindet (Robatzek *et al.* 2006). Auch das DRK5-eGFP-Fusionsprotein weist eine eindeutige Plasmamembranlokalisation auf (Kapitel 3.2.6), was vermuten lässt, dass sie in die Perzeption extrazellulärer Moleküle oder die Regulation membranassoziierter Vorgänge involviert ist. Aufgrund der vorliegenden Daten könnte man spekulieren, dass die DRK5 an der Etablierung der pflanzlichen Basisresistenz beteiligt ist. In Wildtyppflanzen muss das virulente Pathogen *Pto* DC3000 durch geeignete Effektoren die durch PAMP-Perzeption ausgelöste Abwehr unterdrücken um diese erfolgreich zu infizieren (Truman *et al.* 2006). Bei den *drk5*-Pflanzen findet es möglicherweise bereits eine geschwächte Abwehr vor, was eine Besiedelung erleichtern würde. Interessant ist, dass auch die PRR-Mutante *fls2-17* ein leicht verstärktes *Pto* DC3000-Wachstum ermöglicht, ohne einen Einfluss auf die Suszeptibilität der Pflanze gegenüber nichtpathogenen oder avirulenten Bakterien zu haben (Zipfel *et al.* 2004). Die Ähnlichkeit zum *drk5*-Phänotyp könnte darauf hinweisen, dass die DRK5 ebenfalls an der PAMP-Perzeption bzw. der Regulation von Abwehrantworten beteiligt ist. Aufgrund der im Vergleich zu PR-Rezeptoren kurzen DRK5-LRR-Domäne (Kapitel 3.2.7) und der vermutlich inaktiven Kinasedomäne (Kapitel 3.2.9 und 3.2.10) wird eher eine Funktion als Korezeptor oder Aktivitätsregulator,

denn als eigentlicher Rezeptor angenommen. Ein zukünftiges Ziel wird es sein, mögliche Liganden und Interaktionspartner mit Hilfe von Koimmunopräzipitation des DRK5-eGFP-Fusionsproteins oder Hefediybridexperimenten mit der DRK5-Kinasedomäne zu identifizieren. Eventuell können über diese Interaktoren Hinweise für das Funktionsprinzip der DRK5 und anderer atypischer Kinasen gefunden werden.

## **4.2 DRK6**

### **4.2.1 Regulation der DRK6-Genexpression**

Eine weitere ausgewählte LRR-RLK ist die DRK6 (*defense related receptor-like kinase 6*). *Microarray*-Daten zu Folge wird die *DRK6* nach Pathogeninfektion verstärkt exprimiert (Kapitel 3.3.1). Während die Inokulation der Typ III-Sekretionssystem (T3SS)-Mutante *Pto hrcC-* nur einen geringen Einfluss auf das *DRK6*-Expressionsniveau hat, erfolgt nach Applikation des Nichtwirtspathogens *Pph* ein signifikanter Transkriptanstieg. Auch die Infektion mit dem virulenten Bakterium *Pto* DC3000 führt anfänglich zu einer *DRK6*-Induktion, anschließend erfolgt jedoch eine drastische Reduzierung der Transkriptmenge. Auch hier könnte man einen, in Kapitel 4.1.1 diskutierten, Einfluss von *Pto* DC3000-Effektoren auf die *DRK6*-Transkription vermuten. Das höchste Expressionsniveau erreicht die *DRK6* nach Applikation des avirulenten Pathogens *Pto avrRpm1*. Diese Daten können unterschiedlich interpretiert werden. Einerseits ist eine Funktion der DRK6 in der Basisresistenz vorstellbar. Andererseits könnte die verstärkte Induzierbarkeit durch Bakterien mit funktionellem T3SS, wie *Pph* und *Pto avrRpm1*, im Vergleich zu *Pto hrcC-*, darauf hinweisen, dass sie als Folge der Erkennung von bakteriellen Effektoren durch die Pflanze transkriptionell aktiviert wird. Nach Infektion mit *Pto* DC3000 erfolgt in diesem Fall eine Repression der *DRK6*-Transkription zur Etablierung der ETS.

Bei der Überprüfung von *Microarray*-Daten nach abiotischem Stress fiel auf, dass die Gabe von NaCl zu einer drastischen Erhöhung der *DRK6*-Expression führt (Kapitel 3.3.2). Dieser Effekt ist auf Salzstress beschränkt und ausschließlich in den Wurzeln zu beobachten. Es könnte daher sein, dass die DRK6 eine Funktion in der Antwort auf Salzstress in den Wurzeln erfüllt.

## **4.2.2 Phänotypische Analysen zur Funktionsbestimmung der DRK6**

### **4.2.2.1 Charakterisierung *DRK6*-gendifizienter *T*-DNA-Insertionslinien**

Um über reverse Genetik die Funktion der DRK6 zu bestimmen, standen zwei verschiedene *T*-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Für die eine, potentiell *DRK6*-defiziente Pflanzenlinie *drk6-1* war es nicht möglich homozygote Kandidaten zu erhalten (Kapitel 3.2.3.1). Die Verteilung von Wildtyp zu heterozygoten *knockout* tragenden Pflanzen beträgt etwa 1:1. Eine Erklärung dafür wäre die Lethalität der den Gendefekt tragenden Gametophyten, was auch als parentales *imprinting* bezeichnet wird. Ein Beispiel für diesen seltenen Effekt wäre das *Arabidopsis*-Protein MEDEA (Grossniklaus *et al.* 1998; Ray 1998; Kinoshita *et al.* 1999). Es wäre also möglich, dass die *DRK6*-Mutation einen Einfluss auf die Gametophytenvitalität hat. Eventuell ist dieser Effekt aber auch auf den Einfluss der *T*-DNA-Insertion auf benachbarte Gene oder aber die Wirkung einer der sekundären Insertionen zurückzuführen. Bei letzterem müsste es sich um eine Insertion nahe des *DRK6*-Gens handeln, also eng mit diesem gekoppelt sein, da auch die Überprüfung einer großen Menge von Pflanzen über mehrere Generationen keinen einzigen homozygoten Kandidaten ergab.

Für die zweite Linie, *drk6-2*, ist es gelungen homozygote Pflanzen ohne *DRK6*-Transkript zu erhalten (Kapitel 3.3.3.1 und 3.2.3.2). Mit diesen wurden alle weiteren Experimente durchgeführt. Erste Versuche, die sekundären *T*-DNA-Insertionen durch Rückkreuzung mit dem Wildtyp Col-0 zu beseitigen, führten nicht zu dem gewünschten Erfolg (Kapitel 3.2.3.3). Daher wurde neben weiterführenden Rückkreuzungen die Strategie der Komplementation durch ektopische *DRK6*-Expression verfolgt (Kapitel 2.2.3). Da es sich bei der *drk6-2* um eine vitale *knockout*-Linie handelt, ist es unwahrscheinlich, dass der *DRK6*-Gendefekt für den beobachteten Effekt in den *drk6-1* Pflanzen verantwortlich ist. Der genetische Hintergrund dieser Linie müsste in weiterführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

### **4.2.2.2 Einfluss eines *DRK6*-Gendefekts auf die abiotische Stressantwort**

Mit Hilfe der *drk6-2*-Linie war es möglich, den Einfluss des *DRK6*-Gens auf verschiedene pflanzliche Prozesse zu untersuchen. Da die Applikation von Salz den einzigen abiotischen Stress darstellte, der zur transkriptionellen Aktivierung der *DRK6* führte, lag es nahe, die Wirkung eines *DRK6*-Gendefektes auf die Sensitivität der Pflanze bezüglich NaCl zu testen. Keimungsexperimente mit *DRK6*-defizientem Saatgut ergaben eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber NaCl-haltigem Medium. Denkbar wäre daher ein Einfluss der DRK6 auf plasma-

membranständige Ionenkanäle. Aus Untersuchungen der *Arabidopsis*-Mutante *dnd1*, welche für den Ionenkanal CNGC2 (*cyclic-nucleotide-gated channel 2*) kodiert (Clough *et al.* 2000), ist bekannt, dass diese an der Etablierung der HR beteiligt ist (Yu *et al.* 1998). Sie weist Zwergwachstum auf, entwickelt spontan Läsionen und zeigt eine erhöhte Expression von *PR*-Genen. Im Gegensatz zur *drk6-2* zeigt sie jedoch keine veränderte Sensitivität gegenüber NaCl. Es gibt also bisher keinen direkten Hinweis auf einen Zusammenhang des *drk6-2* Salzstressphänotyps mit Prozessen der Pathogenabwehr.

### 4.2.2.3 Einfluss eines *DRK6*-Gendefekts auf die Pathogenabwehr

Aufgrund der Pathogenresponsivität der *DRK6* wurde die Wirkung des *DRK6*-Gendefektes auf die Suszeptibilität der Pflanze bezüglich verschiedener Pathogene untersucht. Hierfür standen verschiedene Pilz- und Bakterienstämme zur Verfügung (Kapitel 2.4.1). Untersucht wurden sowohl kompatible als auch inkompatible Interaktionen (Kapitel 3.3.4.1 und 3.3.4.2). Unter den gegebenen Bedingungen konnte jedoch für die meisten der getesteten Pathogene kein signifikanter Unterschied in der Anfälligkeit *DRK6*-defizienter Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden. Erst die Applikation des avirulenten Bakteriums *Pto* avrRpm1 ergab erste Hinweise auf eine Funktion der *DRK6* in der Pathogenabwehr (Kapitel 3.3.4.1). In Wildtyppflanzen ist *Pto* avrRpm1 zwar in der Lage, die Basisresistenz durch die Sekretion von Effektoren über das T3SS zu überwinden, die Expression des AvrRpm1-Proteins ermöglicht der Pflanze jedoch die Erkennung mittels des *R*-Genproduktes RPM1 (Kapitel 1.2). Dies führt zur Aktivierung drastischer Abwehrmaßnahmen, welche in der Ausprägung einer hypersensitiven Reaktion (HR) resultieren. Diese HR ist bei hohen Inokulumkonzentrationen als Läsion makroskopisch zu beobachten. Die Analyse des Bakterienwachstums in *drk6-2*-Pflanzen zeigt, dass nach Injektion des avirulenten Pathogens *Pto* avrRpm1 ein signifikanter Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen ist, welcher durch Expression des *DRK6*-Gens in dieser Linie komplementiert werden konnte (Kapitel 3.2.4.1, Abbildung 3.3.9 und Abbildung 3.3.10). Eine Variation der Inokulationsmethode zeigt, dass dieser Unterschied ausschließlich nach Injektion geringer Bakterienkonzentrationen nachweisbar ist. Unter Verwendung anderer in der Literatur beschriebener Applikationsmethoden (Whalen *et al.* 1991) war ein Nachweis dieser Wachstumsdifferenz nicht möglich. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass bei vorangegangenen Experimenten zur Suche von an der AvrRpm1-Perzeption beteiligten Faktoren (Debener *et al.* 1991; Innes *et al.* 1993; Bisgrove *et al.* 1994; Tornero *et al.* 2002a), die *DRK6* nicht identifiziert wurde. Weiterführende Experimente zeigten, dass der bakterielle

Wachstumsunterschied ebenfalls zu erkennen ist, wenn das Pathogen den funktionell mit dem AvrRpm1-Protein verwandten Avirulenzfaktor AvrB exprimiert (Kapitel 3.3.4.1, Abbildung 3.3.12). Man weiß, dass die beiden Avirulenzproteine AvrRPM1 und AvrB durch dasselbe R-Protein RPM1 erkannt werden (Kapitel 1.2). Mutationen im *RPM1*-Gen zeigen, dass ein vollständiger Gendefekt die Pflanze unfähig macht, auf die Anwesenheit des Avirulenzproteins AvrRpm1 mit einer Abwehrreaktion zu antworten (Dangl *et al.* 1992). Dies resultiert in drastisch erhöhtem Bakterienwachstum von *Pto avrRpm1*. Ein Vergleich des Bakterienwachstums in *drk6*-Mutanten mit dem in *RPM1*-defizienten Pflanzen zeigt, dass die Anfälligkeit des *DRK6-knockouts* zwar signifikant höher ist als die des vergleichbaren Wildtyps, jedoch nicht an die der *R*-Genmutante heranreicht (Kapitel 3.3.4.1, Abbildung 3.3.11 A). Nach Infektion der *drk6-2*-Linie sind die im Vergleich zum Wildtyp verstärkte Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Ausbreitung von Zelltod zu beobachten (Kapitel 3.3.4.1, Abbildung 3.3.9). Beides ist vermutlich die Folge des erhöhten Bakterienwachstums. Im Vergleich dazu sind *rpm1*-Mutanten nicht mehr in der Lage als Reaktion auf eine *Pto avrRpm1*-Infektion eine HR auszubilden, die Bakterien können sich nahezu ungehindert ausbreiten (a11r; Tornero *et al.* 2002a). Dies könnte einerseits eine mögliche Erklärung für den Unterschied des bakteriellen Wachstums in den beiden Linien sein. Andererseits deutet es darauf hin, dass die DRK6 entweder nur Teilaspekte der Abwehr avirulenter Pathogene reguliert und unterstützende Wirkung hat oder aber redundant mit anderen RLKs wirkt. Der einzige bekannte Gendefekt, der die gesteigerte Virulenz von *Pto avrRpm1* und *Pto avrB* vermittelt ohne die Auslösung von HR signifikant zu verändern, ist *rin13* (Al-Daoude *et al.* 2005). Ein Teil des RIN13-Proteins konnte als direkter Interaktor von RPM1 im Hefedihibridsystem isoliert werden (Holt III *et al.* 2002; Mackey *et al.* 2002). Es ist bisher jedoch wenig über seine Funktion bekannt. Daher lässt sich momentan keine Aussage darüber treffen, ob es einen Zusammenhang zwischen RIN13 und DRK6 gibt.

Die veränderte Suszeptibilität von *drk6-2* bezüglich *Pto avrRpm1/Pto avrB* könnte darauf hinweisen, dass die DRK6 einen allgemeinen Einfluss auf die Abwehr von avirulenten Bakterien hat. Andererseits ist es möglich, dass der *DRK6*-Gendefekt RPM1-spezifische Auswirkungen hat. Um diesbezüglich eine Unterscheidung treffen zu können, wurde das Bakterienwachstum eines weiteren, ebenfalls avirulenten Bakteriums, *Pto avrRpt2*, überprüft. Die Erkennung des Effektorproteins AvrRpt2 erfolgt RPM1-unabhängig durch das R-Protein RPS2 (Kapitel 1.2, Abbildung 1.2.2, Leister *et al.* 1996). Die Auswertung des *Pto avrRpt2*-Wachstums ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen *drk6-2* und Wildtyppflanzen. Daraus lässt sich schließen, dass die DRK6-Funktion eng mit dem R-Protein RPM1 gekoppelt ist. Dies muss einen Einfluss des DRK6-Proteins auf RPS2 jedoch nicht

ausschließen. Auch eine transkriptionelle Reduktion des RPM1-Interaktors RIN4 führt zur spezifischen Erhöhung der Suszeptibilität gegenüber *Pto avrRpm1/Pto avrB* (Mackey *et al.* 2002), spätere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass RIN4 ebenfalls in der AvrRpt2 Erkennung durch RPS2 beteiligt ist (Axtell *et al.* 2003; Axtell und Staskawicz 2003; Mackey *et al.* 2003).

#### 4.2.2.4 Transkriptveränderung durch einen *DRK6*-Gendefekt

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die veränderte Expression bestimmter Gene nach Pathogeninfektion in *drk6-2*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp. Es konnte nachgewiesen werden, dass der *DRK6*-Gendefekt die *RPM1*-Expression nach Pathogeninfektion im Vergleich zum Wildtyp vermindert (Kapitel 3.3.5). Bislang konnte jedoch noch keine Aussage über die *RPM1*-Proteinkonzentration in *drk6-2* Pflanzen getroffen werden. Es wäre denkbar, dass die Deregulierung der AvrRpm1-Perzeption durch einen *DRK5*-Gendefekt einen Einfluss auf die abwehrinduzierte Genexpression hat. Dagegen spricht, dass *RIN4*-defekte Pflanzen reduzierte Mengen *RPM1*-Protein aufweisen, ohne eine nachweisbare Veränderung der *RIN4*-Transkriptmenge (Mackey *et al.* 2002).

Eine weitere Auffälligkeit in der Genexpression der *drk6-2* ist die verminderte pathogeninduzierte Transkription des *PR1*-Gens (Kapitel 3.3.5). Sie kann als Indikator einer reduzierten Abwehrantwort interpretiert werden. Im Gegensatz dazu ist in Pflanzen mit erhöhter Basisresistenz, wie beispielsweise *rin4*-Pflanzen, das *PR1*-Transkript bereits in nichtinfizierten Pflanzen stark erhöht (Mackey *et al.* 2002). Inwieweit diese beiden Tatsachen im Zusammenhang stehen, muss in weiterführenden Arbeiten geklärt werden.

#### 4.2.2.5 Mögliche biologische Funktion der *DRK6*

Anhand der vorliegenden Daten lässt sich eine Beteiligung der *DRK6* an der Regulation der *RPM1*-abhängigen Abwehr ableiten. Alle bekannten Signalkomponenten der R-Protein-vermittelten Erkennung der Effektoren AvrRpm1/AvrB-Erkennung besitzen entweder Plasmamembrananker oder sind zumindest zeitweilig plasmamembranassoziiert (Kapitel 1.2, Jones und Dangl 2006). Auch für die *DRK6* konnte eine Plasmamembranlokalisation nachgewiesen werden (Kapitel 3.3.8). Es wäre also sogar denkbar, dass die *DRK6* als Teil eines größeren Proteinkomplexes mit bekannten Proteinen wie *RPM1*, *RIN4* oder *NDR1* interagiert und deren Funktion beeinflusst. Bisher war es jedoch technisch nicht möglich, die direkte



Interaktion der DRK6-Kinasedomäne mit einer dieser Komponenten im Hefedihibridsystem nachzuweisen (Daten nicht abgebildet).

Linien mit bekannten Gendefekten in *NDR1* weisen, wie die *drk6-2*, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem Bakterium *Pto* avrRpm1 auf (Kapitel 3.3.4.1 und Tornero *et al.* 2002b). Anders als bei *drk6-2*-Pflanzen führt ein *NDR1*-Gendefekt jedoch auch zu erhöhtem Bakterienwachstum von *Pto* avrRpt2 (Kapitel 3.3.4.1 und Century *et al.* 1995). Daher ist die Funktion der DRK6 entweder unabhängig von NDR1 oder sie ist im Signalweg oberhalb von NDR1 angesiedelt. Vorstellbar wäre auch eine indirekte oder direkte Regulation von RPM1 durch die DRK6, welche sich nicht nur auf dessen Expression beschränkt. Die bereits erwähnte phänotypische Ähnlichkeit des *DRK6*-Gendefekts zu dem von Mutanten des RPM1-Interaktors RIN13 (Al-Daoude *et al.* 2005) unterstützt diese Annahme. Ein weiteres Protein, welches an der RPM1-vermittelten AvrRpm1-Erkennung beteiligt ist und ein potentiell Ziel der DRK6 darstellen könnte, ist RIN4. Eine Reduktion der RIN4-Proteinmenge in *Arabidopsis* führt spezifisch zu signifikant erhöhtem Bakterienwachstum nach *Pto* avrRpm1- und *Pto* avrB-Infektion (Mackey *et al.* 2002). Zusammen mit späteren Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, dass RIN4 sowohl an der Erkennung von AvrRpm1/AvrB als von AvrRpt2 beteiligt ist (Mackey *et al.* 2002; Axtell und Staskawicz 2003). Während die Anwesenheit von AvrRpm1 zur Änderung des Phosphorylierungszustandes von RIN4 über einen bisher unbekanntem Mechanismus führt, verursacht die Cysteinprotease AvrRpt2 den Abbau dieses Proteins (Kapitel 1.2, Abbildung 1.2.2). Es wäre denkbar, dass die DRK6 in ihrer Funktion als membranständige Rezeptorkinase einen Einfluss auf die RIN4-Funktion bzw. eventuell sogar auf deren Phosphorylierungszustand hat. *In vitro* konnte für die DRK6 zwar keine Kinaseaktivität nachgewiesen werden, es ist jedoch möglich, dass erst die Anwesenheit eines bestimmten Interaktionspartners oder Substrates diese Enzymfunktion aktiviert. Andererseits könnte es auch sein, dass eine Kinaseaktivität nicht für die Funktion in der Pathogenabwehr benötigt wird. Dem Gen *Xa21D*, einem Mitglied der *Xa21*-Genfamilie (A1, A2, C, D, E und F), fehlt der Bereich, welcher für Transmembran- und Kinasedomäne kodiert. Trotzdem ist es in der Lage dasselbe Resistenzspektrum wie *Xa21* zu vermitteln, wenn auch mit verminderter Intensität. Dies wiederum impliziert, dass die Kinasedomäne für die Signaltransduktion in diesem Fall nicht essentiell ist (Wang *et al.* 1998). Eine analoge Funktion ist auch für die DRK6 denkbar. Die Komplementation des Gendefektes durch eine Kinase-Deletionsmutante könnte darüber Aufschluss geben, inwiefern die DRK6-Kinasedomäne für ihre Funktion in der Pathogenabwehr benötigt wird.

Weiterhin wäre es in Zukunft interessant zu erfahren, an welcher Position der Signaltransduktion und über welche Mechanismen die DRK6 Einfluss auf die Erkennung der

Avirulenzproteine nimmt. Ein wichtiges Mittel dazu könnte die Aufklärung potentieller DRK6-Interaktoren durch Optimierung des Hefedibridsystems bzw. die Durchführung von Koimmunopräzipitationsexperimenten mit den zur Verfügung stehenden DRK6-eGFP-exprimierenden Pflanzen sein.

### 4.3 BAK1

Anders als bei den beiden vorangegangenen LRR-RLKs ist über die Funktion von BAK1 einiges bekannt. Bereits vor ein paar Jahren wurde seine Rolle in der pflanzlichen Entwicklung als Korezeptor von BRI1 bei der Brassinolidperzeption beschrieben (Kapitel 1.5; Li *et al.* 2002). Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass BAK1 in weitere, brassinolidunabhängige Prozessen involviert ist. Erste Hinweise dafür stammen von der Beobachtung veränderter Phänotypen in *bak1*-Mutanten nach Pathogeninfektion (Kemmerling *et al.* 2007). Bisher gibt es wenige Rezeptorproteine, für die eine duale Funktion in Entwicklungsprozessen und Pathogenabwehr gezeigt werden konnte. Die frühesten Beispiele stammen aus tierischen Systemen. So ist für den *Drosophila*-Rezeptor Toll gezeigt worden, dass er neben seiner Aufgabe in der Embryonalentwicklung auch an Abwehrprozessen beteiligt ist (Hashimoto *et al.* 1988; Lemaitre *et al.* 1996). In *Arabidopsis* ist beispielsweise die Rezeptorkinase ERECTA sowohl in die pflanzliche Entwicklung als auch in die Etablierung der angeborenen Immunität involviert (Godiard *et al.* 2003). Die Kenntnisse um die Funktionsweise von BAK1 eröffnen eine weitere Möglichkeit, die Regulation solcher Proteine mit multiplen Aufgaben genauer zu untersuchen.

#### 4.3.1 Einfluss des BAK1-Gendefekts auf Pathogenabwehr und Zelltod

Nach Applikation des virulenten Bakteriums *Pto* DC3000 war es möglich, in *BAK1*-defizienten Pflanzen die verstärkte Ausprägung von Symptomen zu zeigen (Kemmerling *et al.* 2007). Diese wurden jedoch nicht von einem veränderten bakteriellen Wachstum begleitet (Kemmerling *et al.* 2007; Kapitel 3.4.3, Abbildung 3.4.7). Im Gegensatz dazu zeigen sich signifikante Wachstumsunterschiede in Tabak *NbSERK3*-defizienten Pflanzen nach Infektion mit *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, *Pto* DC3000 und auch dem T3SS-defizienten nichtpathogenen *Pto* hrcC- (Heese *et al.* 2007). Dieser Unterschied ist nach Aussage der Autoren vermutlich auf die unterschiedlich starke Ausprägung der PTI beider Pflanzenspezies nach Flagellinperzeption zurückzuführen (Zipfel *et al.* 2004, Hann und Rathjen 2007). Parallele Arbeiten konnten die direkte Interaktion von BAK1 mit dem Flagellinrezeptor FLS2 in *Arabidopsis* zeigen (Chinchilla *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007). Die

Applikation des Flagellinpeptids flg22 löst in *bak1*-Mutanten beider Spezies eine geringere ROS-Produktion aus als in Wildtyppflanzen (Heese *et al.* 2007). Weiterhin wurde in beiden Arbeiten die verspätete und reduzierte Aktivierung von MAP-Kinasen nachgewiesen. BAK1 ist demnach ein positiver Regulator der Signaltransduktion nach PAMP-Erkennung.

Man könnte vermuten, dass die Infektion von *bak1*-Mutanten mit einem Bakterium, welches über die Elicitoren Flagellin und EF-Tu verfügt, zu einem vergleichbaren Ergebnis führt. Nach Inokulation des virulenten Pathogens *Pto* DC3000 in *BAK1*-defiziente Pflanzen, war jedoch mit fortschreitender Infektion eine beschleunigte und vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten (Kapitel 3.4.2, Kemmerling *et al.* 2007). Diese geht einher mit einem ebenfalls früher einsetzenden und sich unkontrolliert ausbreitenden Zelltod (Kapitel 3.4.2, Kemmerling *et al.* 2007). Es handelt sich also auf den ersten Blick um den entgegengesetzten Effekt verglichen mit der PAMP-induzierten, verminderten ROS-Produktion in den ersten Minuten nach der Inokulation von Flagellin. BAK1 scheint in diesem Fall ein negativer Regulator von pathogeninduziertem Zelltod zu sein.

Wie bereits erwähnt, geht die veränderte Ausprägung von Symptomen bzw. die erhöhte ROS-Akkumulation nicht mit einem veränderten Bakterienwachstum einher (siehe oben). Dafür könnte es verschiedene Erklärungsansätze geben. Einerseits ist die Fähigkeit von *Pto* DC3000 zu proliferieren nicht zwingend mit der Ausprägung von Krankheitssymptomen gekoppelt. Beispielsweise vermittelt der T3SS-Effektor HopPtoM die Ausbildung von Symptomen, ohne einen Einfluss auf das bakterielle Wachstum in Tomate zu haben (Badel *et al.* 2003). Dies wäre auch eine Erklärung dafür, warum trotz veränderter Symptomatik in *Arabidopsis bak1*-Mutanten kein signifikant verändertes Bakterienwachstum erkennbar ist. BAK1 wäre demnach unter diesen Bedingungen nicht entscheidend für die Suszeptibilität der Pflanze gegenüber *Pto* DC3000 verantwortlich, sondern hätte hauptsächlich Auswirkungen auf die Ausprägung der Krankheitssymptome. Andererseits könnten die gegensätzlichen Reaktionen von *bak1*-Mutanten auf PAMP-Erkennung und Pathogenabwehr die Ausprägung eines beobachtbar veränderten Bakterienwachstums verhindern. *BAK1*-defiziente Pflanzen zeigen eine verminderte Sensitivität bezüglich des Flagellinpeptids flg22 (Chinchilla *et al.* 2007). In FLS2-Rezeptormutanten führt diese Flagellininsensitivität zu verstärktem *Pto* DC3000-Wachstum verglichen mit Wildtyppflanzen (Zipfel *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu könnte eine erhöhte Produktion von ROS und die damit einhergehende verstärkte Ausprägung von Zelltod in *bak1*-Mutanten eine Ausbreitung des Bakteriums beeinträchtigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation des NADPH-Oxidase-Inhibitors DPI (Diphenylen Iodonium) wie erwartet sowohl in Wildtyppflanzen als auch in *bak1*-Mutanten zur

verminderten ROS-Akkumulation nach Pathogeninfektion führt (Kapitel 3.4.3). Sie begünstigt gleichzeitig aber auch das bakterielle Wachstum in den verschiedenen Linien. Dieser Effekt ist jedoch relativ schwach verglichen mit dem drastischen Effekt des DPI auf ROS-Produktion und Zelltod. Während also eine verminderte PAMP-Sensitivität zu einer Steigerung des Bakterienwachstums führt, beeinträchtigen die verstärkte Zelltodausrprägung und ROS-Produktion nach Infektion eher die Vitalität von *Pto* DC3000.

Aus früheren Studien ist bekannt, dass eine vermehrte ROS-Produktion die Anfälligkeit der Pflanze gegenüber nekrotrophen Pathogenen erhöhen kann (zusammengefasst in Greenberg und Yao 2004). Dieser Effekt ist ebenfalls in *bak1*-Pflanzen zu beobachten. Nach der Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola*, ist die sich schnell über die Infektionsstelle hinaus ausbreitende Akkumulation von ROS und das damit einhergehende Auftreten von Zelltodereignissen zu erkennen (Kapitel 3.4.1). Parallel dazu kommt es, anders als in Wildtyppflanzen, zu Hyphenwachstum und Sporulation des Pilzes (Kemmerling *et al.* 2007). Dieses Ergebnis belegt, dass die unkontrollierte Ausbreitung von ROS und Zelltod in *BAK1*-defizienten Pflanzen nicht auf eine bestimmte Pathogenspezies beschränkt ist. Anders als die veränderte Sensitivität gegenüber bestimmten PAMPs, handelt es sich hier vielmehr um die gestörte Regulation einer allgemeinen Abwehrantwort. Aus der Literatur sind bereits andere, so genannte *lesion-mimic* Mutanten bekannt (Lam 2004). Bei dem in *bak1*-Pflanzen beobachteten Phänomen handelt es sich jedoch nicht um salizylsäureinduzierbaren oder spontan auftretenden Zelltod, wie er bei *lsd*- oder *acd5*-Mutanten zu beobachten ist (Greenberg *et al.* 2000; Aviv *et al.* 2002; Lam 2004; Kemmerling *et al.* 2007). Es scheint, als würde *BAK1* eine Rolle speziell bei der Eingrenzung pathogeninduzierten Zelltods zukommen. In Wildtyppflanzen ist dieser auf einzelne Zellen oder sehr kleine Areale begrenzt. Ein *BAK1-knockout* führt jedoch zur unkontrollierten Ausbreitung und unnötigem Absterben von Zellen über die Infektionsstelle hinaus. Anders verhält es sich mit den *bak1-bkk1*-Doppelmutanten (Kapitel 1.5, He *et al.* 2007). Diese Mutanten zeichnen sich durch Keimlingsletalität, konstitutive Abwehrgenexpression, Kalloseablagerung, Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies und spontanen Zelltod aus. Diese Reaktionen treten spontan auf und sind nicht von einer Pathogeninfektion abhängig.

### **4.3.2 Veränderung der Genexpression in *bak1*-Mutanten**

Alle vorhandenen Daten weisen darauf hin, dass *BAK1* mehrere verschiedene Prozesse reguliert. Um einen detaillierteren Überblick über die durch einen *BAK1*-Gendefekt beeinflussten Gene zu erhalten, wurden von unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen *Microarray*-

Daten erstellt und analysiert (Kapitel 3.4.5; Anhang 7.5, Tabelle 7.5.1). Die differentielle Expression ausgewählter Kandidaten aus dem *Microarray*-Experiment konnte in unabhängigen Versuchen mittels semiquantitativer RT-PCR verifiziert werden (Kapitel 3.4.6). Allgemein weisen die *bak1-3-Microarray*-Daten darauf hin, dass in unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen bereits einige Gene transkriptionell aktiv sind, welche in Wildtypen im Verlauf der Pathogenabwehr induziert oder reprimiert werden. So ist eines der bereits konstitutiv in *bak1-3* exprimierten Gene die *RLK5*. Dieses Gen wird in Wildtyppflanzen durch bakterielle Pathogene und auch Salizylsäure (SA) induziert (Du und Chen 2000). Ein weiteres Beispiel ist das ebenfalls induzierte *PR5*-Gen. Unabhängige Studien konnten zeigen, dass es mit der Ausprägung systemischer Resistenz koreguliert wird (Ward *et al.* 1991; Uknes *et al.* 1992) und an der Anthocyanbiosynthese (Li und Strid 2005) bzw. an der Antwort auf UV-B-Strahlung beteiligt ist (Kalbina und Strid 2006). Dabei scheint es sowohl salizylsäure-abhängig, als auch -unabhängig reguliert zu werden (Reuber *et al.* 1998). Des Weiteren ist ein WRKY-Transkriptionsfaktor verstärkt exprimiert. Wie bereits in Kapitel 4.1 beschrieben, sind einige Proteine dieser Familie an der Regulation der Pathogenabwehr beteiligt (Eulgem *et al.* 1999). Ein weiteres Beispiel ist das ebenfalls bereits in uninfizierten *bak1-3*-Pflanzen exprimierte Peptidtransportprotein PTR3 (Karim *et al.* 2005; Karim *et al.* 2007). Es wird in Wildtyppflanzen nach Inokulation von Elicitoren, avirulenten oder auch T3SS-defizienten Bakterien bzw. pilzlichen Pathogenen und Oomyzeten transkriptionell aktiviert. Eine Mutation des Gens resultiert in erhöhter Anfälligkeit gegenüber virulenten Bakterien wie *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* oder *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Karim *et al.* 2007). Es wird vermutet, dass PTR3 eine Funktion im Schutz der Pflanze gegen biotischen und abiotischen Stress ausübt. Ebenfalls spezifisch *bak1-3*-induziert sind Cytochrom-P450-Proteine. Vertreter dieser Gruppe sind an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten, wie Flavonoiden und Alkaloiden, und Hormonen sowie der pflanzlichen Abwehr beteiligt (Whitbred und Schuler 2000). Es fällt auf, dass besonders Gene, welche im Zusammenhang mit oxidativem Stress, Pathogenabwehr oder Seneszenzprozessen stehen, dereguliert sind. In Col-0 ist *BAK1* konstitutiv exprimiert und wird nach Pathogenbefall induziert. Vergleicht man die in unbehandelten *bak1-3* im Vergleich zum Wildtyp deregulierten Gene mit jenen, welche in Col-0 nach Infektion mit *Pto* DC3000 oder *Alternaria brassicicola* induziert werden, bestätigt sich dieser Verdacht. Von den 46 in *bak1-3* differentiel exprimierten Genen, werden 22 in Wildtyppflanzen erst durch Pathogeninfektion aktiviert (Kapitel 3.4.5, Abbildung 3.4.10; Anhang 7.5, Tabelle 7.5.1). Es ist daher wahrscheinlich, dass BAK1 dazu dient, als negativer Regulator die unnötige oder übermäßige Expression stressinduzierbarer Gene zu verhindern.

Das unterschiedliche Genexpressionsmuster von *bak1-3* und Col-0 ist nicht auf unbehandelte Pflanzen beschränkt. Auch nach Infektion mit *Alternaria brassicicola* sind einige Gene zwischen Wildtyp und *bak1-3* differentiell reguliert. Ein Beispiel hierfür wäre ein Lipidtransferprotein (LTP). LTPs sind extrazelluläre, kleine lipidbindende Proteine, die in der Lage sind Lipide zwischen Membranen auszutauschen (Meijer *et al.* 1993; Thoma *et al.* 1993; Yeats und Rose 2008). Sie bilden eine phylogenetische Gruppe, die ausschließlich in Samenpflanzen vorkommt und sich evolutionär von tierischen LTPs unterscheidet. Es wird diskutiert, ob pflanzliche LTPs an Prozessen wie Symbiose, antimikrobieller Abwehr, Signaltransduktion oder auch Zellwandauflösung beteiligt sind (Molina *et al.* 1993; Krause *et al.* 1994). Für einige LTPs konnte eine antibiotische Wirkung nachgewiesen werden (Terras *et al.* 1992; Molina *et al.* 1993; Segura *et al.* 1993; Cammue *et al.* 1995; Kader 1996). Diese beruht vermutlich auf der Erhöhung der Membranpermeabilität der Pathogene, nicht jedoch der Pflanzenzellen (Cammue *et al.* 1995; Regente *et al.* 2005). In *Arabidopsis* konnte ihr Einfluss auf die Signaltransduktion während der Ausprägung Systemischer Resistenz (SAR) nachgewiesen werden (Maldonado *et al.* 2002). Neben ihrer antimikrobiellen Wirkung konnte den LTPs ebenfalls eine Funktion in pflanzlicher Entwicklung und Zellwachstum zugeordnet werden (Nieuwland *et al.* 2005; Yeats und Rose 2008). Betrachtet man weitere differentiell exprimierte Gene, fällt die veränderte Expression von Genen der Lichtreaktion auf. Zu diesen zählen ATPase-Untereinheiten und Proteine des Photosystems I. Die Photosynthese spielt eine wichtige Rolle bei der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies über die so genannte Mehler-Reaktion. Die Deregulation der Photosynthesemaschinerie könnte also neben den plasmamembranständigen NADPH-Oxidasen mit zu einer verstärkten ROS-Produktion in *bak1*-Pflanzen beitragen. Andererseits zeigten Untersuchungen der Photomorphogenesemutante *elongated*, dass es sich bei dieser um ein *BAK1*-Allel handelt. Diese Mutante ist einerseits brassinolidhypersensitiv und zeigt auf der anderen Seite eine verstärkte Antwort auf hohe Lichtintensität (Whippo und Hangarter 2005). Die Beeinflussung Expression von Photosynthesekomponenten durch *BAK1* könnte eine Ursache für dieses Verhalten sein. Wie bereits erwähnt, kann nach Infektion von *bak1* mit dem Pilz *Alternaria brassicicola* die unkontrollierte Ausbreitung der ROS-Produktion über die Infektionsstelle hinaus beobachtet werden (Kapitel 3.4.1). Eine natürliche Reaktion der Pflanze auf zu hohe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies ist die Aktivierung von Entgiftungsmaßnahmen durch Katalasen und Peroxidasen (Grodin und Beck 1979; Kelly und Latzko 1979; Mittler *et al.* 2004). Es ist daher nicht überraschend, dass unter den in *bak1-3* verstärkt exprimierten Genen auch eine Peroxidase zu finden ist. Peroxidasen sind bereits seit längerem für ihre Funktion in Zellwand- und Hormonbiosynthese bzw. Seneszenzprozessen, wie Chlorophyllabbau und

Lipidperoxidation, bekannt (Campa 1991). Neuere Arbeiten weisen auf ihre Funktion in der Etablierung lokaler und systemischer Resistenz hin (siehe oben, Bindschedler *et al.* 2006; Choi *et al.* 2007). Die *bak1-3-Microarray*-Daten nach *Alternaria*-Infektion bestätigen die Vermutung, dass in *bak1*-Pflanzen die schnelle Ausbreitung von Zelltod nach Pathogeninfektion auf die Deregulation von Prozessen zurückzuführen ist, welche an der Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. der Steuerung von Abwehrprozessen beteiligt sind.

Da BAK1 eine wichtige Rolle in der Perzeption von Brassinolid zukommt und in *bak1*-Mutanten ein signifikanter Einfluss auf das Pflanzenwachstum zu beobachten ist, könnte vermutet werden, dass durch einen *BAK1*-Gendefekt auch brassinolidresponsive Gene dereguliert werden. Eine Überlagerung der in *bak1-3* veränderten Genexpression mit brassinolidregulierte Genen zeigt jedoch kaum Übereinstimmungen (Kapitel 3.4.5, Abbildung 3.4.11). Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Applikation von Brassinolid das bakterielle Wachstum von *Pto* DC3000 oder die Symptomausprägung nach *A. brassicicola*-Infektion in *bak1*-Mutanten nicht verändern (Kemmerling *et al.* 2007). Die Rolle von BAK1 in der Pathogenabwehr scheint demnach unabhängig von seiner Funktion in der Brassinolidperzeption zu sein.

### **4.3.3 BAK1-ein multifunktionaler Korezeptor**

Bis zum jetzigen Zeitpunkt lassen sich für BAK1 mindestens zwei voneinander unabhängige Funktionen beschreiben (Abbildung 4.3.1). Einerseits dient BAK1 während der pflanzlichen Entwicklung als Korezeptor von BRI1 in der Brassinolidperzeption (Li *et al.* 2002; Nam und Li 2002). Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass BAK1 für eine funktionelle Pathogenabwehr von Bedeutung ist (Chinchilla *et al.* 2007; He *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007; Kemmerling *et al.* 2007). Die Rolle von BAK1 in der Pathogenperzeption und -abwehr ist dabei vielschichtig. Neben der direkten Interaktion mit PAMP-Rezeptoren und der Modulation der durch diese ausgelösten Abwehrantworten (Chinchilla *et al.* 2007; Heese *et al.* 2007), spielt BAK1 zusätzlich eine Rolle in der Regulierung pathogeninduzierter Zelltodereignisse (He *et al.* 2007; Kemmerling *et al.* 2007). Dabei werden besonders die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivierung von Seneszenzprozessen beeinflusst.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise die Spezifität der BAK1-Funktion in den einzelnen Prozessen sichergestellt wird. Es ist vorstellbar, dass die Anwesenheit des jeweiligen Stimulus, wie Brassinolid oder Flagellin, dazu führt, dass BAK1 bevorzugt mit dem

spezifischen Korezeptor interagiert. Andererseits könnten verschiedene Phosphorylierungsmuster in BAK1 die Spezifität für die Aktivierung bestimmter Signalwege und zellulärer Reaktionen vermitteln. Neueste Studien konnten zeigen, dass die spezifische Phosphorylierung bestimmter Aminosäurereste in BAK1 für eine funktionelle Brassinolidperzeption wichtig ist (Wang *et al.* 2005a; Tang *et al.* 2008). Es ist auch möglich, dass eine Regulation der BAK1-Aktivität über posttranslationale Modifikationen und seine Proteinstabilität erfolgt. In weiterführenden Arbeiten wäre es interessant, alternative Bindungspartner von BAK1 zu identifizieren. Dabei ist neben der Wechselwirkung mit weiteren plasmamembranständigen Rezeptoren auch die Interaktion mit Signalkomponenten wie Phospholipasen, G-Proteinen oder MAP-Kinasen denkbar. Für Vertreter dieser Gruppen konnte die Beteiligung an Pathogenabwehr und Zelltodinduktion gezeigt werden. Es wäre daher denkbar, dass auch die BAK1-vermittelte Signaltransduktion stimulusabhängig über eine oder mehrere dieser Komponenten abläuft.

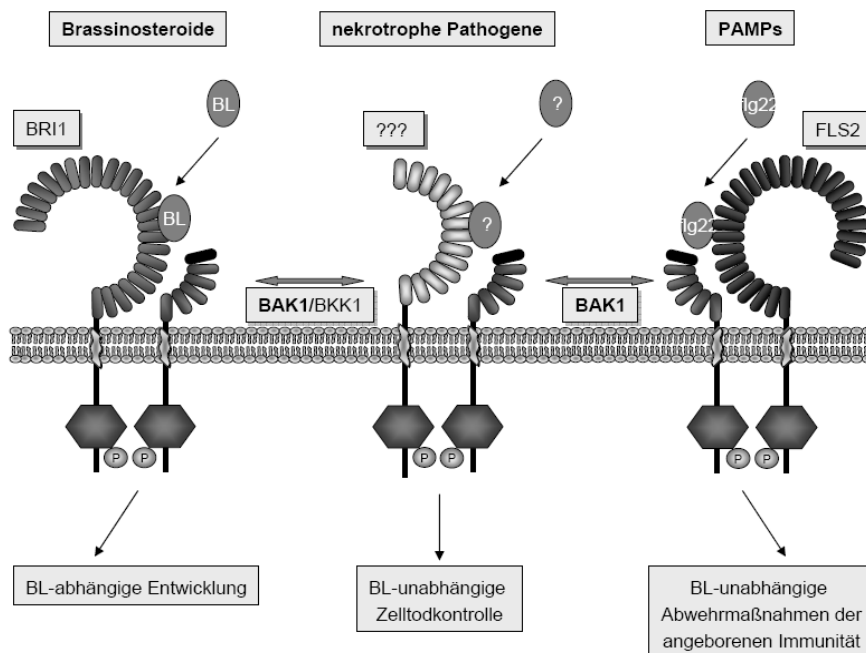


Abbildung 4.3.1: Modell von BAK1 als Teil verschiedener Rezeptorkomplexe und Signalwege (Kemmerling und Nürnberg 2008)



## **5 ZUSAMMENFASSUNG**

Pflanzen verfügen über verschiedene Arten von Rezeptoren um die Gegenwart potentieller Pathogene zu perzipieren. Eine der größten Genfamilien unter ihnen stellt, nach *Arabidopsis*-Genomanalyse, die Gruppe der leuzinreichen Rezeptorkinasen (LRR-RLKs) dar. Neben der Funktion von LRR-RLKs in pflanzlichen Entwicklungsprozessen konnte bisher nur für die PAMP-Rezeptoren FLS2 und EFR eine Aufgabe in der Pathogenabwehr nachgewiesen werden (Gomez-Gomez und Boller 2000; Zipfel *et al.* 2006). Das Wissen darüber, dass FLS2 durch die Anwesenheit des PAMPs Flagellin transkriptionell aktiviert wird, ermöglichte, unter Verwendung von *Microarray*-Daten nach Elicitorbehandlung bzw. Pathogeninfektion, die Auswahl von LRR-RLKs mit potentieller Funktion in der Pathogenabwehr. Unter Zuhilfenahme der reversen Genetik war es in dieser Arbeit möglich für drei Kandidaten die Bedeutung in Prozessen der angeborenen Immunität nachzuweisen.

Die DRK5 ist scheinbar an der Vermittlung der Basisresistenz nach *Pto* DC3000-Infektion beteiligt. Die Überprüfung des bakteriellen Wachstums in *drk5*-Mutanten zeigt eine erhöhte Suszeptibilität der Pflanzen gegenüber diesem Pathogen verglichen mit dem Wildtyp. Nichtvirulente und avirulente Bakterien weisen jedoch kein verändertes Wachstum auf. Weiterhin kann man bei *drk5*-Pflanzen eine verminderte Sensitivität gegenüber dem Phytohormon Abszisionsäure und Salzstress beobachten. Ob Pathogen- und Hormon- bzw. Salzstressphänotyp eine gemeinsame Ursache haben, muss noch untersucht werden.

Für die DRK6 war es möglich, eine Beteiligung in der kultivarspezifischen Immunantwort nachzuweisen. Ein *DRK6*-Gendefekt hat dabei spezifisch Einfluss auf die vollständige Etablierung der RPM1-vermittelten Resistenz. Er erhöht die Suszeptibilität der Pflanze gegenüber *Pto* AvrRpm1 und *Pto* avrB, nicht jedoch gegenüber *Pto* avrRpt2. Anders als die meisten bekannten Mutanten von an der *R*-Gen-vermittelten Resistenz beteiligten Proteinen, ist die *drk6-2* Linie jedoch weiterhin in der Lage eine HR auszuprägen. *DRK6*-defiziente Pflanzen zeigen eine verminderte Expression von *PR-1* nach *Pto* avrRpm1-Infektion, was auf eine verminderte Aktivität der Abwehr hinweist.

Für die Rezeptorkinase BAK1 wurde in früheren Experimenten gezeigt, dass sie je nach Interaktionspartner an verschiedenen Prozessen beteiligt sein kann. Einerseits kontrolliert sie als BRI1-Korezeptor die Brassinolidperzeption, andererseits ist sie als Interaktionspartner von PAMP-Rezeptoren in der Lage brassinolidunabhängig in die Pathogenabwehr einzugreifen. *BAK1*-gendifiziente Pflanzen weisen zusätzlich eine unkontrollierte Ausbreitung von Zelltod nach Infektion mit Pathogenen auf, welche unabhängig von

Brassinolid- und Flagellinperzeption ist. Es wird vermutet, dass BAK1 als Korezeptor oder Regulator verschiedener Rezeptoren Einfluss auf unterschiedliche pflanzliche Prozesse nimmt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Mitglieder der LRR-RLKs auf verschiedene Weise in der Lage sind die Pathogenperzeption, Signaltransduktion und Abwehrantwort zu regulieren. Dabei spielen sie sowohl in der Etablierung der Basisresistenz als auch der kultivarspezifischen Immunität eine wichtige Rolle. Die Aufklärung der durch sie regulierten Signalwege könnte in Zukunft zum besseren Verständnis abwehrrelevanter Prozesse beitragen.

## 6 LITERATUR

- Abramovitch, R. B., Kim, Y. J., Chen, S., Dickman, M. B. und Martin, G. B.** (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo Journal* **22**(1): 60-9.
- Abramovitch, R. B. und Martin, G. B.** (2004). Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 356-64.
- Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J. und Harberd, N. P.** (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**(5757): 91-4.
- Adams, J. A.** (2003). Activation loop phosphorylation and catalysis in protein kinases: is there functional evidence for the autoinhibitor model? *Biochemistry* **42**(3): 601-7.
- Aderem, A. und Ulevitch, R. J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**(6797): 782-7.
- Agrios, G. N.** (1988). Plant Pathology, 3rd edition. San Diego, *Academic Press, Inc.*
- Akira, S. und Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **4**(7): 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S. und Takeuchi, O.** (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**(4): 783-801.
- Al-Daoude, A., de Torres Zabala, M., Ko, J.-H. und Grant, M.** (2005). RIN13 Is a Positive Regulator of the Plant Disease Resistance Protein RPM1. *Plant Cell* **17**(3): 1016-1028.
- Alfano, J. R. und Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 385-414.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., et al.** (2003). Genome-Wide Insertional Mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**(5633): 653-657.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. und Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**(6): 773-84.
- Anderson, J. P., Badruzsafari, E., Schenk, P. M., Manners, J. M., Desmond, O. J., Ehlert, C., Maclean, D. J., Ebert, P. R. und Kazan, K.** (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**(12): 3460-79.
- Arabidopsis-genome-initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**(6814): 796-815.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M. und Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**(6875): 977-83.
- Audenaert, K., De Meyer, G. B. und Hofte, M. M.** (2002). Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to Botrytis cinerea and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* **128**(2): 491-501.

- Auh, C. K. und Murphy, T. M.** (1995). Plasma Membrane Redox Enzyme Is Involved in the Synthesis of O<sub>2</sub><sup>-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Phytophthora Elicitor-Stimulated Rose Cells. *Plant Physiology* **107**(4): 1241-1247.
- Ausubel, F. M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* **6**(10): 973-979.
- Aviv, D. H., Rusterucci, C., Holt III, B. F., Dietrich, R. A., Parker, J. E. und Dangl, J. L.** (2002). Runaway cell death, but not basal disease resistance, in lsd1 is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *The Plant Journal* **29**(3): 381-391.
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D. und Staskawicz, B. J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the Pseudomonas syringae type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Molecular Microbiology* **49**(6): 1537-46.
- Axtell, M. J. und Staskawicz, B. J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**(3): 369-77.
- Badel, J. L., Nomura, K., Bandyopadhyay, S., Shimizu, R., Collmer, A. und He, S. Y.** (2003). Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 HopPtoM (CEL ORF3) is important for lesion formation but not growth in tomato and is secreted and translocated by the Hrp type III secretion system in a chaperone-dependent manner. *Molecular Microbiology* **49**(5): 1239-51.
- Baulcombe, D., Saunders, G., Bevan, M., Mayo, M. und Harrison, B.** (1986). Expression of biologically active viral satellite RNA from nuclear genome of transformed plants. *Nature* **321**: 321:446.
- Bechtold, N., Ellis, J. und Pelletier, G.** (1993). In planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana plants. *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sciences* (316): 1194-1199.
- Beers, E. P. und McDowell, J. M.** (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(6): 561-567.
- Bent, A., Kunkel, B., Dahlbeck, D., Brown, K., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. und Staskawicz, B.** (1994). RPS2 of Arabidopsis thaliana: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**(5180): 1856-1860.
- Bent, A. F., Innes, R. W., Ecker, J. R. und Staskawicz, B. J.** (1992). Disease development in ethylene-insensitive Arabidopsis thaliana infected with virulent and avirulent Pseudomonas and Xanthomonas pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **5**(5): 372-8.
- Bindschedler, L. V., Dewdney, J., et al.** (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal* **47**(6): 851-863.
- Birnboom, H. C. und Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513-1523.
- Bisgrove, S. R., Simonich, M. T., Smith, N. M., Sattler, A. und Innes, R. W.** (1994). A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell* **6**(7): 927-33.
- Bishop, G. J. und Koncz, C.** (2002). Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* **14 Suppl**: S97-110.
- Bittel, P. und Robatzek, S.** (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* **10**(4): 335-41.

- Blatt, M. R., Grabov, A., Brearley, J., Hammond-Kosack, K. und Jones, J. D.** (1999). K<sup>+</sup> channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *The Plant Journal* **19**(4): 453-62.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. und Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**(8): 1425-40.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C. und Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* **53**(372): 1367-76.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. und Lamb, C. J.** (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**(1): 21-30.
- Brisson, L. F., Tenhaken, R. und Lamb, C.** (1994). Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* **6**(12): 1703-1712.
- Brueggeman, R., Rostoks, N., Kudrna, D., Kilian, A., Han, F., Chen, J., Druka, A., Steffenson, B. und Kleinhofs, A.** (2002). The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(14): 9328-33.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J. J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. und Nürnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo Journal* **21**(24): 6681-8.
- Cammue, B. P., Thevissen, K., et al.** (1995). A potent antimicrobial protein from onion seeds showing sequence homology to plant lipid transfer proteins. *Plant Physiology* **109**(2): 445-55.
- Campa, A.** (1991). Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology*. **2**.
- Catanzariti, A. M., Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Ayliffe, M. A. und Ellis, J. G.** (2006). Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell* **18**(1): 243-56.
- Century, K. S., Holub, E. B. und Staskawicz, B. J.** (1995). NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**(14): 6597-601.
- Chassot, C., Nawrath, C. und Metraux, J. P.** (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *The Plant Journal* **49**(6): 972-80.
- Chen, X., Shang, J., et al.** (2006). A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance. *The Plant Journal* **46**(5): 794-804.
- Chern, M., Fitzgerald, H. A., Canlas, P. E., Navarre, D. A. und Ronald, P. C.** (2005). Overexpression of a rice NPR1 homolog leads to constitutive activation of defense response and hypersensitivity to light. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**(6): 511-20.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. und Felix, G.** (2006). The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**(2): 465-76.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G. und Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**(7152): 497-500.

- Choi, H. W., Kim, Y. J., Lee, S. C., Hong, J. K. und 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 Physiology* **145**(3): 890-904.
- Clark, S. E., Running, M. P. und Meyerowitz, E. M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. *Development* **119**(2): 397-418.
- Clark, S. E., Williams, R. W. und Meyerowitz, E. M.** (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in Arabidopsis. *Cell* **89**(4): 575-85.
- Clough, S. J. und Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* **16**(6): 735-43.
- Clough, S. J., Fengler, K. A., Yu, I. C., Lippok, B., Smith, R. K., Jr. und Bent, A. F.** (2000). The Arabidopsis dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(16): 9323-8.
- Cohn, J., Sessa, G. und Martin, G. B.** (2001). Innate immunity in plants. *Current Opinion in Immunology* **13**(1): 55-62.
- Cohn, J. R. und Martin, G. B.** (2005). Pseudomonas syringae pv. tomato type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *The Plant Journal* **44**(1): 139-54.
- Cook, D. N., Pisetsky, D. S. und Schwartz, D. A.** (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nature Immunology* **5**(10): 975-9.
- Dangl, J. L., Dietrich, R. A. und Richberg, M. H.** (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* **8**(10): 1793-1807.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**(6839): 826-33.
- Dangl, J. L., Ritter, C., Gibbon, M. J., Mur, L. A., Wood, J. R., Goss, S., Mansfield, J., Taylor, J. D. und Vivian, A.** (1992). Functional homologs of the Arabidopsis RPM1 disease resistance gene in bean and pea. *Plant Cell* **4**(11): 1359-69.
- Dardick, C. und Ronald, P.** (2006). Plant and Animal Pathogen Recognition Receptors Signal through Non-RD Kinases. *Public Library of Science Pathogens* **2**(1): e2.
- de Torres, M., Mansfield, J. W., et al.** (2006). Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *The Plant Journal* **47**(3): 368-82.
- de Torres-Zabala, M., Truman, W., Bennett, M. H., Lafforgue, G., Mansfield, J. W., Rodriguez Egea, P., Bogre, L. und Grant, M.** (2007). Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway to cause disease. *Embo Journal* **26**(5): 1434-43.
- De Vos, M., Van Oosten, V. R., et al.** (2005). Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **18**(9): 923-37.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. und Dangl, J. L.** (1991). Identification and molecular mapping of a single Arabidopsis thaliana locus determining resistance to a phytopathogenic Pseudomonas syringae isolate. *The Plant Journal* **1**(3): 289-302.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A. und Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**(6693): 585-8.

- Desikan, R., Hancock, J. T., Coffey, M. J. und Neill, S. J.** (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. *FEBS Letters* **382**(1-2): 213-217.
- Dixon, R. A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**(6839): 843-7.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Ayliffe, M. A. und Ellis, J. G.** (2004). The *Melampsora lini* AvrL567 avirulence genes are expressed in haustoria and their products are recognized inside plant cells. *Plant Cell* **16**(3): 755-68.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A. M., Teh, T., Wang, C. I., Ayliffe, M. A., Kobe, B. und Ellis, J. G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(23): 8888-93.
- Doke, N.** (1983). Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato-tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiological Plant Pathology* **23**: 345-357.
- Donnelly, M. A. und Steiner, T. S.** (2002). Two Nonadjacent Regions in Enteroaggregative *Escherichia coli* Flagellin Are Required for Activation of Toll-like Receptor 5. *Journal of Biological Chemistry* **277**(43): 40456-40461.
- Dow, M., Newman, M. A. und von Roepenack, E.** (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annual Review of Phytopathology* **38**: 241-261.
- Du, L. und Chen, Z.** (2000). Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **24**(6): 837-847.
- Durner, J., Wendehenne, D. und Klessig, D. F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(17): 10328-33.
- Durrant, W. E. und Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**: 185-209.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. und Somssich, I. E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**(5): 199-206.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. und Somssich, I. E.** (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo Journal* **18**(17): 4689-99.
- Feinberg, A. P. und Vogelstein, B.** (1984). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **137**: 266-267.
- Felix, G. und Boller, T.** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **278**(8): 6201-8.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. und Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**(3): 265-76.
- Ferrandon, D., Imler, J. L., Hetru, C. und Hoffmann, J. A.** (2007). The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nature Reviews Immunology* **7**(11): 862-74.

- Feuillet, C., Schachermayr, G. und Keller, B.** (1997). Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the Lr10 disease resistance locus of wheat. *The Plant Journal* **11**(1): 45-52.
- Feys, B., Benedetti, C. E., Penfold, C. N. und Turner, J. G.** (1994). Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**(5): 751-759.
- Feys, B. J. und Parker, J. E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16**(10): 449-55.
- Finkelstein, R. R. und Zeevaart, J. A. D.** (1994). Gibberellin and abscisic acid biosynthesis and response. Arabidopsis. Meyerowitz, E. M. und Somerville, C. R. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 523–553.
- Fliegmann, J., Mithofer, A., Wanner, G. und Ebel, J.** (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *Journal of Biological Chemistry* **279**(2): 1132-40.
- Flor, H. H.** (1955). Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology* **45**: 680-685.
- Fricke, W., Akhilarova, G., Veselov, D. und Kudoyarova, G.** (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany* **55**(399): 1115-1123.
- Friedrichsen, D. M., Joazeiro, C. A. P., Li, J., Hunter, T. und Chory, J.** (2000). Brassinosteroid-Insensitive-1 Is a Ubiquitously Expressed Leucine-Rich Repeat Receptor Serine/Threonine Kinase. *Plant Physiology* **123**(4): 1247-1256.
- Fujiki, Y., Yoshikawa, Y., Sato, T., Inada, N., Ito, M., Nishida, I. und Watanabe, A.** (2001). Dark-inducible genes from Arabidopsis thaliana are associated with leaf senescence and repressed by sugars. *Physiologia Plantarum* **111**(3): 345-352.
- Galan, J. E. und Collmer, A.** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**(5418): 1322-8.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y. und McCourt, P.** (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**(7): 1117-26.
- Girardin, S. E., Sansonetti, P. J. und Philpott, D. J.** (2002). Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends in Microbiology* **10**(4): 193-9.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H. und Marco, Y.** (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *The Plant Journal* **36**(3): 353-65.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z. und Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**(5): 1155-63.
- Gomez-Gomez, L. und Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular Cell* **5**(6): 1003-11.
- Gomez-Gomez, L. und Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**(6): 251-6.



- Gomez-Gomez, L., Felix, G. und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**(3): 277-84.
- Grant, M., Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. und Mansfield, J.** (2000). The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **23**(4): 441-50.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W. und Dangl, J. L.** (1995). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**(5225): 843-6.
- Greenberg, J. T.** (1996). Programmed cell death: a way of life for plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(22): 12094-7.
- Greenberg, J. T., Silverman, F. P. und Liang, H.** (2000). Uncoupling Salicylic Acid-Dependent Cell Death and Defense-Related Responses From Disease Resistance in the *Arabidopsis* Mutant *acd5*. *Genetics* **156**(1): 341-350.
- Greenberg, J. T. und Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**(3): 201-211.
- Gribskov, M., Fana, F., Harper, J., Hope, D. A., Harmon, A. C., Smith, D. W., Tax, F. E. und Zhang, G.** (2001). PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucleic Acids Research* **29**(1): 111-113.
- Groden, D. und Beck, E.** (1979). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> destruction by ascorbate-dependent systems from chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* **546**(3): 426-35.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M. A. und Gagliano, W. B.** (1998). Maternal Control of Embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group Gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**(5362): 446-450.
- Gust, A. A., Biswas, R., et al.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **282**(44): 32338-48.
- Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**(10): 1773-91.
- Hammond-Kosack, K. E. und Jones, J. D. G.** (1997). Plant disease resistance genes. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**(1): 575-607.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M. und Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**(4861): 42-52.
- Hann, D. R. und Rathjen, J. P.** (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* **49**(4): 607-618.
- Hashimoto, C., Hudson, K. L. und Anderson, K. V.** (1988). The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**(2): 269-279.
- Hattori, T., Terada, T. und Hamasuna, S.** (1995). Regulation of the *Osm* gene by abscisic acid and the transcriptional activator VP1: analysis of cis-acting promoter elements required for regulation by abscisic acid and VP1. *The Plant Journal* **7**(6): 913-25.

- Hauck, P., Thilmony, R. und He, S. Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(14): 8577-82.
- He, J. X., Gendron, J. M., Sun, Y., Gampala, S. S., Gendron, N., Sun, C. Q. und Wang, Z. Y.** (2005). BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* **307**(5715): 1634-8.
- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S. D. und Li, J.** (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Current Biology* **17**(13): 1109-15.
- He, P., Shan, L., Lin, N. C., Martin, G. B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. und Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* **125**(3): 563-75.
- He, S. Y., Nomura, K. und Whittam, T. S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**(1-3): 181-206.
- Heath, M. C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* **3**(4): 315-9.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J. P., Hartog, M. V., Schmidt, E. D., Boutilier, K., Grossniklaus, U. und de Vries, S. C.** (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* **127**(3): 803-16.
- Heese, A., Hann, D. R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A. M., He, K., Li, J., Schroeder, J. I., Peck, S. C. und Rathjen, J. P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(29): 12217-22.
- Higo, K., Ugawa, Y., Iwamoto, M. und Korenaga, T.** (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. *Nucleic Acids Research* **27**(1): 297-300.
- Holt III, B. F., Boyes, D. C., Ellerstrom, M., Siefers, N., Wiig, A., Kauffman, S., Grant, M. R. und Dangl, J. L.** (2002). An evolutionarily conserved mediator of plant disease resistance gene function is required for normal *Arabidopsis* development. *Developmental Cell* **2**: 807-817.
- Holub, E. B., Beynon, J. L. und Crute, I. R.** (1994). Phenotypic and genotypic characterization of interactions between isolates of *Peronospora parasitica* and accessions of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 223-239.
- Ingle, R. A., Carstens, M. und Denby, K. J.** (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* **28**(9): 880-9.
- Innes, R. W., Bisgrove, S. R., Smith, N. M., Bent, A. F., Staskawicz, B. J. und Liu, Y. C.** (1993). Identification of a disease resistance locus in *Arabidopsis* that is functionally homologous to the RPG1 locus of soybean. *The Plant Journal* **4**(5): 813-20.
- Inohara, N. und Nunez, G.** (2003). NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews Immunology* **3**(5): 371-82.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(9): 4800-5.

- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. und Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo Journal* **19**(15): 4004-14.
- Jinn, T.-L., Stone, J. M. und Walker, J. C.** (2000). HAESA, an Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes and Development* **14**(1): 108-117.
- Johnson, L. N., Noble, M. E. und Owen, D. J.** (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**(2): 149-58.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L. und Hirt, H.** (2002). Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(5): 415-24.
- Jones, D. A. und Jones, J. D. G.** (1997). The roles of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology* **24**: 89-167.
- Jones, D. A. und Takemoto, D.** (2004). Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**(1): 48-62.
- Jones, D. A., Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. und Jones, J. D.** (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**(5186): 789-93.
- Jones, J. D. und Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**(7117): 323-9.
- Kader, J. C.** (1996). Lipid-Transfer Proteins in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 627-654.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. und Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(29): 11086-91.
- Kalbina, I. und Strid, A.** (2006). Supplementary ultraviolet-B irradiation reveals differences in stress responses between Arabidopsis thaliana ecotypes. *Plant, Cell and Environment* **29**(5): 754-63.
- Kamoun, S.** (2001). Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. *Current Opinion in Plant Biology* **4**(4): 295-300.
- Karim, S., Holmstrom, K. O., Mandal, A., Dahl, P., Hohmann, S., Brader, G., Palva, E. T. und Pirhonen, M.** (2007). AtPTR3, a wound-induced peptide transporter needed for defence against virulent bacterial pathogens in Arabidopsis. *Planta* **225**(6): 1431-45.
- Karim, S., Lundh, D., Holmstrom, K. O., Mandal, A. und Pirhonen, M.** (2005). Structural and functional characterization of AtPTR3, a stress-induced peptide transporter of Arabidopsis. *Journal of Molecular Modeling* **11**(3): 226-36.
- Karimi, M., De Meyer, B. und Hilson, P.** (2005). Modular cloning in plant cells. *Trends in Plant Science* **10**(3): 103-105.
- Karimi, M., Inze, D. und Depicker, A.** (2002). GATEWAY(TM) vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science* **7**(5): 193-195.
- Karlova, R., Boeren, S., Russinova, E., Aker, J., Vervoort, J. und de Vries, S.** (2006). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* **18**(3): 626-38.

- Kelly, G. J. und Latzko, E.** (1979). Soluble ascorbate peroxidase: detection in plants and use in vitamin C estimation. *Naturwissenschaften* **66**(12): 617-9.
- Kemmerling, B. und Nürnberger, T.** (2008). Brassinosteroid-independent functions of the BRI1-associated kinase BAK1/SERK3. *Plant Signaling and Behavior* **3**(2).
- Kemmerling, B., Schwedt, A., et al.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Current Biology* **17**(13): 1116-22.
- Kim, H. S., Desveaux, D., Singer, A. U., Patel, P., Sondek, J. und Dangl, J. L.** (2005). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**(18): 6496-501.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. und Chory, J.** (2005). Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* **433**(7022): 167-71.
- Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J. J., Goldberg, R. B. und Fischer, R. L.** (1999). Imprinting of the MEDEA Polycomb Gene in the *Arabidopsis* Endosperm. *Plant Cell* **11**(10): 1945-1952.
- Kistner, C. und Parniske, M.** (2002). Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis. *Trends in Plant Science* **7**(11): 511-8.
- Kjemtrup, S., Nimchuk, Z. und Dangl, J. L.** (2000). Effector proteins of phytopathogenic bacteria: bifunctional signals in virulence and host recognition. *Current Opinion in Microbiology* **3**(1): 73-8.
- Klessig, D. F., Durner, J., et al.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(16): 8849-55.
- Kobe, B. und Deisenhofer, J.** (1993). Crystallization and preliminary X-ray analysis of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Journal of Molecular Biology* **231**(1): 137-40.
- Koga, H., Dohi, K. und Mori, M.** (2004). Abscisic acid and low temperatures suppress the whole plant-specific resistance reaction of rice plants to the infection of *Magnaporthe grisea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65**(1): 3-9.
- Köhler, C., Merkle, T. und Neuhaus, G.** (1999). Characterisation of a novel gene family of putative cyclic nucleotide- and calmodulin-regulated ion channels in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**(1): 97-104.
- Koornneef, M., Leon-Kloosterziel, K., Schwartz, S. H. und Zeevaart, J. A. D.** (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*(36): 83-89.
- Krause, A., Sigrist, C. J., Dehning, I., Sommer, H. und Broughton, W. J.** (1994). Accumulation of transcripts encoding a lipid transfer-like protein during deformation of nodulation-competent *Vigna unguiculata* root hairs. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**(3): 411-8.
- Krupa, A., Abhinandan, K. R. und Srinivasan, N.** (2004). KinG: a database of protein kinases in genomes. *Nucleic Acids Research* **32**(Database issue): D153-5.
- Kunkel, B. N. und Brooks, D. M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(4): 325-31.

- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. und Felix, G.** (2004). The N Terminus of Bacterial Elongation Factor Tu Elicits Innate Immunity in Arabidopsis Plants. *Plant Cell* **16**(12): 3496-3507.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lam, E.** (2004). Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**(4): 305-15.
- Lamb, C. und Dixon, R. A.** (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275.
- Lee, J., Klüsener, B., et al.** (2001). HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore invitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(1): 289-294.
- Leister, R. T., Ausubel, F. M. und Katagiri, F.** (1996). Molecular recognition of pathogen attack occurs inside of plant cells in plant disease resistance specified by the Arabidopsis genes RPS2 and RPM1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(26): 15497-15502.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. und Hoffmann, J. A.** (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* **86**(6): 973-83.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. und Lamb, C.** (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**(4): 583-593.
- Li, J. und Chory, J.** (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**(5): 929-38.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E. und Walker, J. C.** (2002). BAK1, an Arabidopsis LRR Receptor-like Protein Kinase, Interacts with BRI1 and Modulates Brassinosteroid Signaling. *Cell* **110**(2): 213-222.
- Li, S. und Strid, A.** (2005). Anthocyanin accumulation and changes in CHS and PR-5 gene expression in *Arabidopsis thaliana* after removal of the inflorescence stem (decapitation). *Plant Physiology and Biochemistry* **43**(6): 521-5.
- Liu, G. Z., Pi, L. Y., Walker, J. C., Ronald, P. C. und Song, W. Y.** (2002). Biochemical characterization of the kinase domain of the rice disease resistance receptor-like kinase XA21. *Journal of Biological Chemistry* **277**(23): 20264-9.
- Logemann, E., Schell, J. und Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissue. *Analytical Biochemistry* **163**: 16-20.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Ecker, J. R. und Dangl, J. L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**(3): 379-89.
- Mackey, D., Holt III, B. F., Wiig, A. und Dangl, J. L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**(6): 743-54.
- Maldonado, A. M., Doerner, P., Dixon, R. A., Lamb, C. J. und Cameron, R. K.** (2002). A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signalling in Arabidopsis. *Nature* **419**(6905): 399-403.

- Mansfield, T. A.** (1987). Hormones as regulators of water balance. *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. Davies, R. D. Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff Publishers: 411-430.
- Mauch-Mani, B. und Mauch, F.** (2005). The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 409-14.
- Medzhitov, R.** (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* **449**(7164): 819-26.
- Medzhitov, R. und Janeway, C. A., Jr.** (2002). Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**(5566): 298-300.
- Meijer, E. A., de Vries, S. C., Sterk, P., Gadella, D. W., Jr., Wirtz, K. W. und Hendriks, T.** (1993). Characterization of the non-specific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.). *Molecular and Cellular Biochemistry* **123**(1-2): 159-66.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. und He, S. Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**(5): 969-80.
- Miller, J. D., Arteca, R. N. und Pell, E. J.** (1999). Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **120**(4): 1015-24.
- Mindrin, M., Katagiri, F., Yu, G.-L. und Ausubel, F. M.** (1994). The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**(6): 1089-1099.
- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H. und Ebel, J.** (2000). The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biological Chemistry* **381**(8): 705-13.
- Mittal, S. und Davis, K. R.** (1995). Role of the phytotoxin coronatine in the infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**(1): 165-71.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. und Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* **9**(10): 490-498.
- Miya, A., Albert, P., et al.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(49): 19613-8.
- Mohr, P. und Cahill, D.** (2007). Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics* **7**(3): 181-191.
- Mohr, P. G. und Cahill, D. M.** (2003). Abscisic acid influences the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Peronospora parasitica*. *Functional Plant Biology* **30**: 461-469.
- Molina, A., Segura, A. und Garcia-Olmedo, F.** (1993). Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS Letters* **316**(2): 119-22.
- Montillet, J. L., Chamnongpol, S., et al.** (2005). Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiology* **138**(3): 1516-26.

- Nakagawa, T., Kurose, T., et al.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**(1): 34-41.
- Nam, K. H. und Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a Receptor Kinase Pair Mediating Brassinosteroid Signaling. *Cell* **110**(2): 203-212.
- Negrutiu, I., Shillito, R. D., Potrykus, I., Biasini, G. und Sala, F.** (1987). Hybrid genes in the analysis of transformation conditions I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Molecular Biology* **8**: 363-373.
- Nennstiel, D., Scheel, D. und Nürnberger, T.** (1998). Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Letters* **431**(3): 405-410.
- Newman, M. A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J. und Dow, J. M.** (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *The Plant Journal* **29**(4): 487-95.
- Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B. A., Fasolino, A., Hilbers, C. W., Derksen, J. und Mariani, C.** (2005). Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell* **17**(7): 2009-19.
- Nomura, K., Debroy, S., Lee, Y. H., Pumplin, N., Jones, J. und He, S. Y.** (2006). A bacterial virulence protein suppresses host innate immunity to cause plant disease. *Science* **313**(5784): 220-3.
- Nomura, K., Melotto, M. und He, S. Y.** (2005). Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 361-8.
- Nürnberger, T. und Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Current Opinion in Plant Biology* **5**(4): 318-24.
- Nürnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B. und Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**: 249-66.
- Nürnberger, T. und Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**(3): 335-345.
- Nürnberger, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. und Scheel, D.** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**(3): 449-60.
- Nürnberger, T. und Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science* **6**(8): 372-379.
- O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., Esquerre-Tugaye, M.-T. und Dumas, B.** (2004). A Novel Arabidopsis-Colletotrichum Pathosystem for the Molecular Dissection of Plant-Fungal Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**(3): 272-282.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B. und Klee, H. J.** (2003a). Multiple Hormones Act Sequentially to Mediate a Susceptible Tomato Pathogen Defense Response. *Plant Physiology* **133**(3): 1181-1189.
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E. A., Moussatche, P., Lund, S. T., Jones, J. B. und Klee, H. J.** (2003b). Susceptible to intolerance - a range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *The Plant Journal* **33**(2): 245-57.

**Park, H.-J., Miura, Y., Kawakita, K., Yoshioka, H. und Doke, N.** (1998). Physiological Mechanisms of a Sub-Systemic Oxidative Burst Triggered by Elicitor-Induced Local Oxidative Burst in Potato Tuber Slices. *Plant and Cell Physiology* **39**(11): 1218-1225.

**Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Metraux, J. P., Manners, J. M. und Broekaert, W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**(12): 2309-23.

**Penninckx, I. A., Thomma, B. P., Buchala, A., Metraux, J. P. und Broekaert, W. F.** (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**(12): 2103-13.

**Person, C.** (1959). Gene-for-gene relationships in host-parasite systems. *Canadian Journal of Botany* **37**: 1101–1130.

**Pieterse, C., van Wees, S., Hoffland, E., van Pelt, J. A. und van Loon, L. C.** (1996). Systemic Resistance in Arabidopsis Induced by Biocontrol Bacteria Is Independent of Salicylic Acid Accumulation and Pathogenesis-Related Gene Expression. *Plant Cell* **8**(8): 1225-1237.

**Pieterse, C. M. und Van Loon, L. C.** (2004). NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **7**(4): 456-64.

**Prell, H. H.** (1996). Interaktionen von Pflanzen mit phytopathogenen Pilzen: Parasitierung und Resistenz, Genetik und molekulare Phytopathologie. Jena, Stuttgart, G. Fischer.

**Prell, H. H. und Day, P. R.** (2000). Plant-Fungal Pathogen Interaction: A classical and molecular view. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag.

**Ramonell, K., Berrocal-Lobo, M., Koh, S., Wan, J., Edwards, H., Stacey, G. und Somerville, S.** (2005). Loss-of-Function Mutations in Chitin Responsive Genes Show Increased Susceptibility to the Powdery Mildew Pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* **138**(2): 1027-1036.

**Ray, A.** (1998). New paradigms in plant embryogenesis: maternal control comes in different flavors. *Trends in Plant Science* **3**(9): 325-327.

**Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalain, J. und de la Canal, L.** (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology* **40**(3): 183-9.

**Reuber, T. L., Plotnikova, J. M., Dewdney, J., Rogers, E. E., Wood, W. und Ausubel, F. M.** (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants. *The Plant Journal* **16**(4): 473-85.

**Rhee, S. Y., Beavis, W., et al.** (2003). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a model organism database providing a centralized, curated gateway to Arabidopsis biology, research materials and community. *Nucleic Acids Research* **31**(1): 224-228.

**Ride, J. P.** (1983). Cell walls and other structural barriers in defense. Biochemical Plant Pathology. Callow, J. A. Chichester, UK, John Wiley & Sons: 215-236.

**Robatzek, S., Chinchilla, D. und Boller, T.** (2006). Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes and Development* **20**(5): 537-42.

**Roine, E., Wei, W., Yuan, J., Nurmiäho-Lassila, E.-L., Kalkkinen, N., Romantschuk, M. und He, S. Y.** (1997). Hrp pilus: An hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(7): 3459-3464.



- Romeis, T., Piedras, P. und Jones, J. D.** (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**(5): 803-16.
- Ron, M. und Avni, A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**(6): 1604-15.
- Ross, A. F.** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329-339.
- Ross, A. F.** (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-358.
- Russinova, E., Borst, J. W., Kwaaitaal, M., Cano-Delgado, A., Yin, Y., Chory, J. und de Vries, S. C.** (2004). Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell* **16**(12): 3216-29.
- Ryals, J. A., Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H. Y. und Hunt, M. D.** (1996). Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**(10): 1809-1819.
- Sambrook, T. D.** (1998). Does visual perspective matter in imitation? *Perception* **27**(12): 1461-73.
- Saraste, M.** (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* **283**(5407): 1488-93.
- Scheel, D.** (2001). Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. *Oxidative Stress in Plants*. Inzé, D. und van Montagu, M. Harwood, Harwood Academic Publishers: 137-153.
- Scheer, J. M. und Ryan, C. A., Jr.** (2002). The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(14): 9585-90.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H. und Tumlinson, J. H., 3rd** (2003). Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**(18): 10552-7.
- Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. und de Vries, S. C.** (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124**(10): 2049-62.
- Schneider, D. S.** (2002). Plant immunity and film Noir: what gumshoe detectives can teach us about plant-pathogen interactions. *Cell* **109**(5): 537-40.
- Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., Frommer, W. B., Flugge, U.-I. und Kunze, R.** (2003). ARAMEMNON, a Novel Database for Arabidopsis Integral Membrane Proteins. *Plant Physiology* **131**(1): 16-26.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W. und Staskawicz, B. J.** (1996). Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science* **274**(5295): 2063-2065.
- Segura, A., Moreno, M. und Garcia-Olmedo, F.** (1993). Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of Arabidopsis and spinach. *FEBS Letters* **332**(3): 243-6.
- Sela-Buurlage, M. B., Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Melchers, L. S., Van Den Elzen, P. und Cornelissen, B.** (1993). Only Specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Chitinases and [beta]-1,3-Glucanases Exhibit Antifungal Activity. *Plant Physiology* **101**(3): 857-863.

- Shiu, S. H. und Bleecker, A. B.** (2001a). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science Signaling: Signal Transduction Knowledge Environment* **2001**(113): RE22.
- Shiu, S. H. und Bleecker, A. B.** (2001b). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(19): 10763-8.
- Shiu, S.-H. und Bleecker, A. B.** (2003). Expansion of the Receptor-Like Kinase/Pelle Gene Family and Receptor-Like Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* **132**(2): 530-543.
- Shiu, S. H., Karlowski, W. M., Pan, R., Tzeng, Y. H., Mayer, K. F. und Li, W. H.** (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *Plant Cell* **16**(5): 1220-34.
- Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L., Cookson, B. T. und Aderem, A.** (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology* **4**(12): 1247-53.
- Song, W. Y., Wang, G. L., et al.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**(5243): 1804-6.
- Speth, E. B., Lee, Y. N. und He, S. Y.** (2007). Pathogen virulence factors as molecular probes of basic plant cellular functions. *Current Opinion in Plant Biology* **10**(6): 580-6.
- Stracke, S., Kistner, C., et al.** (2002). A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* **417**(6892): 959-62.
- Sun, X., Cao, Y., Yang, Z., Xu, C., Li, X., Wang, S. und Zhang, Q.** (2004). Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *The Plant Journal* **37**(4): 517-27.
- Swarbreck, D., Wilks, C., et al.** (2008). The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Research* **36**(suppl\_1): D1009-1014.
- Tameling, W. I., Elzinga, S. D., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L., Haring, M. A. und Cornelissen, B. J.** (2002). The tomato R gene products I-2 and MI-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **14**(11): 2929-39.
- Tanabe, T., Chamailard, M., et al.** (2004). Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *Embo Journal* **23**(7): 1587-97.
- Tang, W., Deng, Z., Osés-Prieto, J. A., Suzuki, N., Zhu, S., Zhang, X., Burlingame, A. L. und Wang, Z.-Y.** (2008). Proteomic studies of brassinosteroid signal transduction using prefractionation and 2-D DIGE. *Molecular and Cellular Proteomics*: M700358-MCP200.
- Tang, X., Frederick, R. D., Zhou, J., Halterman, D. A., Jia, Y. und Martin, G. B.** (1996). Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* **274**(5295): 2060-2063.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R. T., Ausubel, F. M. und Katagiri, F.** (2000). Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. *Plant Cell* **12**(12): 2541-2554.
- Terras, F. R., Goderis, I. J., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B. P. und Broekaert, W. F.** (1992). In Vitro Antifungal Activity of a Radish (*Raphanus sativus* L.) Seed Protein Homologous to Nonspecific Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiology* **100**(2): 1055-1058.

- Thaler, J. S. und Bostock, R. M.** (2004). Interactions between abscisic-acid-mediated responses and plant resistance to pathogens and insects. *Ecology* **85**: 48–58.
- Thoma, S., Kaneko, Y. und Somerville, C.** (1993). A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* is a cell wall protein. *The Plant Journal* **3**(3): 427-36.
- Thomma, B. P. H. J., Nelissen, I., Eggermont, K. und Broekaert, W. F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* **19**(2): 163-171.
- Torii, K. U.** (2000). Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *Current Opinion in Plant Biology* **3**(5): 361-7.
- Torii, K. U.** (2004). Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology* **234**: 1-46.
- Torii, K. U. und Clark, S. E.** (2000). Receptor-like kinases in plant development. *Advances in Botanical Research incorporating Advances in Plant Pathology* **32**: 226-268.
- Tornero, P., Chao, R. A., Luthin, W. N., Goff, S. A. und Dangl, J. L.** (2002a). Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *Plant Cell* **14**(2): 435-50.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R. W. und Dangl, J. L.** (2002b). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**(5): 1005-15.
- Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Prome, J.-C. und Denarie, J.** (1991). Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**(6328): 670-673.
- Truman, W., de Zabala, M. T. und Grant, M.** (2006). Type III effectors orchestrate a complex interplay between transcriptional networks to modify basal defence responses during pathogenesis and resistance. *The Plant Journal* **46**(1): 14-33.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., et al.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**(6): 645-56.
- Underhill, D. M. und Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* **14**(1): 103-10.
- Van der Biezen, E. A. und Jones, J. D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**(12): 454-6.
- van Loon, L. C.** (1990). The nomenclature of pathogenesis-related proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**: 229-239.
- van Loon, L. C. und van Kammen, A.** (1970). Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**(2): 190-211.
- van Loon, L. C. und van Strien, E. A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97.
- van Wees, S. C., de Swart, E. A., van Pelt, J. A., van Loon, L. C. und Pieterse, C. M.** (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**(15): 8711-8716.

- VanEtten, H. D., Mansfield, J. W., Bailey, J. A. und Farmer, E. E.** (1994). Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *Plant Cell* **6**(9): 1191-1192.
- Vorwerk, S., Somerville, S. und Somerville, C.** (2004). The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends in Plant Science* **9**(4): 203-9.
- Walker, J.** (1993). Receptor-like protein kinase genes of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **3**(3): 451-456.
- Wang, G. L., Ruan, D. L., et al.** (1998). Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *Plant Cell* **10**(5): 765-79.
- Wang, X. und Chory, J.** (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* **313**(5790): 1118-22.
- Wang, X., Goshe, M. B., et al.** (2005a). Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the *Arabidopsis* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* **17**(6): 1685-703.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T. und Chory, J.** (2005b). Autoregulation and Homodimerization Are Involved in the Activation of the Plant Steroid Receptor BRI1. *Developmental Cell* **8**(6): 855-865.
- Wang, X., Zafian, P., Choudhary, M. und Lawton, M.** (1996). The PR5K receptor protein kinase from *Arabidopsis thaliana* is structurally related to a family of plant defense proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**(6): 2598-602.
- Wang, Z. Y., Seto, H., Fujioka, S., Yoshida, S. und Chory, J.** (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* **410**(6826): 380-3.
- Ward, E. R., Uknes, S. J., Williams, S. C., Dincher, S. S., Wiederhold, D. L., Alexander, D. C., Ahl-Goy, P., Metraux, J. P. und Ryals, J. A.** (1991). Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **3**(10): 1085-1094.
- Wendehenne, D., Lamotte, O., Frachisse, J. M., Barbier-Brygoo, H. und Pugin, A.** (2002). Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**(8): 1937-51.
- Whalen, M. C., Innes, R. W., Bent, A. F. und Staskawicz, B. J.** (1991). Identification of *Pseudomonas syringae* Pathogens of *Arabidopsis* and a Bacterial Locus Determining Avirulence on Both *Arabidopsis* and Soybean. *Plant Cell* **3**(1): 49-59.
- Whippo, C. W. und Hangarter, R. P.** (2005). A Brassinosteroid-Hypersensitive Mutant of BAK1 Indicates That a Convergence of Photomorphogenic and Hormonal Signaling Modulates Phototropism. *Plant Physiology* **139**(1): 448-457.
- Whitbred, J. M. und Schuler, M. A.** (2000). Molecular Characterization of CYP73A9 and CYP82A1 P450 Genes Involved in Plant Defense in Pea. *Plant Physiology* **124**(1): 47-58.
- Woody, S. T., Austin-Phillips, S., Amasino, R. M. und Krysan, P. J.** (2006). The WiscDsLox T-DNA collection: an *Arabidopsis* community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *Journal of Plant Research*.
- Wu, S. J., Ding, L. und Zhu, J. K.** (1996). SOS1, a Genetic Locus Essential for Salt Tolerance and Potassium Acquisition. *Plant Cell* **8**(4): 617-627.

- Xiang, T., Zong, N., et al.** (2008). Pseudomonas syringae effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Current Biology* **18**(1): 74-80.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. und Shinozaki, K.** (1994). A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**(2): 251-64.
- Yeats, T. H. und Rose, J. K. C.** (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* **17**(2): 191-198.
- Yin, Y., Vafeados, D., Tao, Y., Yoshida, S., Asami, T. und Chory, J.** (2005). A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* **120**(2): 249-59.
- Yu, I. C., Parker, J. und Bent, A. F.** (1998). Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in Arabidopsis dnd1 mutant. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(13): 7819-24.
- Zhang, S. und Klessig, D. F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**(11): 520-7.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. und Scheel, D.** (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**(6): 2751-5.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D., Boller, T. und Felix, G.** (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**(4): 749-60.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D., Felix, G. und Boller, T.** (2004). Bacterial disease resistance in Arabidopsis through flagellin perception. *Nature* **428**(6984): 764-7.

## 7 ANHANG

### 7.1 Verwendete Primer

Tabelle 7.1.1: verwendete Primer

Primername	Sequenz	verwendete T <sub>anneal</sub>
a2-N580404	TCATTCTCTG CTTCATTCTA ACTC	59 °C
a2-N591274	CAATAATGTTCTAGAAGGACCGC	62 °C
ACS6-frw	GCACGCTGAGATAACCACCG	57 °C
ACS6-rew	TAAGTCTGTGCACGGACTAGC	57 °C
attB1At1g66830-5'	AAAAAGCAGGCTCCGAGATGTCTCAGTTATTTCTCAT	55 °C
attB1At1g66830-KD	AAAAAGCAGGCTTCGACCTCGACCAGCTTCTAAAAGCC	63 °C
attB1At1g66830-P	AAAAAGCAGGCTGTTATCTTGTGGAAGTGAGAGTAAG	60 °C
attB1At5g25930-5K	AAAAAGCAGGCTTCACCATGACTCGTTTACCCTTA	45 °C
attB1At5g25930-KD	AAAAAGCAGGCTTTCATAGAGTAGATTTTGCGGAATCCG	45 bzw. 61 °C
attB1At5g25930-P	AAAAAGCAGGCTCAAGACTTTTGGGCAACTGGTCTTC	45 °C
attB2At1g66830-MS	AGAAAGCTGGGTCTTAAATAGAAGTTACCAATTTCTCG	60 bzw. 63 °C
attB2At1g66830-OS	AGAAAGCTGGGTCAATAGAAGTTACCAATTTCTCG	55 C
attB2At5g25930-ee	AGAAAGCTGGGTCTTAACTAGTAGAGGTGCCTCATATGC	61 °C
attB2At5g25930-MS	AGAAAGCTGGGTCTTAACTAAATCTTCATCTTCTACCC	45 °C
attB2At5g25930-OS	AGAAAGCTGGGTCTACAAAACCTAAATC	45 °C
At1g66830-5'	GTTACCAATTTCTCGAAGCTCTC	56 °C
At1g66830-KD3	GACCTCGACCAGCTTCTAAAAGCC	62 °C
At1g66830-ver1	GGTAGACCTGGTAGCGTGTTCATG	56 °C
At1g66830-ver3	CATGACACGCTACCAGGTCTACC	62 °C
At5g25930-frw	TCATACATAGAGATGTCAAGTCG	56 °C
At5g25930-rev	AGATTGGTAATGTTTCCATGACC	56 °C
attB1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	45 bzw. 55 °C
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	45 bzw. 55 °C
b-N580404	CAAGCTTTGAAGCCCTTTAAGTC	59 °C
b-N856397	CTCTTCACTGCCACACATTGTCCC	62 °C
Cf-like-frw	ATGTCAAAGGCGCTTTTG	53 °C
Cf-like-rev	AGCCTAGATGAGGTAGAGG	53 °C
EF-1α s	TCACATCAACATTGTGGTCATTGG	57 °C
EF-1α as	TTGATCTGGTCAAGAGCCTCAAG	57 °C
GC 248	GACGCACAATCCCCTATCCTTCG	58 °C
Hyg_cds-f	CGCAAGGAATCGGTCAATACACTA	60 °C
Hyg_cds-r	ACTTCTACACAGCCATCGGTCCAG	60 °C
Lba1	TGGTTCACGTAGTGGCCATCG	54-60 °C
LTP-frw	ATCCAGTTGGGACAGCCATCCT	57 °C
LTP-rev	GCACATTGGAACCAGATGGAAG	57 °C
NDR1-start	AATGAATAATCAAAATGAAGACACAG	53 °C
NDR1-OS	ACGAATAGCAAAGAATACGAG	53 °C

Primername	Sequenz	verwendete T <sub>anneal</sub>
p745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	62 °C
pDONR201-frw	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	61 °C
pDONR201-rev	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	55 °C
PR1-s	TCGTCTTTGTAGCTCTTGTAGGTG	57 °C
PR1-as	TAGATTCTCGTAATCTCAGCTCT	57 °C
PR5-frw	ATGGCAAATATCTCCAGT	54 °C
PR5-rev	TAAGGGCAGAAAGTGATTTTC	54 °C
PTR3-frw	CATGATCGTCGCATCTGTCCAC	57 °C
PTR3-rev	CGAATCAGCCATACCCATTAG	57 °C
RIN4-start	CATGGCACGTTCGAATGTAC	56 °C
RIN4-OS	TCCTCCAAAGCCAAAGCAGCAAC	56 °C
RLK5-frw	CTTCGGCGAGTCAGACGGT	57 °C
RLK5-rev	TAGACTGATCTGAATCAAGCG	57 °C
RPM1-5'	ACCTTGTTATTGTGTCAGGAGTCC	58 °C
RPM1-3'	CCTCTTCGACTGCAAATACTCC	58 °C
RPM1-start	GATGGCTTCGGCTACTGTTGA	54 °C
RPM1-OS	AGATGAGAGGCTCACATAG	54 °C
T for L	CTGATGGGCTGCCTGTATC	58 °C

## 7.2 Sonden für die DNA Hybridisierung

### 7.2.1 SALK Southern-Sonde

T for L →

```

1  CTGATGGGCT GCCTGTATCG AGTGGTGATT TTGTGCCGAG CTGCCGGTCG GGGAGCTGTT
61 GGCTGGCTGG TGGCAGGATA TATTGTGGTG TAAACAAATT GACGCTTAGA CAACTTAATA
121 ACACATTGCG GACGTTTTTA ATGTACTGGG GTGGTTTTTC TTTTCACCAG TGAGACGGGG
181 AACAGCTGAT TGCCCTTCAC CGCCTGGCCC TGAGAGAGTT GCAGCAAGCG GTCCACGCTG
241 GTTTGCCCCA GCAGGCGAAA ATCCTGTTTG ATGGTGGTTC CGAAATCGGC AAAATCCCTT
301 ATAAATCAAA AGAATAGCCC GAGATAGGGT TGAGTGTTGT TCCAGTTTGG AACAGAGTC
361 CACTATTAAA GAACGTGGAC TCCAACGTCA AAGGGCGAAA AACCCTCTAT CAGGGCGATG
421 GCCCACTACG TGAACCATCA CCCAAATCAA GTTTTTTGGG GTCGAGGTGC CGTAAAGCAC
481 TAAATCGGAA CCCTAAAGGG AGCCCCGAT TTAGAGCTTG ACGGGGAAAG CCGGCGAACG
541 TGGCGAGAAA GGAAGGAAG AAAGCGAAAG GAGCGGGCGC CATTGAGGCT GCGCAACTGT
601 TGGGAAGGCG GATCGGTGCG GGCCTCTTCG CTATTACGCC AGCTGGCGAA AGGGGGATGT
661 GCTGCAAGGC GATTAAGTTG GGTAACGCCA GGGTTTTCCC AGTCACGACG TTGTAAAACG
721 ACGGCCAGTG AATTCCTGAT CTAGTAACAT AGATGACACC GCGCGCGATA ATTTATCCTA
781 GTTTGCGCGC TATATTTTGT TTTCTATCGC GTATTAAATG TATAATTGCG GGA CTCTAAT
841 CATAAAAACC CATCTCATAA ATAACGTCAT GCATTACATG TTAATTATTA CATGCTTAAC
901 GTAATTCAAC AGAAATTATA TGATAATCAT CGCAAGACCG GCAACAGGAT TCAATCTTAA
961 GAAACTTTAT TGCCAAATGT TTGAACGATC GGGGAAATTC GAGCTCGGTA CCCGGGGATC
1001 CTCTAGAGTC CCCCCTGTTC TCTCCAAATG AAATGAACTT CCTTATATAG AGGAAGGGTC
← GC248
1051 TTGCGAAGGA TAGTGGGATT GTGCGTC

```

Abbildung 7.2.1: SALK Southern-Sonde

Die zur Amplifikation der Sonde verwendeten Primer (Tabelle 7.1.1) wurden unterstrichen.

## 7.2.2 DSLox Southern-Sonde

```

                                Hyg_cds-f →
1  CGCAAGGAAT CGGTCAATAC ACTACATGGC GTGATTCAT ATGCGCGATT
51 GCTGATCCCC ATGTGTATCA CTGGCAAAC TGTATGGACG ACACCGTCAG
101 TCGTCCGTC GCGCAGGCTC TCGATGAGCT GATGCTTTGG GCCGAGGACT
151 GCCCCGAAGT CCGGCACCTC GTGCACGCGG ATTTCCGGCTC CAACAATGTC
201 CTGACGGACA ATGGCCGCAT AACAGCGGTC ATTGACTGGA GCGAGGCGAT
251 GTTCGGGGAT TCCAATACG AGGTCGCCAA CATCTTCTTC TGGAGGCCGT
301 GGTGGCTTG TATGGAGCAG CAGACGCGCT ACTTCGAGCG GAGGCATCCG
351 GAGCTTGCAG GATCGCCGCG GCTCCGGGCG TATATGCTCC GCATTGGTCT
401 TGACCAACTC TATCAGAGCT TGGTTGACGG CAATTTGAT GATGCAGCTT
451 GGGCGCAGGG TCGATGCGAC GCAATCGTCC GATCCGGAGC CGGGACTGTC

                                ← Hyg_cds-r
501 GGGCGTACAC AAATCGCCCC CAGAAGCGCG GCCGTCTGGA CCGATGGCTG
551 TGTAGAAGT

```

Abbildung 7.2.2: DSLox Southern-Sonde

Die zur Amplifikation der Sonde verwendeten Primer (Tabelle 7.1.1) wurden unterstrichen.

## 7.3 DRK5-Sequenzen

### 7.3.1 DRK5-Promotor

```

-1113 TGTTAAGTTT CACATTGTTT TTAGCTTGTA AGTGATTTAT TTGTTTTGTA
-1063 TTTTTGTTAT TTTTTGATAA TAAAAAATG ATGTATTTAT GTAGACTTTA
-1013 GGTGTATATT AATGAAAATA ATGTATTGCA TTGTATAAGA GTCAGGTAAA
-963 TTTTTTCATA TTTGATTTTG GTAATTTGAA TGGTTTATAT CGAACTAGAA
-913 CCAACAAATT TCATACATTGA CCAGCCGTTG ATAAAAGAAA TTTTGGCATA
-863 AACTATATTA TAGACACACA AATCAAAGTA AATTAAAGTA AAAACGAATT
-813 TAATTGTAAA GAATGAATCA TATTCATATT TTAAAAAATA CAAAATTATG
-763 TACTTGTATC TTTTTTTTCT GGTCAACTAG AAATACATAA AAGATTACCG
-713 GCTAAGCTAA TTTGTACCAC AAACGTCTAC AAAATTTTTT ATAAATTTAT
-663 GTTTTATATT TTAAATTAAA TGCTCCTCGA AATAATATTT TGCTAATGTT
-613 AAAACCAAA TAACTATAA AATTATGCAA CAATCATAGT AGAAATGTTT
-563 GGCATGACT CATAAAATTC ACACAAGTAA TATTATTGTT TTCATATATT
-513 TTTCCGACAA ATGTTAACTC TTTTCCCCCA AACTAGTTAT ATTTGTCTCA
-463 GACTCCAAAA CAGAAACAAA CAATCTAGAA GTAAACTAGA GTACAAATCA
-413 AATCGAAACG AAAAACTTAA ATTGACCGGC ACAACAATAA TTCTGGTGGA
-363 GATTGACTT TAGGATTTGG AAGTAAAATT GTCAATACAT TACCCACCA
-313 CTAACATAAC AACTAGAAAC TAGAAAAGCT ATTCCTCATT ACCTTACGTG
-263 TCCCTACTG TTTCAATTAT AGCCTCAATC ATCGCTAATT CCATTGACAT
-213 GTAAATGAGG TATATACAAT TTGTTTGATG CATGAATTTA GATATAAGTT
-163 TCTTCAACA TATAAATATC TTCAAAAAAT TTAGAATTGA TAAGAAGTTA
-113 AACTGTGA CTTGATTGAA AACTAGGCCA GTCCAAGCTA TATAACACT
-63 AATTTCTTGG AGATATTTAG GAGCCAAACT TTACTCAATT CAGAATTGTG
-13 TCTCTCTTTA GAGATG

```

Abbildung 7.3.1: Promotorsequenz des DRK5-Gens

Dabei wurden die durch das *PLACE signal scan* Programm (Higo *et al.* 1999) vorhergesagten W-Boxen [(T)(T)TGAC(C/T)] wurden unterstrichen und deren Kernmotive [TAGC] fett markiert. Das ABA-responsive Promotor Element [TACGTGTC] wurde fett kursiv gekennzeichnet.



**7.3.2 DRK5-Gensequenz**

```

                                     attB1At1g66830-5' →
-34 tttactcaat tcagaattgt gtctctcttt agagATGTCT CAGTTATTTTC TCATTCTCTG
      a2-N580404 →                drk5 →
 27 CTTCATTCTA ACTCATTCTTTGCC∇ATAGCCACTTCTCTA AACGATCAAG GTCTTGCTCT
 87 TCTTTCCTTT AAACAATCCA TACAAAACCA GAGTGACTCT GTTTTTACCA ATTGGAAGCTC
147 TTCAGATTCA AACCCTTGTT CTTGGCAAGG TGTACATGT AATTATGATA TGAGAGTTGT
207 CTCGATTTCGTT CTTCTAATA AACGTCTTTC GGGTTCTCTT GATCCATCCA TTGGAAGTCT
267 CTTGTCCCTT CGTCACATTA ACCTAAGAGA CAATGACTTT CAAGGGAAGT TACCTGTGGA
      ← b-N580404
327 ACTCTTTGGA CTTAAAGGGC TTCAAAGCTT GGTGCTTTCT GAAATTCTT TTTCCGGGTT
387 TGTCCCAGAA GAGATTGGTA GCTTGAAGAG TCTAATGACT CTGGATCTTT CGGAGAATTC
447 TTTCAACGGT TCGATTTCTT TGTGCTTAT TCCATGCAAG AAGCTGAAAA CGCTTGTTCT
507 TAGCAAGAAC AGTTTCTCTG GAGATCTTCC AACAGGTTA GGTCTAACT TGGTTCATCT
567 TCGGACACTG AATCTTTCTT TCAATCGCTT GACTGGAACG ATCCCCGAAG ATGTAGGAAG
627 TCTGGAGAAT CTGAAAGGTA CACTTGATCT TTCTCATAAC TTCTTCTCAG GTATGATTCC
687 AACAAGTCTT GGAAATCTCC CTGAGCTTCT CTATGTCGAT CTTTCTTACA ATAATCTCAG
747 TGGTCCGATA CCAAATTC ACGTTCTGTT GAATGCCGGT CCAAATGCTT TCCAAGGGAA
807 CCCTTTCCTC TGTGGATTAC CGATAAAGAT TTCTTGCAGC ACAAGAAAA CACAAGTAGT
867 TCCTTCTCAA CTATATACAA GAAGAGCCAA CCATCATTTCT AGACTCTGCA TCATCCTTAC
927 AGCCACTGGA GGCACAGTCG CCGGAATCAT TTTTCTTGCT TCATTATTCA TCTACTATCT
987 CCGAAAAGCA TCGGCTCGTG CAAACAAAGA TCAAAAACAAC CGAACATGTC ATATAAACGA
1047 GAAACTGAA AAGACGACAA AGCCAGAGTT TCTCTGTTTC AAGACTGGGA ATTCAGAATC
1107 TGAACGCATA GATGAGAACA AAAATCAACA AGTTTTCATG CCAATGGACC CGGAAATCGA
      attB1At1g66830-KD →
1167 ATTTGACCTC GACCAGCTTC TAAAAGCCTC GGCTTTTCTT CTAGGGAAGA GCAGGATCGG
1227 GCTTGTGTAC AAGGTAGTTC TTGAAAATGG ATTAATGTTA GCCGTTAGAC GATTAGAAGA
1287 TAAAGGTTGG CTACGGCTCA AAGAGTTTCT AGCTGATGTC GAAGCAATGG CGAAAATCAA
1347 GCACCCTAAT GTCTTGAATC TCAAGGCTTG TTGCTGGTCT CCTGAAGAGA AACTCCTGAT
1407 TTATGATTAC ATACCAAATG GTGACCTTGG TTCTGCAATT CAAGgtaatt ttagtgtcaa
1467 aatcgcataa atctatgacc atagttaaga ttcaagactg attcataaaa atttatgaca
      ← At1g66830-ver3/-1 →
1527 gGTAGACCTG GTAGCGTGTC ATGCAAGCAA CTAACCTGGA CGGTCCGGTT AAAAAATATTG
1587 AGAGGAATAG CAAAAGGATT AACTTATATT CATGAGTTTA GTCCCAAAAG GTATGTCCAT
1647 GGACATATAA ACACAAGCAA CATACTTCTA GGACCGAATC TTGAACCGAA AGTATCCGGT
1707 TTCGGTCTAG GTCGTATCGT CGACACGTCT TCAGATATCA GATCAGACCA AATCTCTCCC
1767 ATGGAGACAA GCTCACCAAT CCTCTCTAGA GAATCATATT ACCAAGCTCC TGAAGCAGCT
1827 TCAAAAATGA CTAACCCTGTC TCAGAAATGG GATGTGTATT CATTCCGTTT AGTGATACTC
1887 GAAATGGTAA CCGGAAAATC TCCGGTTAGT TCAGAAATGG ATTTGGTTAT GTGGGTTGAA
1947 TCGGCTAGTG AGAGAAATAA ACCGGCTTGG TATGTTCTTG ATCCGGTTTT AGCTCGTGAT
2007 AGAGATTTGG AAGATAGTAT GGTTC AAGTCA ATCAAGATCG GTTTAGCTTG TGTGCAGAAG
      ← At1g66830-5'
2067 AACCCAGATA AAAGACCACA CATGAGAAGT GTATTGGAGA GCTTCGAGAA ATTGGTAACT
← attB1At1g66830-MS/OS
2107 TCTATTTAA

```

**Abbildung 7.3.2: DRK5-Gensequenz**

Die kodierende Sequenz ist in Großbuchstaben, die nichtkodierenden Bereiche in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Sequenzen für die Bindung der angegebenen Primer (Tabelle 7.1.1) ist unterstrichen. Die Position der T-DNA-Insertion ist durch „∇“ markiert und mit der dazugehörigen Linie beschriftet worden. Pfeile stellen die Orientierung der Primer bzw. der T-DNA-Insertion dar.

### 7.3.3 DRK5-Proteinsequenz

```

1  MSQLFLILCF  ILTHFFAIAT  SLNDQGLALL  SFKQSIQNQS  DSVFTNWNSS  DSNPCSWQGV
61 TCNYDMRVVS  IRLPNKRLSG  SLDPSIGSLL  SLRHINLRDN  DFQGKLPVEL  FGLKGLQSLV
121 LSGNSFSGFV  PEEIGSLKSL  MTLDLSENSF  NGSISLSLIP  CKKLKTLVLS  KNSFSGDLPT
181 GLGSNLVHLR  TLNLSFNRLT  GTIPEDVGS  ENLKGTLDLS  HNFSGMIPT  SLGNLPELLY
241 VDLSYNNLSG  PIPKFNVLLN  AGPNAFQGNP  FLCGLPIKIS  CSTRNTQVVP  SLYTRRANH
301 HSRLCIILTA  TGGTVAGIIF  LASLFIYYLR  KASARANKDQ  NNRTCHINEK  LKKTTPPEFL
361 CFKTGNSESE  TLDENKNQQV  FMPMDPEIEF  DLQLLKASA  FLLGKSRIGL  VYKVVLENGL
421 MLAVRLEDEK  GWLRLKEFLA  DVEAMAKIKH  PNVNLNKACC  WSPEEKLIY  DYIPNGDLGS
481 AIQGRPGSVS  CKQLTWTVRL  KILRGIAGKL  TYIHEFSPKR  YVHGINTSN  ILLGPNLEPK
541 VSGFGLGRIV  DTSSDIRSDQ  ISPMETSSPI  LSRESYYQAP  EAASKMTKPS  QKWDVYSFGL
601 VILEMVTGKS  PVSSEMDLVM  WVESASERNK  PAWYVLDPVL  ARDRLEDSM  VQVIKIGLAC
661 VQKNPDKRPH  MRSVLESFEK  LVTSI

```

Abbildung 7.3.3: DRK5-Proteinsequenz mit vorhergesagter Domänenstruktur

Dargestellt ist die Gesamtsequenz der DRK5 mit Unterscheidung von Signalpeptid (kursiv), LRR-Domäne (unterstrichen), Transmembrandomäne (grau), Kinasedomäne (fett).

## 7.4 DRK6

### 7.4.1 DRK6-Gensequenz

```

                                a2-N591274 →
-581 aatttgcca ataatgttct agaaggaccg catatcatat gattagtcatt tattggtgct
-521 taacggagac tctgtttttt gccaaattga aagttttaga tttcatgctt agataagagt
-461 gatgttttaa aacatatattg aaaccaaagt tccaaactaa taccattagt aaaaatcatt
-401 tacttataag ttataagccc tcgtcatggc ccattttaca tggttttgga ttttagatcg
-341 taaagagaat acaacaaaac tgtagacaaa acgaaatcaa aatttcgaat caaaaagttg
-281 tactgtgata gtatataagt aactaatcgt caaatgtgta tccagttaaa atcgtcacat
-221 atgtagatac aatgacgtaa tgagtaccca aacatcaaat ctctattttt attacaaaaa
-161 aaaaaaacac atctcatcga tgacttcacc tactcttctc tataaagact tgaaaaaac

                                ← drk6-1
-101 ttgaaaactt cttcaaagtt tgtatccatt tcacattcac agtcaaact∇cggttgccga
                                attB1At5g25930-5K →
-41 agaaatttcc cggcaaaaacc tcaacaaaca aaaattagag aATGACTCGT TTACCCTTAC
 20 CTTTCCTTTT CTTCTTCCTC ACGTCAATAC CTTTATCTGT CTTTTCGCAG TTCAACGACC
 80 AGTCAACGCT TCTGAACCTG AAACGCGATC TCGGAGATCC ACCGTCTCTC CGGCTGTGGA
140 ACAACACATC TTCACCGTGC AACTGGTCGG AGATCACTTG CACCGCCGGA AATGTCACCG
200 GGATCAATTT CAAGAACCAG AACTTCACTG GGACAGTTCC AACGACGATA TGCGATTTGT
260 CGAATCTCAA TTTCCTTGAC TTATCGTTTA ATTACTTCGC CGGCGAGTTT CCGACGGTTC
320 TTTACAATTG CACGAAGCTT CAATATCTCG ATCTCTCTCA GAACCTTCTC AACGGCTCAC
380 TTCCCGTCGA CATCGACCGT CTCTACCCGG AACTCGACTA TCTCGACTTA GCTGCTAACG
440 GATTCTCCGG CGATATCCCT AAAAGTCTCG GACGGATCTC GAAGCTCAAG GTATTGAATC

                                ← b-N591274
500 TGTACCAGAG CGAATACGAC GGTACGTTTC CATCGGAGAT CGGAGACTTA TCGGAGCTTG
560 AAGAACTTCG ACTAGCGTTA AACGATAAGT TTAAGTCCGGC TAAGATTCCG ATAGAGTTTG
620 GGAAGTTGAA GAAACTCAAG TATATGTGGT TAGAGGAGAT GAATTTGATC GGAGAAATCT
680 ACCCGTTGTT TTCGAAAACA TGACGGATCT TGAGCACGTT GACTTATCGG TCAATAACTT
740 AACGGGTCGG ATCCAGATG TTTTATTCGG GTTGAAGAAT CTCACCGAGT TTTATCTCTT
800 CGCTAATGGC TTAACCGGAG AAATCCCCAA ATCAATTTTCG GCGACGAAC TGGTATTTCT
860 TGATCTCTCT GCTAATAAAT TAACCGGTTT GATTCCGGTA TCAATCGGAA ATCTAACGAA
920 ATTACAAGTG TTAAACCTCT TCAACAACAA GTTAACCGGA GAAATTCAC CGGTTATCGG

```

```

980 AAAACTACCG GGATTGAAGG AGTTTAAAAAT CTTCAACAAC AAGTTAACCG GAGAAATACC
                                     ← drk6-2
1040 TGCAGAGATT GGAGTTCATT CAAAGCTGGA GAGATTCGAAGTTTCGGAGA∇ATCAGTTAAC
1100 CCGAAAGTTA CCGGAAAATT TGTGCAAAGG TGGTAAACTT CAAGGAGTGG TTGTGTACTC
1160 AAACAATCTT ACCGGAGAAA TCCCTGAGTC GCTCGGAGAT TGTGGAACGC TCTTGACTGT
1220 TCAGTTACAG AACAATGACT TCTCCGGCAA GTTTCCTTCT CGGATCTGGA ATGCTTCAAG
1280 TATGTATAGT CTACAGGTGA GTAACAACCTC ATTCACCGGA GAGTTACCGG AGAATGTTGC
1340 TTGGAATATG TCGAGGATCG AGATTGATAA CAATCGATTT TCCGGTGAGA TTCCGAAGAA
1400 AATCGGTACT TGGTCTTCCT TAGTTGAGTT TAAGGCGGGA AACAATCAGT TTTCTGGTGA
1460 GTTTCCGAAG GAATTGACTT CTCTTTCGAA TCTCATATCG ATCTTTCTCG ATGAGAATGA
1520 TCTCACCGGT GAATTACCGG ATGAGATCAT CTCATGGAAG TCGTTGATAA CGTTAAGTTT
1580 ATCCAAGAAC AAGCTTTCCG GGGAAATTCG GAGAGCTTTA GGATTGTTGC CACGTCTGCT
1640 CAATCTTGAT CTATCGGAGA ATCAATTCTC CGGTGGAAATC CCACCGGAGA TTGGGAGCCT
1700 GAAGCTGACA ACATTTAATG TGTCATCAA TAGACTCACT GGAGGAATAC CAGAGCAACT
1760 TGATAATCTT GCTTACGAGA GAAGTTTCTT GAACAACCTCT AATCTTTGTG CAGACAACCC
1820 GGTTCCTCAGC TTACCGGATT GTCGGAAACA GCGCCGGGGA TCAAGAGGGT TCCCCGGGAA
1880 AATCCTCGCG ATGATTCTAG TCATCGCGGT TCTGCTTCTC ACCATTACTC TGTTTGTTAC
1940 GTTCTTTGTG GTTAGGGACT ACACAAGGAA ACAAAGAAGA AGAGGTCTAG AGACGTGGAA
                                     attB1At5g25930-KD →
2000 ACTCACTTCA TTTCATAGAG TAGATTTTGC GGAATCCGAC ATCGTGTCTGA ATCTGATGGA
2060 ACACTACGTG ATCGGTAGTG GCGGATCGGG CAAAGTTTAC AAGATTTTTCG TCGAAAGCTC
                                     ← b-N856397
2120 GGGACAATGT GTGGCAGTGA AGAGGATATG GGACAGCAAG AAACCTGGACC AGAAACTTGA
2180 GAAGGAGTTT ATTGCTGAAG TTGAGATTCT TGGAACGATC AGGCACTCGA ATATAGTGAA
2240 ACTATTGTGT TGTATCTCAA GGGAAAGATTC AAAGCTTCTA GTGTATGAGT ATCTCGAGAA
2300 ACGCAGTCTT GATCAATGGT TACATGGAAA GAAGAAGGGA GGTACCGTAG AGGCTAATAA
2360 CCTTACATGG TCACAGAGGT TGAATATCGC AGTTGGAGCA GCTCAAGGAC TTTGCTATAT
                                     At5g25930-frw →
2420 GCATCATGAT TGTACTCCCG CAATCATAACA TAGAGATGTC AAGTCCGAGTA ACATCTTGCT
2480 TGATTCTGAA TTCAACGCGA AGATTGCAGA TTTCCGGGTTG GCTAAACTGT TGATTAAGCA
2540 AAACCAAGAA CCTCATAACA TGTCAGCTGT TGCTGGATCC TTTGGTTACA TTGCTCCAGg
2600 taatacccgt aaacaaaaaa cattcttttag agtcgaatag agtcgctcat tgtgtgatct
2660 ctaatatt tatgttgcag AATACGCATA TACGTCAAAG GTAGATGAGA AGATCGATGT
2720 GTACAGCTTC GGGGTAGTTT TGCTAGAGCT GGTGACTGGA AGAGAAGGAA ACAACGGAGA
                                     ← At5g25930-rev
2780 TGAACACACA AACTTAGCAG ATTGGTCATG GAAACATTAC CAATCTGGAA AACCGACCGC
2840 AGAGGCGTTT GATGAGGACA TCAAAGAAGC TTCCACGACT GAGGCGATGA CAACAGTTTT
2900 CAAGCTAGGT CTCATGTGTA CTAACACATT GCCTAGTCAT AGACCTTCCA TGAAAGAGGT
2960 CTTGTATGTT CTGCGCCAAC AAGGACTTGA GGCGACGAAG AAGACTGCAA CAGAGGCATA
                                     ← attB1At5g25930-ee                                     ← attB1At5g25930-MS/OS
3020 TGAGGCACCT CTACTAGTTA GTTTATCGGG TCGAAGGACA AGTAAAAGGG TAGAAGATGA
3070 AGATTTAGGT TTGTATAA

```

#### Abbildung 7.4.1: DRK6-Gensequenz

Die kodierende Sequenz ist in Großbuchstaben, die nichtkodierenden Bereiche in Kleinbuchstaben geschrieben. Die Sequenzen für die Bindung der angegebenen Primer (Tabelle 7.1.1) ist unterstrichen. Die Position der T-DNA-Insertionen ist durch „<sup>∇</sup>“ markiert und mit der dazugehörigen Linie beschriftet worden. Pfeile stellen die Orientierung der Primer bzw. der T-DNA-Insertion dar.

## 7.4.2 DRK6-Proteinsequenz

```

1  MTRLPLPFLF  FFLTSIPLSV  FSQFNDQSTL  LNLKRDLDGP  PSLRLWNNTS  SPCNWSEITC
61  TAGNVTGINF  KNQNFVTGVP  TTICDLSNLN  FLDLSFNIFA  GEFPTVLYNC  TKLQYLDLSQ
121  NLLNGSLPVD  IDRLSPELDY  LDLAANGFSG  DIPKSLGRIS  KLKVLNLYQS  EYDGTFFPSEI
181  GDLSELEELR  LALNDKFTPA  KPIIEFGKLG  KLKYMWLEEM  NLIGEISPVV  FENMTDLEHV
241  DLSVNNLTGR  IPDVLFGKLN  LTEFYLFANG  LTGEIPKSI  ATNLVFLDLS  ANNLTGSIPV
301  SIGNLTKLQV  LNLFNKLTG  EIPPVIGKLP  GLKEFKIFNN  KLTGEIPAEI  GVHSKLERFE
361  VSENQLTGKL  PENLCKGGKL  QGVVVSNNL  TGEIPESLGD  CGTLLTVQLQ  NNDFSGKFPS
421  RIWNASSMYS  LQVSNNSFTG  ELPENVAWNM  SRIEIDNNRF  SGEIPKKIGT  WSSLVEFKAG
481  NNQFSGEFPK  ELTSLSNLIS  IFLDENDLTG  ELPDEIISWK  SLITLSLSKN  KLSGEIPRAL
541  GLLPRLNLD  LSENQFSGGI  PPEIGSLKLT  TFNVSNNRLT  GGIPEQLDNL  AYERSFLNNS
601  NLCADNPVLS  LPDCRQRRG  SRGFPGKILA  MILVIAVLLL  TITLFTVTFV  VRDYTRKQRR
661  RGLTQWKLTS  FHRVDFAESD  IVSNLMEHYV  IGGSGGKQV  KIFVSSGQC  VAVKRIWDSK
721  KLDQKLEKEF  IAEVEILGTI  RHSNIVKLLC  CISREDSKLL  VYEYLEKRSL  DQWLHGKKG
781  GTVEANNLTW  SQRLNIAVGA  AQGLCYMHHD  CTPAIIHRDV  KSSNILLDSE  FNAKIADFL
841  AKLLIKQOE  PHTMSAVAGS  FGYIAPEYAY  TSKVDEKIDV  YSFGVVLEL  VTGREGNNGD
901  EHTNLADWSW  KHYQSGKPTA  EAFDEDIKEA  STTEAMTTVF  KLGLMCTNTL  PSHRPSMKEV
961  LYVLRQGLE  ATKKTATEAY  EAPLLVSLSG  RRTSKRVEDE  DLGFV

```

**Abbildung 7.4.2: Proteinsequenz der DRK6 mit vorhergesagter Domänenstruktur**

Dargestellt ist die Gesamtsequenz der DRK6 mit Unterscheidung von Signalpeptid (kursiv), LRR-Domäne (unterstrichen), Transmembrandomäne (grau), Kinasedomäne (fett).

## 7.5 BAK1

**Tabelle 7.5.1: Liste der Gene, welche in unbehandelten *bak1-3*-Pflanzen unterschiedlich reguliert sind als in Col-0**

Grau unterlegt sind die Gene, welche sowohl in Tabelle 7.5.1 als auch in Tabelle 7.5.2 erscheinen. Mit „A“ markiert wurden Gene, welche ebenfalls nach *Alternaria*, mit „P“ welche auch nach *Pto* DC3000 und „B“ welche durch beide Pathogene ebenfalls in Col-0 reguliert werden. Die ebenfalls Brassinolid regulierten Gene wurden durch „BL“ gekennzeichnet.

Genname	Wert	AgI-Nummer	Beschreibung	
254265_S_AT	3,86	AT4G23140	receptor-like protein kinase 5 (RLK5)	P
259925_AT	3,26	AT1G75040	pathogenesis-related protein 5 (PR-5)	
249770_AT	3,22	AT5G24110	WRKY family transcription factor	
251625_AT	2,96	AT3G57260	glycosyl hydrolase family 17 protein	P
247882_AT	2,88	AT5G57785	expressed protein	BL
252346_AT	2,84	AT3G48650	pseudogene, At14a-related protein	
267546_AT	2,81	AT2G32680	disease resistance family protein	P
254818_AT	2,80	AT4G12470	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	P
251673_AT	2,76	AT3G57240	beta-1,3-glucanase (BG3)	
256442_AT	2,74	AT3G10930	expressed protein	
248932_AT	2,66	AT5G46050	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein	
254271_AT	2,60	AT4G23150	protein kinase family protein	P
246099_AT	2,60	AT5G20230	plastocyanin-like domain-containing protein	P
261021_AT	2,51	AT1G26380	FAD-binding domain-containing protein	A

Genname	Wert	AgI-Nummer	Beschreibung	
263216_S_AT	2,32	AT1G30720	FAD-binding domain-containing protein	P
251054_AT	2,28	AT5G01540	lectin protein kinase, putative	P
266070_AT	2,22	AT2G18660	expansin family protein (EXPR3)	
246368_AT	2,21	AT1G51890	leucine-rich repeat protein kinase, putative	B
252374_AT	2,20	AT3G48100	two-component responsive regulator / response regulator 5 (ARR5) / response reactor 2 (RR2)	
251677_AT	2,16	AT3G56980	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein	
253332_AT	2,15	AT4G33420	peroxidase, putative	
245840_AT	2,15	AT1G58420	expressed protein	P
257623_AT	2,12	AT3G26210	cytochrome P450 71B23, putative (CYP71B23)	
248062_AT	2,12	AT5G55450	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	
248970_AT	2,12	AT5G45380	Sodium:solute symporter family protein	
247314_AT	2,12	AT5G64000	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase, putative / inositol polyphosphate 1-phosphatase, putative	
256356_S_AT	2,11	AT1G66500	zinc finger (C2H2-type) family protein	P
264616_AT	2,10	AT2G17740	DC1 domain-containing protein	P
252131_AT	2,10	AT3G50930	AAA-type ATPase family protein	P
256337_AT	2,09	AT1G72060	expressed protein	
260754_AT	2,07	AT1G49000	expressed protein	P
255341_AT	2,06	AT4G04500	protein kinase family protein	
255807_AT	2,05	AT4G10270	wound-responsive family protein	
247406_AT	2,05	AT5G62920	two-component responsive regulator / response regulator 6 (ARR6)	P
254120_AT	2,02	AT4G24570	mitochondrial substrate carrier family protein	P
253046_AT	2,01	AT4G37370	cytochrome P450, putative	B
255340_AT	2,00	AT4G04490	protein kinase family protein	P
264434_AT	2,00	AT1G10340	ankyrin repeat family protein	
252114_AT	0,49	AT3G51450	strictosidine synthase family protein	
252265_AT	0,48	AT3G49620	2-oxoacid-dependent oxidase, putative (DIN11)	B, BL
254098_AT	0,47	AT4G25100	superoxide dismutase (Fe), chloroplast (SODB) / iron superoxide dismutase (FSD1)	
253338_AT	0,47	AT4G33430	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 (BAK1) / somatic embryogenesis receptor-like kinase 3 (SERK3)	
247573_AT	0,39	AT5G61160	transferase family protein	A
266415_AT	0,36	AT2G38530	nonspecific lipid transfer protein 2 (LTP2)	
259640_AT	0,35	AT1G52400	glycosyl hydrolase family 1 protein / beta-glucosidase, putative (BG1)	
265058_S_AT	0,31	AT1G52040	jacalin lectin family protein	P

**Tabelle 7.5.2: Liste der Gene, welche nach *Alternaria* Infektion in *bak1-3* unterschiedlich reguliert sind im Vergleich zu Col-0**

Grau unterlegt sind die Gene, welche sowohl in Tabelle 7.5.1 als auch in Tabelle 7.5.2 erscheinen.

Genname	Wert	AgI-Nummer	Beschreibung
245325_AT	6,24	AT4G14130	xyloglucan:xyloglycolsyl transferase, putative
252415_AT	4,80	AT3G47340	asparagine synthetase 1 (glutamine-hydrolyzing) / glutamine-dependent asparagine synthetase 1 (ASN1)
244998_AT	4,04	ATCG00180	RNA polymerase beta' subunit-1
244995_AT	3,43	ATCG00150	ATPase a subunit
253332_AT	3,06	AT4G33420	peroxidase, putative
245262_AT	2,97	AT4G16563	aspartyl protease family protein
244932_AT	2,92	ATCG01060	PSI 9KDa protein
245026_AT	2,82	ATCG00140	ATPase III subunit
244965_AT	2,82	ATCG00590	hypothetical protein
249454_AT	2,75	AT5G39520	expressed protein
244933_AT	2,71	ATCG01070	NADH dehydrogenase ND4L
244983_AT	2,63	ATCG00790	ribosomal protein L16
245007_AT	2,55	ATCG00350	PSI P700 apoprotein A1
257203_AT	2,48	AT3G23730	xyloglucan
255538_AT	2,47	AT4G01680	myb family transcription factor (MYB55)
251109_AT	2,32	AT5G01600	ferritin 1 (FER1)
265384_AT	2,32	AT2G20760	expressed protein
245048_AT	2,28	ATCG00040	orf within trnK intron orf within trnK intron
265111_AT	2,27	AT1G62510	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein
262212_AT	2,24	AT1G74890	two-component responsive regulator / response regulator 15 (ARR15)
252563_AT	2,20	AT3G45970	expansin family protein (EXPL1)
265387_AT	2,18	AT2G20670	expressed protein
261395_AT	2,18	AT1G79700	ovule development protein, putative
249895_AT	2,17	AT5G22500	acyl CoA reductase, putative / male-sterility protein, putative
263118_AT	2,14	AT1G03090	methylcrotonyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial / 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase 1 (MCCA)
244962_AT	2,12	ATCG01050	NADH dehydrogenase ND4
265885_AT	2,09	AT2G42330	D111/G-patch domain-containing protein
245008_AT	2,08	ATCG00360	hypothetical protein
265536_AT	2,08	AT2G15880	leucine-rich repeat family protein / extensin family protein
245757_AT	2,08	AT1G35140	phosphate-responsive protein, putative
256221_AT	2,07	AT1G56300	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein
262456_AT	2,06	AT1G11260	glucose transporter (STP1)
266139_AT	2,05	AT2G28085	auxin-responsive family protein
245000_AT	2,03	ATCG00210	hypothetical protein
249174_AT	2,02	AT5G42900	expressed protein
261658_AT	2,02	AT1G50040	expressed protein
258402_AT	2,01	AT3G15450	expressed protein
260944_AT	2,01	AT1G45130	beta-galactosidase, putative / lactase, putative
266884_AT	2,00	AT2G44790	uclacyanin II
248460_AT	0,50	AT5G50915	basic helix-loop-helix (bHLH) family protein
253203_AT	0,50	AT4G34710	arginine decarboxylase 2 (SPE2)
245242_AT	0,49	AT1G44446	chlorophyll a oxygenase (CAO) / chlorophyll b synthase
253229_AT	0,49	AT4G34660	SH3 domain-containing protein 2 (SH3P2)
253294_AT	0,48	AT4G33750	expressed protein
253212_S_AT	0,48	AT4G34890	xanthine dehydrogenase, putative

Genname	Wert	AgI-Nummer	Beschreibung
263852_AT	0,48	AT2G04450	MutT/nudix family protein
267147_AT	0,48	AT2G38240	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein
253324_AT	0,48	AT4G33940	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
253284_AT	0,48	AT4G34150	C2 domain-containing protein
253220_S_AT	0,47	AT4G34920	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase-related
253265_AT	0,47	AT4G34040	zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein
253276_AT	0,47	AT4G34050	caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, putative
253314_AT	0,46	AT4G33890	expressed protein
252073_AT	0,46	AT3G51750	expressed protein
253295_AT	0,46	AT4G33760	tRNA synthetase class II (D, K and N) family protein
253264_AT	0,45	AT4G33950	protein kinase, putative
253283_AT	0,45	AT4G34090	expressed protein
253317_AT	0,45	AT4G33960	expressed protein
253228_AT	0,45	AT4G34630	expressed protein
253268_S_AT	0,45	AT4G34135	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase family protein
253323_AT	0,44	AT4G33920	protein phosphatase 2C family protein / PP2C family protein
253206_AT	0,44	AT4G34640	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 / squalene synthase 1 (SQS1)
253205_AT	0,44	AT4G34490	cyclase-associated protein (cap1)
250942_AT	0,44	AT5G03350	legume lectin family protein
253202_AT	0,44	AT4G34555	40S ribosomal protein S25, putative
253237_AT	0,44	AT4G34240	aldehyde dehydrogenase (ALDH3)
253277_AT	0,44	AT4G34230	cinnamyl-alcohol dehydrogenase, putative
253306_AT	0,44	AT4G33650	dynammin-like protein 2a (ADL2a)
256603_AT	0,43	AT3G28270	expressed protein
253310_AT	0,43	AT4G33630	expressed protein
245035_AT	0,43	AT2G26400	acireductone dioxygenase (ARD/ARD') family protein
253208_AT	0,42	AT4G34820	expressed protein
253287_AT	0,42	AT4G34270	TIP41-like family protein
253351_AT	0,42	AT4G33700	CBS domain-containing protein
262883_AT	0,42	AT1G64780	ammonium transporter 1, member 2 (AMT1,2)
253303_AT	0,41	AT4G33780	expressed protein
262050_AT	0,41	AT1G80130	expressed protein
253245_AT	0,41	AT4G34590	bZIP transcription factor family protein
253234_AT	0,40	AT4G34265	expressed protein
265058_S_AT	0,39	AT1G52040	jacalin lectin family protein
253235_AT	0,39	AT4G34350	LytB family protein
246125_AT	0,38	AT5G19875	expressed protein
253308_AT	0,38	AT4G33680	aminotransferase class I and II family protein
253238_AT	0,38	AT4G34480	glycosyl hydrolase family 17 protein
249732_AT	0,37	AT5G24420	glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related
253209_AT	0,33	AT4G34830	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein
250933_AT	0,33	AT5G03170	fasciclin-like arabinogalactan-protein (FLA11)
253302_AT	0,32	AT4G33660	expressed protein
253233_AT	0,31	AT4G34290	SWIB complex BAF60b domain-containing protein
253305_AT	0,26	AT4G33666	expressed protein
262719_AT	0,24	AT1G43590	hypothetical protein
253338_AT	0,24	AT4G33430	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1 (BAK1) / somatic embryogenesis receptor-like kinase 3 (SERK3)
251770_AT	0,21	AT3G55970	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein

# DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Zeit von November 2004 bis April 2008 in der Abteilung für Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. Thorsten Nürnberger angefertigt.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei all den Personen bedanken, die mit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Bereitstellung des Themas und die optimalen Arbeitsbedingungen bei der Erstellung dieser Promotionsarbeit, sowie die stete Bereitschaft einer fachlichen Beratung. Außerdem möchte ich mich bei ihm und Prof. Dr. Klaus Harter für die Übernahme der Gutachten bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Birgit Kemmerling für die äußerst geduldige und kritische Betreuung, das in mich gesetzte Vertrauen sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung der Arbeit als Teil des AFGN-Projektes.

Herrn Dr. Hinch von der *Microarray Service Unit* des RZPD (Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH) danke ich für die zuverlässige und schnelle Anfertigung und Auswertung der *Microarrays*. Außerdem gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Georg Felix für die Einführung in die Ethylenmessung, die Bereitstellung der nötigen Geräte sowie anregende Gespräche.

Ich danke auch allen N's und F's, insbesondere dem Labor N2 und seinen Gästen: Sandra, Patricia, Kyoko, Mark, Susann, Christine und Sara für eine tolle Arbeitsatmosphäre.

Vielen lieben Dank auch meinen Eltern für ihre liebevolle Unterstützung aus weiter Ferne, trotz genügend eigener Probleme. Und nicht zuletzt möchte ich meinem Matthias für den Rückhalt in den letzten 9 Jahren, die Einführung ins Konfliktmanagement und die tiefen des Universums, sowie unzählige selbstgebackene Sonntagsbrötchen und Donauwellen danken.



**Meine akademischen Lehrer waren:**

Andreesen, Bonas, Breunig, Dorn, Faust, Fischer G., Friedemann, Gattermann, Golbik, Hartrodt, Hübner, Humbeck, Ihl, König, Klösger, Krause-Rehberg, Krauß, Langner, Lilie, Lindau, Mathiszik, Menge, Mrestani-Klaus, Neef, Neubert, Nies, Nürnberger, Reuter, Rudolph, Scheel, Schiene-Fischer, Schmidt H., Schneider, Schwarz, Stubbs, Tittmann, Ulbrich-Hofmann, Wahle, Wasternack, Weinandy, Weissflog

## Lebenslauf

### Anne Schwedt

---

Geburtsdatum/-ort 17.05.1980 in Wittenberg (Lutherstadt)  
Staatsangehörigkeit Deutsch  
Familienstand Ledig

### Schulbildung

---

1986-1987 30. Polytechnische Oberschule in Cottbus  
1987-1988 DDR-Botschaftsschule in Athen (Griechenland)  
1988-1992 30. Polytechnische Oberschule (spätere 11. Gesamtschule) in Cottbus  
1992-1999 1. Gymnasium (Heinrich-Heine) in Cottbus  
Abschluss allgemeine Hochschulreife

### Hochschulbildung

---

10/1999-08/2004 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abschlüsse: Vordiplom Biochemie 09/2001  
Diplom Biochemie 04/2008  
02/2000 Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes  
11/2003-08/2004 Diplomarbeit unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale bzw. ab 01/2004 in der Abteilung Pflanzenbiochemie des Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Titel der Arbeit: Molekulare Charakterisierung einer Rezeptor-kinase aus *Arabidopsis thaliana*  
09/2004-04/2008 Promotion in der Abteilung Pflanzenbiochemie des Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
Titel der Arbeit: Molekulare Charakterisierung ausgewählter pathogenresponsiver Rezeptorkinasen aus *Arabidopsis thaliana*.