

**Molekulare und physiologische Charakterisierung der
Wirkung des *Phytophthora infestans* RXLR-Effektors
PiAVR2 auf PAMP- und BR-Signalwege**

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Christiane Jäntsch
aus Gera

Tübingen
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

04.06.2020

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Klaus Harter

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	11
1.1 Die Pflanzliche Immunabwehr	11
1.1.1 PAMP-induzierte Immunität (<i>PAMP-triggered immunity</i> , PTI).....	13
1.1.2 Effektor-induzierte Suszeptibilität (<i>effector-triggered susceptibility</i> , ETS).....	13
1.1.3 Effektor-induzierte Immunität (<i>effector-triggered immunity</i> , ETI)	14
1.1.4 Hormone in der Immunität	15
1.1.5 Brassinosteroid in der pflanzlichen Immunität	19
1.2 Der Brassinosteroid-Signalweg	21
1.3 <i>P. infestans</i> , der Auslöser der Kraut- und Knollenfäule.....	24
1.4 Effektoren von pflanzlichen Pathogenen	26
1.4.1 Allgemeines.....	26
1.4.2 Effektoren von Oomyceten	27
1.5 Ziel der Arbeit	32
2 Material und Methoden	33
2.1 Material	33
2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	33
2.1.2 Nährmedien	33
2.1.3 Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen	34
2.1.4 Verwendete Plasmide	35
2.1.5 Verwendetes Pflanzenmaterial	36
2.2 Anzuchsbedingungen	36
2.2.1 Anzucht von <i>E.coli</i>	36
2.2.2 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	36
2.2.3 Anzucht von <i>A. thaliana</i> Zellkulturen.....	36
2.2.4 Anzucht der Versuchspflanzen.....	36
2.3 Transformationen	37
2.3.1 Transformation von <i>E.coli</i>	37
2.3.2 Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	37
2.3.3 Transformation von <i>A. thaliana</i> Zellkultur-Protoplasten	37
2.3.4 Transformation von <i>A. thaliana</i> Mesophyll-Protoplasten	38
2.3.5 Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	38
2.3.6 Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> mittels <i>A. tumefaciens</i>	38
2.4 DNA-Analytik	39

Inhaltsverzeichnis

2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen	39
2.4.2	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i> DH5 α	39
2.4.3	Plasmid-Minipräparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	40
2.4.4	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in Lösung.....	40
2.4.5	Restriktionsverdau	40
2.4.6	Klonierung	40
2.4.7	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	42
2.4.8	Transkriptanalyse durch quantitative real time PCR (qPCR).....	43
2.4.9	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	43
2.4.10	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	43
2.4.11	Sequenzierung von DNA	43
2.4.12	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung	43
2.5	RNA-Analytik.....	44
2.5.1	Isolierung von RNA aus Blattmaterial.....	44
2.5.2	<i>rDNase</i> -Verdau isolierter RNA und Reverse Transkription.....	44
2.5.3	Mikroarrayanalysen	44
2.6	Protein-Analytik.....	45
2.6.1	Verwendete Lösungen	45
2.6.2	Zellaufschluss von <i>A. thaliana</i> Mesophyll-Protoplasten	45
2.6.3	Zellaufschluss von Blattmaterial.....	45
2.6.4	Immunopräzipitation von Fusionsproteinen	45
2.6.5	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	46
2.6.6	Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	46
2.6.7	Western-Blot	47
2.6.8	Massenspektrometrieanalyse	47
2.6.9	Fluoreszenzmikroskopie	48
2.6.10	Konfokale <i>Laserscanning</i> Mikroskopie.....	48
2.6.11	FRET-Messungen	49
2.7	Reporter-Gen-Assays	49
2.7.1	Luciferase-Assay.....	50
2.7.2	GUS-Assay	50
2.7.3	Auswertung LUC-/GUS-Rate	50
2.8	Phänotypische Pflanzenversuche	51
2.8.1	Infektionsstudien mit verschiedenen Pathogenen	51
2.8.2	Hypokotyllängen-Messungen	51
2.8.3	Wurzellängen-Messungen.....	51
2.9	Hormon- und Sterolmessungen.....	52

2.9.1	Bestimmung der Hormonlevel in Pflanzen	52
2.9.2	Bestimmung des Sterolgehaltes von Pflanzen.....	52
2.10	Datenbankanalysen.....	52
3	Ergebnisse	53
3.1	Allgemeines.....	53
3.2	PiAVR2 interagiert mit BSL1, BSL2 und BSL3	53
3.3	<i>In-vivo</i> Interaktionsstudien zwischen PiAVR2 und den Kelch- phosphatasen der BSU1-Familie	56
3.4	In vivo Interaktionsstudien mittels FRET-FLIM	59
3.5	Ko-Lokalisationstudien zwischen PiAVR2 und den Proteinen der BSU1- Familie.....	61
3.6	Untersuchung des Einflusses von <i>PiAVR2</i> auf den Brassinosteroid- Signalweg	65
3.6.1	Einfluss von <i>PiAVR2</i> auf die BR-abhängige Aktivierung von BZR2.....	65
3.6.2	Einfluss der <i>PiAVR2</i> -Expression auf die Expression von Brassinosteroid- regulierten Genen	66
3.7	Funktionelle Charakterisierung von PiAVR2 <i>in planta</i>	68
3.7.1	Generierung von konstitutiven und induzierbaren GFP-PiAVR2- und <i>A. thaliana</i> -Linien	68
3.7.2	GFP-PiAVR2 lokalisiert in <i>A. thaliana</i> im Cytoplasma und im Zellkern....	69
3.7.3	MS-basierte IP Analyse von <i>GFP-PiAVR2</i> -Linien	70
3.7.4	Wachstums- und Entwicklungssphänotyp der GFP-PiAVR2-Über- expressionslinien	71
3.7.5	Untersuchung des PiAVR2-Effektes auf BR-regulierte Antworten.....	72
3.7.6	Untersuchung des PiAVR2-Effektes auf BR-regulierte molekulare Antworten.....	78
3.8	Untersuchung des PiAVR2 Effektes auf Pflanzenhormone	80
3.8.1	GFP-PiAVR2-Linien zeigen keinen veränderten Sterolgehalt	80
3.8.2	In <i>GFP-PiAVR2</i> -Linien haben Abwehrhormone ein erhöhtes Basal- niveau	81
3.9	Einfluss von PiAVR2 auf PAMP-induzierte Immunantworten	82
3.9.1	PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die PAMP-induzierte MAP-Kinase Aktivierung.....	83
3.9.2	PiAVR2 hat keinen Einfluss auf früh induzierte PAMP-Markergene	84
3.9.3	PiAVR2 hat keinen Einfluss auf PAMP-induzierte Callose-Bildung	86
3.10	<i>GFP-PiAVR2</i> -Linien haben eine erhöhte Basalexpression von PR- Genen.....	87
3.11	Die Expression von GFP-PiAVR2 induziert Zelltod	90
3.12	<i>GFP-PiAVR2</i> -Linien sind resistenter gegenüber <i>H. arabidopsidis</i>	92

3.13	<i>GFP-PiAVR2</i> -Linien sind susceptibler gegenüber <i>P. parasitica</i>	94
3.14	Transkriptomanalyse der <i>GFP-PiAVR2</i> -Linien	96
4	Diskussion	101
4.1	PiAVR2 und PiAVR2-Like interagieren mit BSL1, BSL2 und BSL3 (und nicht mit BSU1) im Cytoplasma	101
4.2	Die Rolle von PiAVR2 in Solanaceae-Arten.....	104
4.3	Wie beeinflusst PiAVR2 BSL1, BSL2 und BSL3?.....	106
4.4	Einfluss von PiAVR2 auf den Brassinosteroid-Signalweg und die Brassinosteroid-abhängige Stomatabildung.....	111
4.5	Der BR-Signalweg beeinflusst viele andere Signalwege.....	114
4.6	Die Überexpression von PiAVR2 führt zu einem Hormon- ungleichgewicht	115
4.7	Der BR-Signalweg beeinflusst die PTI.....	115
4.8	Die Expression von PiAVR2 induziert die Camalexinbiosynthese in Keimlingen.....	118
4.9	PiAVR2 löst einen stressinduzierbaren Zelltod-Phänotyp aus	119
4.10	PiAVR2 wirkt als Virulenzfaktor für hemibiotrophe Pathogene.....	121
4.11	Weiterführende Arbeiten	122
5	Zusammenfassung	125
6	Literaturverzeichnis	127
7	Anhang.....	153
7.1	Verwendete Primer	153
7.2	Alignmet der Phosphatasedomänen aller bekannten Kelchphosphatasen aus <i>Arabidopsis</i> und den Solanaceae	156
7.3	Der Phänotyp der GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien ist abhängig von der Lichtintensität	157
8	Erklärung	159
9	Danksagung	160

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Zick-Zack-Modell nach Jones und Dangl (2006) 12

Abbildung 2: Der Brassinosteroid-Signalweg..... 22

Abbildung 3: Proteinsequenzvergleich von PiAVR2 und PiAVR2-like 31

Abbildung 4: Verwendete Expressionssysteme. 42

Abbildung 5: Optimierung der HA-PiAVR2-Expression 53

Abbildung 6: Immunopräzipitation von HA-PiAVR2 54

Abbildung 7: Sequenzvergleich der BSU1 Familie 57

Abbildung 8: In vivo Co-Immunopräzipitationen von PiAVR2 mit BSU1, BSL1,
BSL2 und BSL3 58

Abbildung 9: In vivo Co-Immunopräzipitationen von PiAVR2-like mit BSU1,
BSL1, BSL2 und BSL3 59

Abbildung 10: In vivo Interaktionsstudien mittels FRET-Messungen 60

Abbildung 11: Lokalisation der GFP-BSLs und PiAVR2-RFP in Protoplasten..... 62

Abbildung 12: Kolokalisationsanalyse der GFP-BSLs und PiAVR2-RFP in
Protoplasten..... 63

Abbildung 13: Lokalisation von PiAVR2 und den Kelchphosphatasen in Tabak..... 64

Abbildung 14: Einfluss von PiAVR2 auf die Aktivierung von BZR2-GFP 66

Abbildung 15: Der Einfluss von PiAVR2 auf die Genexpression der SAUR-Gene 67

Abbildung 16: Das Expressionslevel von GFP-PiAVR2 beeinflusst den Phänotyp..... 68

Abbildung 17: Induzierbare GFP-PiAVR2-Linien zeigen einen WT-Phänotyp 69

Abbildung 18: Lokalisation von GFP-PiAVR2 in Arabidopsis thaliana 70

Abbildung 19: Blattstiellänge verschiedener GFP-PiAVR2-Linien 71

Abbildung 20: Schotenbildung GFP-PiAVR2-Linien 72

Abbildung 21: Stomata-Phänotyp in 35S::GFP-PiAVR2-Linien 74

Abbildung 22: Stomata-Phänotyp in pDex::GFP-PiAVR2-Linien 74

Abbildung 23: Der Stomataphänotyp in 35S::GFP-PiAVR2-Pflanzen ist teilweise
revertierbar 75

Abbildung 24: 35S::GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien haben längere Wurzeln
als der WT und reagieren sensitiv auf Epibrassinolid (BL) 76

Abbildung 25: GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien haben kürzere Hypokotyle
und reagieren sensitiv auf Brassinazol (BRZ)..... 77

Abbildung 26: Effekt von PiAVR2 auf die Phosphorylierung von BZR2..... 78

Abbildung 27: Expression der SAUR-Gene 79

Abbildung 28: Transkriptlevel der BR-Synthesegene CPD1 und DWF4..... 80

Abbildung 29: Die Überexpression von GFP-PiAVR2 beeinflusst nicht den
Sterolgehalt..... 81

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 30: Hormonlevel in GFP-PiAVR2-Linien und Kontrollpflanzen	82
Abbildung 31: Die Expression von PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die posttranslationale Aktivierung der MPKs	83
Abbildung 32: GFP-PiAVR2-Linien zeigen keine veränderte posttranslationale Aktivierung der MPKs	84
Abbildung 33: Die Expression von PiAVR2 in Protoplasten hat keinen Einfluss auf die Induktion des FRK1-Promoters nach flg22-Behandlung	85
Abbildung 34: Die Induktion der zeitigen PAMP-regulierten Gene ist in GFP-PiAVR2-Linien nicht beeinflusst	86
Abbildung 35: Die Expression von GFP-Avr2 hat keinen Einfluss auf die Einlagerung von Callose	87
Abbildung 36: Basale Genexpression von PR1, PR2 und PR5.....	88
Abbildung 37: GFP-PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Genexpression von PR1, PR2 und PR5.....	89
Abbildung 38: GFP-PiAVR2-Pflanzen zeigen einen erhöhten Gehalt des Phytoalexins Camalexin	90
Abbildung 39: Phänotyp von 14 d alten Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten	91
Abbildung 40: Zelltod in Dexamethason-induzierbaren GFP-PiAVR2-Linien.....	92
Abbildung 41: GFP-PiAVR2-Linien sind resistenter gegenüber H. arabidopsidis	93
Abbildung 42: Dex-induzierbare GFP-PiAVR2-Pflanzen sind sensitiver auf P. parasitica.....	95
Abbildung 43: GFP-PiAVR2-Pflanzen sind sensitiver auf P. parasitica	96
Abbildung 44: Transkriptom-Analyse der GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien.....	99
Abbildung 45: Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft der BSU1-Familie aus Arabidopsis und Solanaceae-Arten.....	103
Abbildung 46: Alignment der Proteinsequenzen von PiAVR2 und PiAVR2-like	123
Abbildung 47: Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft der BSU1-Familie aus Arabidopsis und Solanaceae-Arten.....	156
Abbildung 48: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Kurztag	157
Abbildung 49: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Langtag.....	157
Abbildung 50: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Dauerlicht	157

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
Abb	Abbildung	MeJA	Methyljasmonat
ACC	1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure	min	Minute
ATP	Adenosintriphosphat	mRNA	<i>messenger</i> RNA
Avr	Avirulenz	MS	Murashige und Skoog
bp	Basenpaar	NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>
BSA	Rinderserumalbumin	NBS	Nukleotid-Bindestelle
bzw.	beziehungsweise	NO	Stickstoffmonoxid
C	Cytosin	nosP	nopalinsynthase Promotor
CC	<i>coiled-coil</i>	NPP1	Nekrose-induzierendes <i>Phytophthora</i> Protein1
cDNA	komplementäre DNA	OD	optische Dichte
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
d	Tag(e)	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
d.h.	das heißt	PCI	Phenol:Chloroform: Isoamylalkohol (25:24:1)
DNA	Desoxyribo-nukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DNase	Desoxyribonuklease	PEG	Polyethylenglykol
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	pv.	pathovar
DRK	<i>defense-related receptor kinase</i>	Upm	Umdrehungen pro Minute
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	Resistenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat	RL(C)K	rezeptorähnliche (cytoplasmatische) Kinase
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α	RNA	Ribonukleinsäure
eGFP	<i>enhanced</i> Grün- Fluoreszierendes Protein	RNase	Ribonuklease
<i>et al.</i>	und andere	RNAi	RNA Interferenz
g	Erdbeschleunigung	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
G	Guanin	RT	Raumtemperatur
GAL4AD	GAL4-Aktivierungsdomäne	RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
GAL4BD	GAL4-DNA-Bindedomäne	SAR	systemisch erworbene Resistenz
GST	Glutathion-S-Transferase	sek	Sekunde
h	Stunde	s.	siehe
H ₂ O _{dd}	Milli-Q-Reinstwasser	t	Zeit
HR	hypersensitive Reaktion	T	Thymin
hrc	hrp und konserviert	T _m	Schmelztemperatur
hrp	HR und Pathogenität	TLR	<i>TOLL-like receptor</i>
HRP	Meerrettich- Peroxidase	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ISR	induzierte systemische Resistenz	U	<i>unit</i>
JA	Jasmonat	UV	ultraviolett
KBE	koloniebildende Einheit	VIB	<i>Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology</i>
KD	Kinasedomäne	Vol	Volumen
kDa	kilo Dalton	v/v	Volumen pro Volumen
KO	<i>knockout</i>	WT	Wildtyp
LB	Luria Bertani-Medium Typ Lennox	w/v	Masse pro Volumen
LPS	Lipopolysaccharid	z.B.	zum Beispiel
LRR	leuzinreiche Wiederholung		

Es gelten im Weiteren der Ein- und der Drei-Buchstaben-Code der Aminosäuren

1 Einleitung

1.1 Die Pflanzliche Immunabwehr

Pflanzen müssen in ihrer Umwelt nicht nur auf abiotische Faktoren reagieren. Sie sind auch einer Vielzahl von biotischen Einflüssen, wie der Konkurrenz durch andere Pflanzen und der Bedrohung durch Frassfeinde, ausgesetzt. Eine besondere Gefahr für Pflanzen sind Krankheiten, die von Pathogenen, wie Bakterien, Pilzen, Protisten und Viren, ausgelöst werden.

Allerdings verfügen Pflanzen weder über bewegliche Abwehrzellen, noch über eine adaptive Immunantwort. Sie müssen sich stattdessen auf die angeborene Immunantwort und systemische erworbene Resistenz (SAR) verlassen (*Ausubel, 2005; Chisholm et al., 2006; Dangl und Jones, 2001*). Daher ist es für Pflanzen essentiell zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden. Dies geschieht in der angeborenen Immunität über die Erkennung von molekularen Mustern, die im eigenen Organismus nicht vorkommen. Diese Strukturen werden als Mikroben- bzw. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (MAMPs bzw. PAMPs) bezeichnet. MAMPs erfüllen essentielle Funktionen in den Ursprungsorganismen und sind darum stark konserviert. Daher können diese nicht ohne weiteres mutiert oder vor Erkennung maskiert werden (*Janeway, 1989b; Janeway und Medzhitov, 2002*). Pflanzen erkennen eine Vielzahl von MAMPs bzw. PAMPs, die meist spezifisch für eine Klasse von Mikroorganismen sind und somit eine breite Erkennung von verschiedenen Schädlingen ermöglichen. Zum Beispiel werden Chitin, Glykopeptide und Ergosterole erkannt, die in der Zellwand von vielen phytopathogenen Pilzen vorkommen (*Boller, 1995; Ito et al., 1997*). Die Anwesenheit von Bakterien auf der Pflanzenoberfläche kann, z. B. durch die Erkennung von Lipopolysacchariden oder Peptidfragmenten von Flagellin, sensiert werden (*Dow et al., 2000; Felix et al., 1999; He, 1996*). Phytopathogene Oomyceten, wie *Phytophthora* oder *Pythium*, werden anhand von Heptaglukanstrukturen, Elicitinen und anderen Zellwandproteinen erkannt (*Mithöfer et al., 2000; Nürnberger et al., 1997; Umemoto et al., 1997; Veit et al., 2001*).

Neben MAMPs werden auch noch sogenannte Schaden-assoziierte molekulare Muster (DAMPs) registriert. Dabei handelt es sich zwar um Muster aus dem eigenen Organismus, jedoch in einer Form, die nur durch Pathogenbefall auftreten kann (*Janeway, 1989a; Rubartelli und Lotze, 2007*). So werden beispielsweise beim Abbau der pflanzlichen Zellwand durch Endopolygalacturonasen, u.a. von nekrotrophen Pathogenen, Oligogalacturonide (OG) freigesetzt. Diese OGs lösen in vielen Pflanzen Abwehrreaktionen aus, da sie der Pflanze zeigen, dass sie angegriffen wird (*De Lorenzo et al., 2001*).

Pflanzliche Genome kodieren für eine Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, die als RECEPTOR LIKE KINASES (RLK) bezeichnet werden. Einige dieser Rezeptoren nehmen Signale von Nachbarzellen, z.B. Stress durch Insektenfraß wahr, andere hingegen erkennen die Anwesenheit von Pathogenen in der Zellperipherie (*Shiu und Blecker, 2001*).

Einleitung

Alle RLKs haben eine extrazelluläre Ligandenbinde-Domäne, eine membranspannende Region, eine Juxtamembran-Domäne und eine Serin/Threonin-Kinase-Domäne (Greeff *et al.*, 2012). RLKs für die spezifische Erkennung von molekularen Mustern (MAMPs und DAMPs) werden Mustererkennungsrezeptoren (*PATTERN RECOGNITION RECEPTORS*; PRRs) genannt und ihre Aktivierung führt zur Induktion von Abwehrreaktionen. Diese Erkennung ist notwendig für Etablierung der PAMP-induzierten Immunität (PTI) und damit auch essentiell für angeborene Immunität von Pflanzen. Mutationen in PRRs machen Pflanzen deutlich suszeptibler gegenüber Pathogenen (Zipfel, 2008). Erfolgreiche Pathogene haben Effektoren entwickelt, die ihnen bei der Kolonisation der Pflanze einen Vorteil verschaffen, z.B. durch die Unterdrückung der PTI. Dadurch kommt es in Pflanzen zur sogenannten Effektor-induzierten Suszeptibilität (ETS). Werden diese Effektoren oder deren Wirken von der Pflanze sensiert, wird eine viel stärkere Immunantwort ausgelöst. Diese Effektor-induzierte Immunität (ETI) ist exponentiell stärker als die PTI und ist oft mit einer hypersensitiven Zelltod-Reaktion (HR) verbunden. Im evolutionären Wettrüsten können Pathogene veränderte oder zusätzliche Effektoren produzieren und die Pflanze muss darauf reagieren, so dass sich ETS und ETI beliebig oft wiederholen können, wie es im Zick-Zack-Modell von Jones und Dangl (2006) schematisch dargestellt ist.

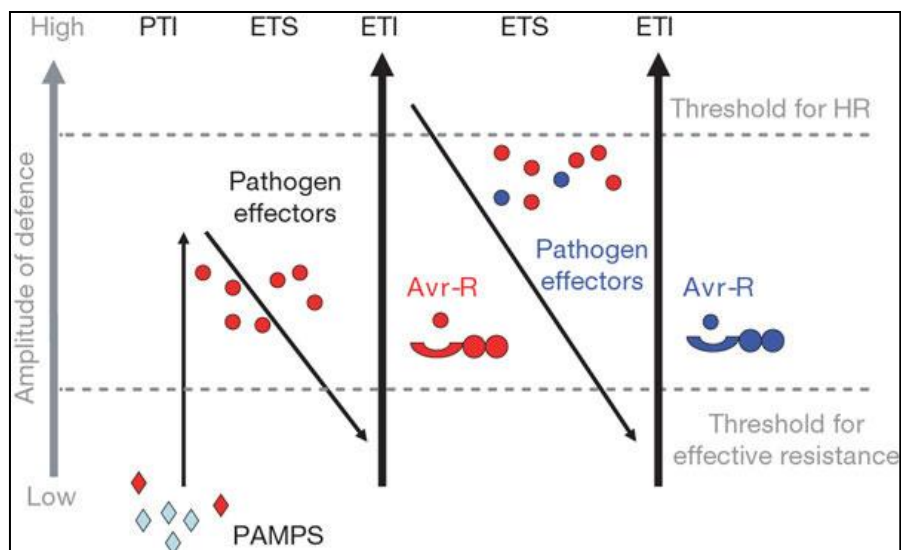


Abbildung 1: Zick-Zack-Modell nach Jones und Dangl (2006)

PAMPs: Pathogen-assoziierte molekulare Muster; PTI: PAMP-getriggerte Immunität; ETS: Effektor-getriggerte Suszeptibilität; ETI: Effektor-getriggerte Immunität; Avr: Avirulenzprotein; HR: hypersensitive Reaktion.

1.1.1 PAMP-induzierte Immunität (*PAMP-triggered immunity, PTI*)

Die PTI löst eine Vielzahl von Reaktionen aus. So kommt es innerhalb von Minuten zu einer Depolarisierung der Plasmamembran. Grund dafür ist ein massiver Influx von Ca^{2+} und H^+ und infolge dessen zu einem Efflux von K^+ , Cl^- und Nitrat (Boller, 1995; Mithöfer et al., 2005; Wendehenne et al., 2002). Das Ca^{2+} aktiviert calciumabhängige Kinasen (Blume et al., 2000; Lecourieux et al., 2002). Des Weiteren kommt es zu einer Produktion von NO. Neben seiner geringen cytotoxischen Aktivität ist es hauptsächlich als Signalmolekül wichtig, da es leicht durch Membranen diffundieren kann (Wilson et al., 2008). Die Pflanzen akkumulieren sehr schnell reaktive Sauerstoffspezies (ROS), da diese für einige Pathogene toxisch sind.

Des Weiteren werden dadurch zusätzliche Quervernetzungen in die Zellwand eingefügt (Apel und Hirt, 2004). Nach kurzer Zeit kommt es außerdem zu Änderungen im Phosphorylierungsstatus vieler Proteine (de la Fuente van Bentem und Hirt, 2007; Peck et al., 2001).

10 Minuten nach der Perzeption eines PAMPs kommt es zur Aktivierung von MAP-Kinasen (MPK)-Phosphorylierungskaskaden und infolge dessen zu einer Aktivierung von stressassoziierten Transkriptionsfaktoren (Asai et al., 2002; Nühse et al., 2000). Diese Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression von Genen, die direkt oder indirekt an der Immunabwehr beteiligt sind. So werden zum Beispiel Callose-Synthesegene hochreguliert. Die Callose wird in die Zellwand eingebaut, um sie zu verstärken (Gomez-Gomez et al., 1999; Veit et al., 2001). Zur direkten Pathogenabwehr wird die Expression von PR- (*pathogenesis related*) Genen induziert. PR-Gene kodieren u.a. für Glukanasen, Chitinasen und Proteasen, die Pathogene während der Infektion beeinträchtigen können (Uknes et al., 1992). Des Weiteren kommt es zur Änderung des Spiegels vieler Phytohormone und zur Produktion von Phytoalexinen. Phytoalexine, wie Camalexin, sind kleine antimikrobielle Sekundärmetabolite, die durch Stress induziert werden (Hammerschmidt, 1999; Pedras et al., 2011).

1.1.2 Effektor-induzierte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility, ETS*)

Pflanzliche Pathogene haben eine Vielzahl von Effektoren entwickelt, die ihnen bei der Infektion oder Kolonisation einen Vorteil verschaffen. Man bezeichnet sie daher auch als Virulenzfaktoren. Sie sind wichtig für die Bildung von Infektionsstrukturen oder für die Nährstoffaufnahme aus dem Wirt (Doehlemann et al., 2014). Eine weitere wichtige Funktion ist die Effektor-vermittelte Suszeptibilität durch die Unterdrückung der PTI (Block et al., 2008; Hann et al., 2010; Jones und Dangl, 2006). Sie verhindern z. B. die Erkennung durch das Immunsystem oder die Aktivierung bzw. Weiterleitung der Immun-Signalkaskaden (mehr Details zu Effektoren s. Kapitel 1.4.). Wird mithilfe von Effektoren die PTI unterdrückt und es kommt weiterhin zur Ausbildung von Krankheitssymptomen, spricht man von Effektor-vermittelter Suszeptibilität (Jones und Dangl, 2006).

1.1.3 Effektor-induzierte Immunität (effector-triggered immunity, ETI)

Um der Bedrohung durch Effektoren und Effektoren-vermittelter Unterdrückung der PTI zu entgehen, haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, die Effektoren direkt oder indirekt zu sensieren. Wird ein Effektor oder seine Wirkung auf die Pflanze durch diese erkannt, wird er als Avirulenzfaktor (Avr) bezeichnet, weil sich seine Wirkung als Virulenzfaktor ins Gegenteil verkehrt hat. Die Erkennung von Avr's geschieht meist intrazellulär durch die Genprodukte der pflanzlichen Resistenz, sogenannte (R)-Gene (*Jones und Dangl, 2006*). Die meisten R-Proteine haben sowohl eine nukleotid-bindende als auch LRR-Domänen (*Martin et al., 2003; Meyers et al., 2003*) und werden daher als NB-LRR-Proteine bezeichnet. Die Erkennung von Effektoren durch R-Proteine führt zu einer verstärkten und systemischen Reaktion, der sogenannten Effektor-induzierten Immunität (ETI). Eine direkte Erkennung eines Effektors durch ein R-Protein ist selten. So wird z. B. der Effektor PopP2 aus *Ralstonia solanacearum* durch direkte physische Interaktion mit dem *A. thaliana* R-Protein RRS1-R erkannt (*Deslandes et al., 2003*).

Es wurden nur rund 150 NB-LRR Rezeptoren in *Arabidopsis* identifiziert. Da diese R-Proteine einer sehr großen und ständig anwachsenden Vielfalt identifizierter Effektoren aus den verschiedensten Pathogenen gegenüberstehen, wurde die Guard-Theorie (*Dangl und Jones, 2001; Van der Biezen und Jones, 1998*) entwickelt. Dabei findet die Erkennung der Effektoren indirekt durch Überwachung des Soll-Zustandes möglicher Effektor-Zielproteine durch NB-LRR-Proteine statt. Ein gutes Beispiel für die Guard-Theorie ist RPM1-INTERACTING 4 (RIN4). RIN4, aus *Arabidopsis*, ist ein negativer Regulator der PTI (*Kim et al., 2005*). In diesem Kontext ist es nicht überraschend, dass RIN4 Ziel von mehreren *P. syringae* Effektoren, wie zum Beispiel AvrB, AvrRpm1 und AvrRpt2, ist (*Axtell et al., 2003; Coaker et al., 2005; Luo et al., 2009; Mackey et al., 2002*). RIN4 wird von zwei NB-LRR-Rezeptoren überwacht. RPM1 überwacht den Phosphorylierungszustand von RIN4 und löst bei AvrB- oder AvrRpm1-induzierter Phosphorylierung von RIN4 eine RPM1-induzierte ETI aus (*Grant et al., 1995; Liu et al., 2011*). Der NB-LRR RPS2 überwacht, ob die Protease AvrRpt2 RIN4 abbaut und induziert daraufhin eine sofortige ETI (*Axtell et al., 2003; Axtell und Staskawicz, 2003; Bent et al., 1994; Coaker et al., 2005; Mackey et al., 2002*).

Viele Reaktionen der PTI sind auch typisch für die ETI. Es kommt zur Aktivierung der MPK-Kaskaden sowie zur Akkumulation von Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Ethylen (ET), Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und reaktiven Stickstoff-Intermediaten (NOI). Weiterhin kommt es zur Änderung des intrazellulären Calciumpegels, zu einer transkriptionellen Umprogrammierung und zur Synthese von antimikrobiellen Verbindungen. PTI und ETI verwenden die gleichen Signalmoleküle, jedoch sind die Reaktionen der ETI nicht transient, wie bei der PTI, sondern deutlich verlängert (*Tsuda und Katagiri, 2010*).

Die ETI ist im Vergleich zur PTI eine beschleunigte und verstärkte Reaktion auf einen Pathogenbefall. Durch diese verstärkte Reaktion kommt es bei der ETI oft zur Ausbildung einer Hypersensitiven Reaktion (HR). Dabei handelt es sich um einen schnellen Zelltod um die Infektionsstelle herum, der das Wachstum und die Ausbreitung der Pathogene begrenzen soll (*Jones und Dangl, 2006*). Die HR ist eine eigene Unterform des Zelltodes.

Typisch für die HR ist das Schrumpfen des Cytoplasmas, die Chromatinkondensation, das Anschwellen der Mitochondrien, die Vakuolisierung und in den letzten Stadien der Zusammenbruch der Chloroplasten (*Mur et al., 2008*). Die Chloroplasten spielen eine wichtige Rolle bei der HR, denn sie sind eine Quelle für Abwehr-Signalmoleküle, wie Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), reaktive Stickstoff-Intermediate (NOI) und die Abwehrhormone Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA). Darüber hinaus spielt Licht bei der Induktion einer HR oft eine wichtige Rolle (*Mur et al., 2008*).

Der genaue Weg der Zelltod-Induktion als Folge der Effektorperzeption durch NB-LRRs ist noch nicht vollständig erforscht. Es gibt zwei Signalmodule, durch die NB-LRRs reguliert werden. Zum einen regelt *NON-RACE-SPECIFIC DISEASE RESISTANT 1* (NDR1) die meisten Immunreaktionen, die durch Coiled-Coiled (CC)-NB-LRRs vermittelt werden. Zum anderen reguliert ein Signalkomplex aus *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1* (EDS1)/*PHYTOALEXIN DEFICIENT 4* (PAD4) und *SENESCENCE ASSOCIATED GENE 101* (SAG101) die TIR-NB-LRR-Signale (*Aarts et al., 1998*). Diese beiden Signalmodule integrieren die Redoxsignale unterhalb der NADPH-Oxidase (*Torres, 2010*), was wiederum zu einer Akkumulation von SA führt (*Shapiro und Zhang, 2001; Wiermer et al., 2005*). ROS und SA agieren synergistisch, um die HR zu lenken (*Shirasu et al., 1997*). Die Induktion der HR kann unterschiedlich vonstatten gehen. Die RPS4-induzierte HR durch den *P. syringae* Effektor AvrRps4 ist von Autophagie-Komponenten abhängig, die HR-Induktion durch RPT2 jedoch nicht (*Hofius et al., 2009*).

Der Zelltod der HR zielt vorrangig gegen biotrophe Pathogene. Durch das Absterben der Zellen um die Infektionsstelle herum, soll dem Pathogen die Nahrungsquelle entzogen werden (*Glazebrook, 2005*). Allerdings muss die HR streng reguliert werden, da unkontrollierter Zelltod und sich ausbreitende Nekrose für einige Pathogene, insbesondere solche mit nekrotrophem Lebenszyklus vorteilhaft, wäre.

1.1.4 Hormone in der Immunität

Viele Pflanzenhormone spielen eine bedeutende Rolle für die pflanzliche Immunantwort (*Bari und Jones, 2009; Howe und Jander, 2008; Katagiri und Tsuda, 2010; Pieterse et al., 2009*). Die wichtigsten Hormone in der Immunabwehr sind Salicylsäure (SA) und Jasmonsäure (JA) (*Browse, 2009; Vlot et al., 2009*). Des Weiteren sind auch viele andere Hormone, wie Ethylen (*van Loon et al., 2006a*), Abscisinsäure (*Ton et al., 2009*), Gibberelline (*Navarro et al., 2008*), Auxin (*Kazan und Manners, 2009*), Cytokine (*Walters und McRoberts, 2006*), Brassinosteroide (*Nakashita et al., 2003*) und Stickstoffmonoxid (*Moreau et al., 2010*) an der Modulation des pflanzlichen Immunsignal-Netzwerkes beteiligt. Um Reaktionen spezifisch an das angreifende Pathogen anzupassen und nur die absolut notwendigen Ressourcen zu verbrauchen, können die verschiedenen Hormon-Signalwege antagonistisch oder synergistisch interagieren. Dies wird als Hormon-Crosstalk bezeichnet (*Jaillais und Chory, 2010; Mundy et al., 2006*).

Einleitung

Da Pflanzen häufig vielen Pathogenangriffen, zum Teil sogar gleichzeitig, ausgesetzt sind, benötigen sie eine spezifische Regulation, um die Priorisierung der Abwehrreaktionen zu definieren. Im Weiteren werden die wichtigsten Hormone in der Immunabwehr und einige der bekannten Regulationen des Crosstalks der verschiedenen Hormonwege erläutert.

SA-Antworten sind meistens (aber nicht immer) effektiv gegen mikrobielle, biotrophe Pathogene (Glazebrook, 2005). SA und/oder seine Derivate werden gewöhnlich für die PTI, die ETI (Dodds und Rathjen, 2010), lokale Abwehrreaktionen, wie die Expression von PR Genen und die Aktivierung vom programmierten Zelltod, sowie für die systemische Resistenz (SAR) benötigt. Die SAR vermittelt Resistenz gegen ein breites Spektrum biotropher Pathogene in sowohl im umgebenden Gewebe als auch in entfernten Pflanzenteilen (Gaffney et al., 1993; Ryals et al., 1994). Die SA-Biosynthese wird in der PTI und in der ETI als Folge der PAMP- bzw. Effektor-Wahrnehmung induziert (Mishina und Zeier, 2007). Viele SA-Reaktionen werden von NON-EXPRESSION OF PR GENES 1 (NPR1) reguliert. NPR1 fungiert als Regulator für die Expression zahlreicher Abwehrgene, wie zum Beispiel der *PHATOGENESIS RELATED* (PR) Gene (Dong, 2004; Moore et al., 2011). Die PR-Gene bilden verschiedene Familien und viele kodieren für Proteine mit antimikrobieller Wirkung (van Loon et al., 2006b). PR-1, eines der beststudierten Abwehrgene, gilt als robuster Marker für eine SA-abhängige Genexpression. Wurde der SA-Signalweg an der Infektionsstelle induziert, wird das Signal meist in die benachbarten Zellen und Gewebe übertragen, um das gesunde Gewebe vor einer Ausbreitung des Pathogens zu schützen. Dadurch kann eine lang-andauernde Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen etabliert werden, die als SYSTEMIC ACQUIRED RESISTENCE (SAR) bezeichnet wird (Vlot et al., 2009).

Jasmonsäure (JA) und seine Derivate gehören zu den Lipidderivaten und werden sehr schnell nach einem Pathogen- oder Insektenbefall gebildet (Gfeller et al., 2010). In *Arabidopsis* hat der JA-Signalweg zwei große regulatorische Verzweigungen, die MYC-Transkriptionsfaktoren (TFs) und die APETALA2/ETHYLEN RESPONSE FAKTOREN (AP2/ERF) -TFs (Dombrecht et al., 2007; Lorenzo et al., 2003; McGrath et al., 2005; Pré et al., 2008). Während der AP2/ERF-Zweig des JA-Signalweges meist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen assoziiert ist (Berrocal-Lobo et al., 2002; Lorenzo et al., 2003), sind JA-regulierte MYC-TFs für Wundantworten und die Resistenz gegenüber herbivoren Insekten verantwortlich (Kazan und Manners, 2012; Lorenzo et al., 2004). ERF1 integriert die Signale des JA- und ET-Signalweges. Eine gleichzeitige Behandlung mit JA und ET hat einen synergistischen Effekt auf die ERF1-Expression und infolge dessen auf die Expression von JA- und ET-induzierbaren Abwehrgenen wie *PLANT DEFENSIN 1.2* (PDF1.2) (Lorenzo et al., 2003). Für die Aktivierung des ERF-Zweiges im JA-Signalweg wird JA und Ethylen benötigt. MYC TFs (hergeleitet von Myelozytomastose) haben ein basische Helix-Loop-Helix-Motiv (bHLH Motiv). Sie fungieren als positive Regulatoren der Wundungsresistenzgene und negative Regulatoren während der Expression von Pathogen-Abwehrgenen (Lorenzo et al., 2004; van Verk et al., 2009).

Nach einem Pathogen- oder Insektenbefall wird bioaktives JA (JA-Ileu; JA konjugiert mit Isoleucin) gebildet. In Anwesenheit von JA-Ileu wird das JASMONATE-ZIM-DOMAIN (JAZ) Protein und seine Bindungspartner von MYC entkoppelt und JAZ wird durch das 26s Proteasom abgebaut (*Cheng et al., 2011; Chini et al., 2009; Chini et al., 2007; Lorenzo et al., 2004; Memelink, 2009; Yan et al., 2013*). Die Aktivierung von MYC führt auch zu einer Expression von weiteren Transkriptionsfaktoren wie MYBs (Myoblastosis related Proteins) und WRKY (Aminosäuresstruktur WRKYGQK) die für die Stressabwehr wichtig sind. Der JA-Signalweg ist in der Lage benachbarte Zellen über Verwundungen oder Herbivorenbefall zu „informieren“ und so die Bildung von Repellentien und toxischen Verbindungen als Fraßschutz zu induzieren (*Howe und Jander, 2008*).

SA- und JA-Signalwege galten lange als antagonistisch. Aufgrund Ihrer wechselseitig inhibitorischen Wirkung geht man davon aus, dass sich die Pflanze je nach Art des Pathogenbefalls für den einen oder den anderen Signalweg entscheidet (*Glazebrook, 2005*). Es gibt jedoch auch mehrere Studien die sehr starke JA-Akkumulationen während der ETI gezeigt haben (*Kenton et al., 1999; Spoel et al., 2007*). Des Weiteren beeinflusst der JA-Signalweg die ETI positiv (*Liu et al., 2016; Tsuda et al., 2009*). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass während der Effektor-Induzierten Immunität beide Hormonwege gleichzeitig aktiviert werden. Diese Beobachtungen scheinen konträr zum bisherigen Modell der antagonistischen Wechselwirkung der beiden Signalwege. Es wurden verschiedene Hypothesen wie zum Beispiel ein einzigartiges Zusammenspiel von JA und SA welches nur während der ETI stattfindet. Die Studie von (*Betsuyaku et al., 2018*) zeigt eine völlig neue Erklärung auf. Sie konnten mit intravitaler Zeitraster-Mikroskopie zeigen, dass in den Zellen rund um die Infektionsstelle der SA-Signalweg aktiviert war und in den direkten Zellen darum der JA-Signalweg.

Das gasförmige Hormon Ethylen (ET) ist ein bedeutender Modulator der pflanzlichen Immunantwort (*Broekaert et al., 2006; van Loon et al., 2006b; von Dahl und Baldwin, 2007*). Bei der Regulation der Immunantwort kommt es zu einem intensiven Crosstalk zwischen dem ET-Signalweg mit den JA- und SA-Signalwegen (*Glazebrook et al., 2003; Sato et al., 2010*). ET kann sowohl positiv als auch negativ in die Regulation der Immunität eingreifen. In Arabidopsis wird durch ET die Expression des SA-responsiven Gens PR-1 verstärkt (*De Vos et al., 2006; Lawton et al., 1994*) und in Tabak wird ET für die Induktion der SAR benötigt (*Verberne et al., 2003*). ET-gesteuerte TFs reprimieren PAMP-induzierte Gene sowie SA-Biosynthesegene und verringern so die SA-Akkumulation (*Chen et al., 2009*). ET hat auch einen großen Einfluss auf die JA-Antwort. Bei einem Angriff durch ein nekrotrophes Pathogen werden ET und JA gleichzeitig induziert. Sie regulieren synergistisch die Induktion des ERF-Zweiges des JA-Weges und reprimieren zeitgleich den MYC-Zweig. Dadurch wird die JA- und ET-regulierte Abwehr gegen Nekrotrophe zur Priorität der Immunantwort gemacht (*Anderson et al., 2004; Lorenzo et al., 2004; Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008*).

Einleitung

Neue Studien liefern Hinweise, dass das Gleichgewicht zwischen dem MYC und dem ERF Zweig des JA-Weges durch die Interaktion von JA/ABA aktiviertem MYC2/3/4 und dem ET stabilisierten ETHYLENE-INSENSITIVE3 (EIN3) und ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 (EIL1) moduliert werden. *Zhang et al. (2014)* zeigten, dass MYC2 EIN3 reprimiert indem es die Expression des EIN3-Repressors ETHYLENE INSENSITIVE3 BINDING F-BOX PROTEIN1 induziert und durch die physische Interaktion mit EIN3 direkt um dessen DNA Bindeaktivität zu inhibieren. Des Weiteren konnten *Song et al. (2014)* zeigen, dass auch EIL1 an diesem antagonistischen Effekt von MYC2 auf EIN3 beteiligt ist und somit die Resistenz gegenüber *B. cineria* verringert.

Abscisinsäure (ABA) ist ein wichtiges Hormon für die Anpassung an abiotischen Stress, insbesondere bei Trockenheit und Salzstress. Zusätzlich ist ABA ein Regulator in der pflanzlichen Immunität (*Asselbergh et al., 2008; Cao et al., 2011; Ton et al., 2009*). ABA supprimiert die SA-regulierte Immunantwort (*Cao et al., 2011; De Torres Zabala et al., 2009; Jiang et al., 2010; Yasuda et al., 2008*). Um eine Balance zwischen ABA-regulierter abiotischer Stresstoleranz und SA-regulierter Resistenz gegenüber Biotrophen zu ermöglichen, beeinflussen sich ABA- und SA-Antworten gegenseitig auf vielen Ebenen, von der Biosynthese bis hin zu Signaltransduktionskomponenten (*Yasuda et al., 2008*). Bei Verwundungen und Herbivorenangriff agieren ABA und JA gemeinsam, um den MYC-Zweig zu aktivieren und den ERF-Zweig zu unterdrücken (*Abe et al., 2003; Anderson et al., 2004*). ABA fungiert weiterhin als wichtiger Regulator der Spaltöffnungen. Dies ist wichtig um bei Trockenheit die Spaltöffnungen zu schliessen. Des Weiteren ist die ABA vermittelte Schliessung von Spaltöffnungen auch ein bekannter Abwehrmechanismus bei PAMP- und Pathogenkontakt um das Eindringen von Pathogenen in das Pflanzengewebe zu verhindern (*Melotto et al., 2006; Zeng und He, 2010; Zhang et al., 2008*). Daher verwundert es nicht, dass einige Effektoren in die Regulation der ABA Synthese und des ABA-Signalweges eingreifen. Die Produktion des Phytotoxins Coronatin (COR) durch *Pst DC3000* führt zu einer verstärkten ABA Synthese; gefolgt von einer Reduktion der SA Synthese durch die Inhibition der Expression der ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1). Dadurch kommt es zu einer weiteren Öffnung der Stomata wodurch der Eintritt von Pathogenen vereinfacht wird.

Auxin kann das SA-Niveau und den SA-Signalweg reprimieren (*Robert-Seilaniantz et al., 2011b*). Wird der SA-Signalweg jedoch aktiviert, unterdrückt er viele Auxin-regulierten Gene (*Wang et al., 2007*) und verhindert so wirksam eine Beeinflussung der Immunantwort durch Auxin-produzierende Pathogene (*Navarro et al., 2006; Robert-Seilaniantz et al., 2011b*).

Gibberelline (GAs) unterdrücken die JA-Antwort und fördern dadurch indirekt die SA-regulierte Abwehr. Daher verstärken GAs die Suszeptibilität gegenüber Nekrotrophen und erhöhen die Resistenz gegenüber Biotrophen (*Navarro et al., 2008*).

Cytokine können, je nach ihrer Konzentration an der Infektionsstelle, als positive oder negative Regulatoren der Immunität gegenüber biotropher Pathogene fungieren. Hohe Konzentrationen von CK führt zu einer Verringerung des Pathogenwachstums und einer Aktivierung von Abwehrreaktionen.

Niedrige Konzentrationen von CK führen hingegen zu einem vermehrten Pathogenwachstum. Cytokine erhöhen beispielsweise die Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen, da sie synergistisch mit SA einen SA-responsiven TF regulieren und die PR-1-Expression induzieren (*Choi et al., 2011; Robert-Seilaniantz et al., 2011a; Walters und McRoberts, 2006*).

Da Hormone so eine wichtige Rolle in der Immunität spielen, versuchen viele Pathogene die Hormonsignalwege ihres Wirtes zu ihren Gunsten zu manipulieren, indem sie entweder pflanzliche Hormone bzw. Hormonimitationen produzieren oder Effektoren entwickeln, die pflanzliche Hormonwege beeinflussen (*Robert-Seilaniantz et al., 2011a*). Zum Beispiel versuchen biotrophe Pathogene durch Induktion des Auxin-Signalweges die SA-Antwort zu unterdrücken und so ihre Wirtspflanzen suszeptibler zu machen (*Chen et al., 2007*).

Neueste Untersuchungen zeigen, dass auch für Brassinosteroide (BRs) eine Rolle in der pflanzlichen Immunität spielen.

1.1.5 Brassinosteroid in der pflanzlichen Immunität

Eine bekannte Familie von Pflanzenwachstums- und Entwicklungshormonen sind die Brassinosteroide (BRs). Dabei handelt es sich um Steroid-Derivate mit Ähnlichkeit zu den Sexualhormonen von Säugetieren und den Ecdysteroidhormonen von Insekten (*Grove et al., 1979*). Bei der BR-Biosynthese wird Campesterol durch mehrerer Cytochrom P450 Monooxygenasen in BRs und am Ende in Brassinolid (BL), das biologisch aktivste BR, umgewandelt (*Bishop, 2007; Fujioka und Yokota, 2003*).

BRs sind wachstumssteigernde Hormone, die eine Vielzahl von Genen und zahlreiche Entwicklungsprozesse steuern (*Clouse, 2002; Kim et al., 2009; Kim und Wang, 2010; Vert et al., 2005*). Physiologische Studien haben gezeigt, dass BRs nicht nur die Zellelongation unterstützen. Sie erhöhen auch die Toleranz gegen Umweltbelastungen und die Resistenz gegen Pathogen-Infektionen, wodurch sie den landwirtschaftlichen Ertrag steigern (*Divi und Krishna, 2009*).

Ein besonderes Interesse gilt aktuell dem Einfluss von Brassinosteroiden auf die Stress- und Pathogenantwort. Es konnte gezeigt werden, dass BRs die Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress in Pflanzen regulieren (*Cui et al., 2011; Divi und Krishna, 2009; Divi et al., 2010; Miller et al., 2010; Wang, 2012; Xia et al., 2009; Xia et al., 2011; Zhang et al., 2010*). Daher wurden in den letzten Jahren vermehrt BRs in der Agrarindustrie eingesetzt, um den Ertrag zu intensivieren und die Stresstoleranz der Pflanzen zu erhöhen (*Divi und Krishna, 2009; Divi et al., 2010; Vriet et al., 2012; Xia et al., 2009; Xia et al., 2011*). Exogene Behandlungen mit BRs, in der richtigen Dosis und im richtigen Entwicklungsstadium, wirken effizient an einer positiven Modulation der pflanzlichen Immunität (*Khripach et al., 2000*). So reduziert eine Feld-Behandlungen mit Brassinolid (BL) auf Bohnenpflanzen signifikant die Ausdehnung von Blattkrankheiten, die durch verschiedene Pilze verursacht wurden und erhöht gleichzeitig den Ertrag (*Pshenichnaya et al., 1997*). Eine zweifache BL-Behandlung von Gurkenpflanzen reduziert signifikant den Mehltau-Befall (*Churikova et al., 1999*).

Einleitung

Besonders interessant ist allerdings, dass BR-Behandlungen von Kartoffelpflanzen die Befallsrate mit *P. infestans* signifikant reduzieren können (Khripach et al., 1996). In neueren Versuchen konnten *P. infestans* Infektionen mit BL-Behandlung um bis zu 40% reduziert werden (Savel'eva et al., 1999). In einigen Fällen war der Schutzeffekt durch BL sogar stärker als eine Fungizidbehandlung. So ist eine Behandlung mit Homobrassinolid doppelt so effektiv wie eine Fungizidbehandlung mit Arcerid und erzielt gleichzeitig einen höheren Ertrag (Khripach et al., 1996).

In Tabak erhöht eine exogene BR-Behandlung die Resistenz gegenüber dem viralen Tabak-Mosaik-Virus, dem bakteriellen Pathogen *P. syringae* pv. *tabaci* und dem obligat biotrophen Pilz *Oidium* sp.. In Reis bewirkt die BR-Behandlung eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Reisbrand-auslösenden, hemibiotrophen Pilz *Maganporthe griseae* und der bakteriellen Streifenkrankheit *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Nakashita et al., 2003). Über den Wirkmechanismus der BR-induzierten Krankheitsresistenz ist bisher wenig bekannt. De Vleeschauwer et al. (2014) konnten zeigen, dass eine exogene BR-Behandlung von Reispflanzen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Pythium graminicola* führt. Diese Wirkung ist GA-abhängig. Durch die exogene BR-Behandlung wird das DELLA Protein SLENDER RICE 1 (SLR 1) stabilisiert. In Folge dessen wird der GA-Signalweg und somit die GA-vermittelte Abwehr blockiert. Dadurch wird die Empfindlichkeit gegenüber *P. graminicola* erhöht. In Kartoffelknollen ist die BR-induzierte Resistenz gegen verschiedene Krankheiten mit einem Anstieg der ABA- und Ethylenlevel sowie einer Bildung von phenolischen und terpenoiden Substanzen verbunden (Korableva et al., 1999). In Tabak konnte gezeigt werden, dass die BR-induzierte Resistenz unabhängig von einer SA-Akkumulation sowie von einer Induktion der Abwehrgene PR-1, PR-2 und PR-5 ist. Das könnte bedeuten, dass der Mechanismus unabhängig von systemischer Resistenz und Verwundungs-induzierter Resistenz funktioniert (Nakashita et al., 2003). In Gurken wurden nach BL-Behandlung eine erhöhte Aktivität von Peroxidasen und Polyphenoxidasen gemessen und daher vermutet, dass die Bildung von Polyphenolen eine Rolle bei der BR-induzierten Resistenz spielt (Churikova et al., 1999). Ding et al. (2009) zeigten, dass eine BL-Behandlung von Gurken die Symptome durch den Gurkenwelke-verursachenden Pilz *Fusarium oxysporum* deutlich milderten, den Pathogen-induzierten oxydativen Stress, die Flavonoide und die phenolischen Substanzen verringerten und einen leichten Anstieg von Wasserstoffperoxid induzierten. Wasserstoffperoxid spielt auch in der BR-vermittelten Stressresistenz eine wichtige Rolle. Xia et al. (2009) zeigten, dass die BR-induzierte Toleranz gegen verschiedene Stressarten von der Wasserstoffperoxid-Synthese durch eine NADPH-Oxidase abhängt und dass durch eine lokale BL-Behandlung eine systemische, H₂O₂-abhängige Stresstoleranz induziert werden kann (Xia et al., 2011).

1.2 Der Brassinosteroid-Signalweg

Durch seine bedeutende Rolle in Pflanzenwachstum und -entwicklung konnten viele Regulatoren des BR-Signalweges mittels Knockdown- und Knockout-Mutanten intensiv studiert werden. Brassinosteroid-defiziente oder -insensitive Mutanten zeigen multiple Defekte über ihren gesamten Lebenszyklus, inklusive reduzierter Keimungsrate der Samen, Photomorphogenese im Dunkeln, Zwergenwuchs und männlicher Sterilität (Clouse, 2002). Umgekehrt führt eine übermäßige Akkumulation von BRs bzw. eine Hyperresponsivität zu einem verstärkten Streckungswachstum der Pflanzen (Mora-Garcia et al., 2004; Poppenberger et al., 2011; Wang et al., 2001). Brassinosteroide werden an der Oberfläche der Pflanzenzelle von der Rezeptor-ähnlichen Kinase *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1* (BRI1) wahrgenommen. Die Weiterleitung des Signales führt zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *BRASSINAZOLE-RESISTANT 1* (BZR1) und BZR2, die daraufhin die Brassinosteroid-responsiven Gene regulieren (Gendron und Wang, 2007; Kim et al., 2009; Sun et al., 2010; Tang et al., 2010).

BRI1 ist eine *LEUCIN-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE* (LRR-RLK), die mit ihrer extrazellulären Domäne das BR-Signal wahrnimmt und es mit seiner intrazellulären Kinasedomäne weiterleitet (Kinoshita et al., 2005; Li und Chory, 1997; Wang et al., 2001). Wird kein BR sensiert bleibt die BRI1-Kinasedomäne inaktiv, während die cytosolische Kinase *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2* (BIN2) aktiv ist und die Transkriptionsfaktoren *BRASSINAZOL-RESISTANT 1* (BZR1) und BZR2 phosphoryliert und dadurch inaktiviert (Gampala et al., 2007; He et al., 2002; Vert und Chory, 2006; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002). BZR1 und BZR2 sind positive Regulatoren des BR-Signalweges (He et al., 2002; Wang et al., 2002; Yin et al., 2002; Zhao et al., 2002). BZR2, früher bekannt als *bri-EMS-SUPPRESSOR1* (BES1), zeigt 88 % Sequenzidentität mit BZR1 (Yin et al., 2002).

Die Phosphorylierung von BZR1 und BZR2 durch BIN2 bei einem geringen BR-Gehalt inhibiert die Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren auf vielfältige Weise (Gendron und Wang, 2007). Sie beschleunigt den Abbau der Transkriptionsfaktoren durch das Proteasom (He et al., 2002). Des Weiteren fördert die Phosphorylierung den Export von BZR1 und BZR2 aus dem Zellkern und deren Zurückhalten im Cytoplasma durch 14-3-3 Proteine (Gampala et al., 2007; Ryu et al., 2007). Es kommt zu einer Hemmung der DNA-Bindung, wodurch die transkriptionelle Aktivität von BZR1 und BZR2 sinkt (Gampala et al., 2007; Gendron und Wang, 2007; Vert und Chory, 2006)

Die extrazelluläre LRR-Domäne des BR1 Rezeptors und Proteine der *SOMATIC EMBRYOGENIC KINASE 1* (SERK1) Familie, inklusive der *BRASSINOSTEROID-ASSOZIIERTEN KINASE 1* (BAK1) verdrehen (verdrillen) sich sehr stark und formen eine integrale BR-binde Tasche. Wird dort BR sensiert, kommt es zu einer Konformationsänderung der cytoplasmatischen Domäne von BRI1 und den SERKs (Li und Chory, 1997; Nam und Li, 2002; Santiago et al., 2013; Sun et al., 2013; Wang et al., 2001; Yin et al., 2002).

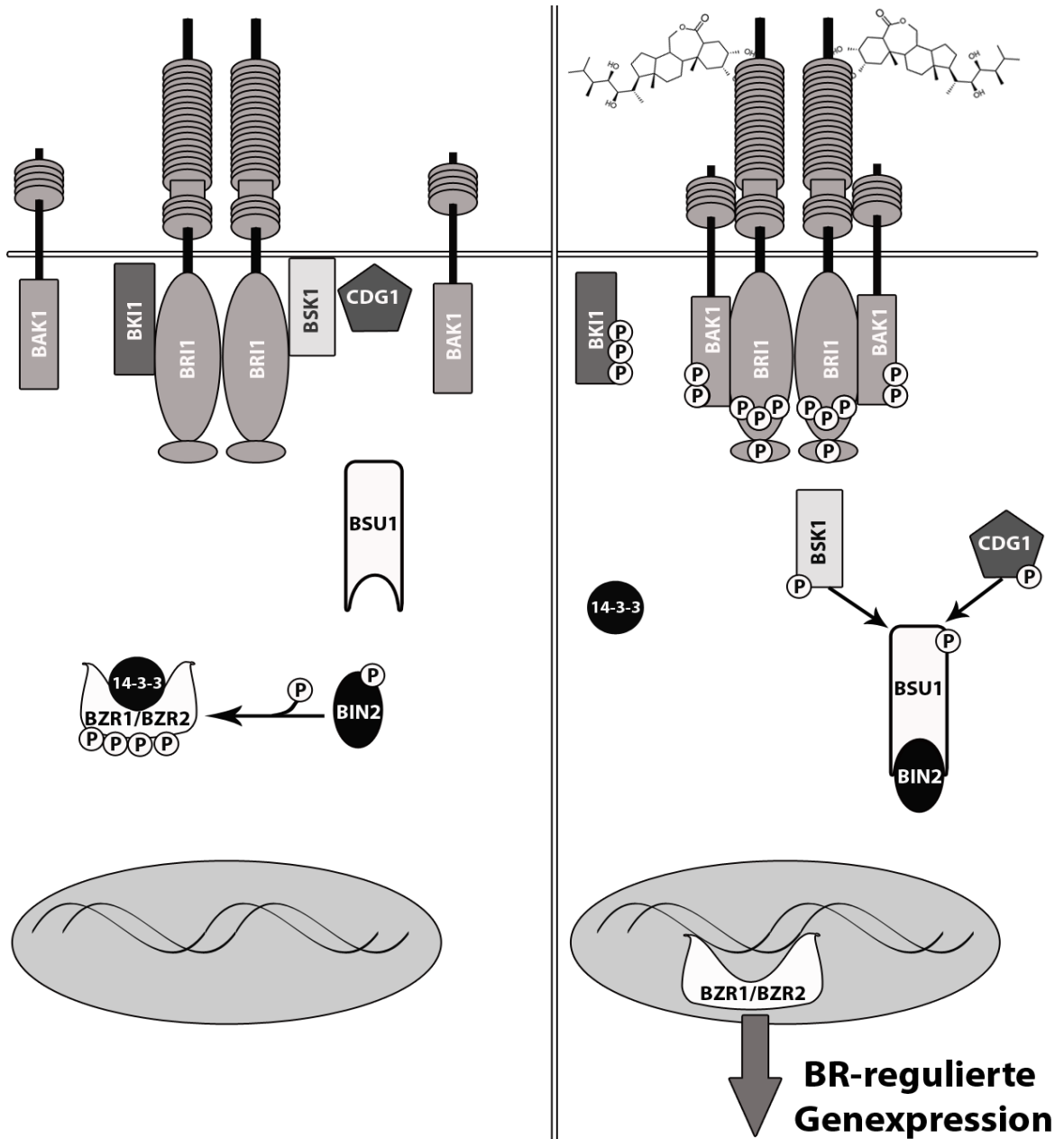


Abbildung 2: Der Brassinosteroid-Signalweg

Pflanzliche Zellen sensieren Brassinosteroid (BR) extrazellulär mit der membrandurchspannenden Rezeptor-ähnlichen Kinase *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1* (BRI1). Ohne die Perzeption von BR (**Abb. links**) verhindert der *BRI1 Kinase Inhibitor 1* (BKI1) die Bindung von BRI1 an seinen Corezeptor *BRASSINOSTEROID-ASSOZIIERTE KINASE 1* (BAK1). Dadurch bleibt die cytosolische Kinase *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2* (BIN2) aktiv und phosphoryliert die Transkriptionsfaktoren *BRASSINAZOLE-RESISTANT 1* (BZR1) und BZR2. Diese werden dadurch von 14-3-3 Proteinen im Cytosol festgehalten und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Bindet BR an BRI1 (**Abb. rechts**) wird BKI1 phosphoryliert und dissoziiert von BRI1. Danach kommt es zur Assoziation und Transphosphorylierung von BRI1 und BAK1. Dieser Signalkomplex aktiviert die Kinasen *BR-SIGNALLING KINASE 1* (BSK1) und *CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1* (CDG1), die wiederum die Kelch-Phosphatase *BRI1 SUPPRESSOR 1* (BSU1) aktivieren. BSU1 dephosphoryliert BIN2, wodurch BIN2 deaktiviert wird. Die Transkriptionsfaktoren BZR1 und BZR2 werden aktiviert und regulieren im Zellkern die BR-regulierte Genexpression.

Die dadurch ausgelöste Transphosphorylierung von BRI1 verstärkt deren Kinaseaktivität, was wiederum zur Ablösung vom inhibitorischen Protein *BRI1 KINASE INHIBITOR 1* (BKI1) führt (Wang und Chory, 2006; Wang et al., 2005). Dazu wird BKI1 von der BRI1-Kinasedomäne phosphoryliert und in das Cytosol entlassen (Jaillais et al., 2011). BAK1 ist ebenfalls eine LRR-RLK und fungiert im BR-Signalweg als Co-Rezeptor für BRI1 (Li et al., 2002; Nam und Li, 2002; Wang und Chory, 2006; Wang et al., 2008).

Neben BRI1 ist BAK1 auch Co-Rezeptor für viele andere LRR-RLKs wie dem Flagelin-Rezeptor *FLAGELLIN SENSING2* (FLS2) (Chinchilla et al., 2007), endogenes *AtPEP Peptid RECEPTOR1* und *2* (PEPR1/PEPR2) (Postel et al., 2010; Tang et al., 2015), *ELONGATION FACTOR TU RECEPTOR* (EFR) (Roux et al., 2011), *PHYTOSULFOKINE RECEPTOR1* (PSKR1) (Ladwig et al., 2015; Wang et al., 2015) und *ERECTA* (Meng et al., 2015).

Ist der BRI1-BAK1-Signalkomplex vollständig aktiviert, phosphoryliert BRI1 die *BR-SIGNALLING KINASE 1* (BSK1) (Tang et al., 2008) sowie die Kinase *CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH 1* (CDG1) und sein Homolog *CDG1-LIKE 1* (CDL1) (Kim et al., 2011; Muto et al., 2004). Die somit aktivierten Kinasen BSK1 und CDG1 phosphorylieren wiederum die Kelch-Phosphatase *BRI1 SUPPRESSOR 1* (BSU1) (Kim et al., 2011).

BSU1 ist eine Serin/Threonin-Phosphatase aus der Familie der Phospho-Protein-Phosphatasen (PPPs). Im Genom von *Arabidopsis* gibt es drei Homologe von BSU1: *BSU1-LIKE 1* (BSL1), BSL2 und BSL3 (Mora-Garcia et al., 2004). In *A. thaliana* sind BSU1 und BSL1 positive Regulatoren des Brassinosteroid-Signalweges (Mora-Garcia et al., 2004). Die beiden anderen Mitglieder der BSU1-Familie, BSL2 und BSL3, wurden nicht genauer untersucht, sind jedoch vermutlich redundant in ihrer Wirkung zu BSU1 und BSL1 (Kim et al., 2011; Kim et al., 2009; Kim et al., 2012).

Das durch BSK1 bzw. CDG1 aktivierte BSU1 dephosphoryliert und deaktiviert das konstitutiv aktive *BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2* (BIN2) (Tang et al., 2010). In Anwesenheit von BR wird BIN2 dephosphoryliert und somit inaktiviert. Nachfolgend wird BIN2 durch die F-Box E3 Ubiquitin Ligase *KINK SUPPRESSED* in *BZR1-1D* (KIB1) zurückgehalten. Somit wird die Bindung von BIN2 an BZR1 und BZR2 verhindert und seine Ubiquitinierung und Degradation vermittelt (Zhu et al., 2017). Inzwischen kommt es zu einer sofortigen Dephosphorylierung von BZR1 und BZR2 (He et al., 2002) durch die heterotrimere Ser/Thr Phosphatase PP2A (Tang et al. (2011)). PP2A wirkt im Cytoplasma als Antagonist von BIN2 und dephosphoryliert BIN2-phosphoryliertes BZR1 (Tang et al., 2011). Dephosphoryliertes BZR1 und BZR2 translokiert aus dem Cytoplasma in den Zellkern, um dort die Genexpression zu beeinflussen (He et al., 2005; Yin et al., 2005).

In verschiedenen Microarray-Experimenten wurden im Laufe der Jahre viele BR-regulierte Gene identifiziert (Goda et al., 2008; Goda et al., 2004; Goda et al., 2002; Mouchel et al., 2006; Mussig et al., 2002; Nemhauser und Chory, 2004; Nemhauser et al., 2006; Sun et al., 2010; Vert et al., 2005). Allerdings überlappen sich die Ergebnisse dieser Experimente nur teilweise, was durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen sowie gewebespezifische Wirkungen von BR erklärt werden könnte. Zusammen konnten in allen Studien 4265 BR-

Einleitung

regulierte Gene identifiziert werden, davon waren 1977 BR-aktivierte Gene und 2169 BR-reprimierte Gene (*Sun et al., 2010*).

Die bHLH Transkriptionsfaktoren BZR1 und BZR2 gehören zu einer Klasse pflanzen-spezifischer Transkriptionsfaktoren mit insgesamt 6 Mitgliedern. Sie binden an die DNA mit einer konservierten, n-terminalen DNA-Bindedomäne (*He et al., 2005; Yin et al., 2005*). Dabei wurde lange davon ausgegangen, dass BZR1 als transkriptioneller Repressor und BZR2 als Transkriptions-Aktivator agiert. So wurde nachgewiesen, dass BZR1 an BR-RESPONSIVE ELEMENTS (BRRE/ CGTGT/CG) von BR-reprimierten Genen bindet (*He et al., 2005*), wohingegen BZR2 mit dem bHLH Transkriptionsfaktor *BES1-INTERACTING MYC-LIKE 1* (BIM1) interagiert und an E-Box Elemente (CANNTG) von BR-induzierten Genen bindet (*Yin et al., 2005*). Neuere Untersuchungen von *Sun et al. (2010)* und *Yu et al. (2011)* konnten zeigen, dass BZR1 und BZR2 ähnliche DNA-Binde Spezifitäten und Transkriptionsaktivitäten haben.

Neue Untersuchungen zeigen, dass BZR1 fast 1000 Gene reguliert (*Sun et al., 2010*). Interessanterweise waren gleich viele BR-reprimierte wie BR-induzierte Gene darunter. Das deutet darauf hin, dass BZR1 als transkriptioneller Aktivator und Repressor von verschiedenen Promotoren tätig ist. So zeigten *Sun et al. (2010)*, dass BZR1 sowie BZR2 an das BR-reprimierte BR-Synthesegen DWF4 und an das BR-induzierte *SMALL AUXIN UPREGULATED* (SAUR)-*AC1* binden. Kompetitive DNA-Bindungsassays zeigten, dass BZR1 und BZR2 ähnliche Bindesequenz-Spezifitäten haben. So wiesen beide eine hohe Affinität zu BRREs und eine geringere Affinität für die E-Box-Domäne von SAUR-AC1 auf (*Sun et al., 2010*). Die Ergebnisse von *Sun et al. (2010)* lassen darauf schließen, dass BZR1 und BZR2 sehr ähnliche biochemische Funktionen ausführen, aber dabei teilweise gleiche Gene auf unterschiedliche Weise regulieren, vielleicht aufgrund überlappender Gewebespezifitäten oder verschiedener Cofaktoren.

Es kommt des Weiteren auch zu einem BZR1- und BZR2-vermitteltem Crosstalk mit anderen hormonellen Signalwegen wie zum Beispiel Gibberelin, Auxin, Abscisinsäure, Ethylen und Strigolacton. Die neuesten Erkenntnisse wurden zusammengefasst von *Li et al. (2018)*. Auf einige erforschte Beispiele wird in der Diskussion (s. Kapitel 4.5) näher eingegangen.

1.3 *P. infestans*, der Auslöser der Kraut- und Knollenfäule

Phytophthora infestans Mont. De Bary ist ein Oomycet, also ein „Eipilz“ aus der Familie der Peronosporaceae. Allerdings handelt es sich nicht um einen echten Pilz. Oomyceten gehören zur Ordnung der Peronosporales im Stamm der Stramenopila, die auch als Heterokontophyta bezeichnet werden. Damit sind sie in direkter Verwandtschaft zu Braunalgen, Goldalgen und Kieselalgen (*Birch und Whisson, 2001; Kamoun, 2003*). Der Begriff Heterokonta bedeutet verschieden begeißelt und bezieht sich auf die zwei Geißeln der beweglichen Zellen, meist eine bewimperte Flimmergeißel vorne und eine glatte Schleppgeißel hinten. Die Familie der Peronosporaceae ist in der Landwirtschaft als falscher Mehltau bekannt. Dieser bildet im Gegensatz zu echtem Mehltau auf der Blattunterseite einen grau-blauen, schimmelartigen Belag, der nicht abwischbar ist.

P. infestans ist der Auslöser der Kraut- und Knollenfäule auf Solanaceen (Nachtschattengewächsen), wie Kartoffel und Tomate, einer der verheerensten Pflanzenkrankheiten auf zweikeimblättrigen Pflanzen weltweit (Kamoun, 2003). Die Kraut- und Knollenfäulebefall tritt akut und abhängig vom Klima sporadisch auf, dann aber mit verheerender Wirkung (Savary et al., 2011). Nur in einigen klimatischen Regionen, wie im Hochland von Zentralmexiko, ist die Kraut- und Knollenfäule eine chronische Erkrankung mit jährlichen Verlusten der suszeptiblen Sorten (Grünwald und Flier, 2005). Die Krankheit breitet sich besonders unter kalten, feuchten Bedingungen rasch aus. Dabei werden die Sporangien, die auf den infizierten Blättern gebildet werden, durch Wind auf die Nachbarpflanze herübergeweht oder von Regentropfen herübergespritzt (Erwin und Ribeiro, 1996). Jährlich liegen die Kosten durch Verluste in der Kartoffelernte und Einsatz von Fungiziden bei rund drei Milliarden US-Dollar weltweit (Duncan, 1999). *P. infestans* ist heterothallich, das heißt er benötigt zwei verschiedene Kreuzungstypen (A1 und A2) für eine sexuelle Reproduktion. Die weltweite *P. infestans* Population vermehrt sich allerdings klonal. Nur im Hochland von Zentralmexiko und in einigen isolierten Regionen Europas konnte sexuelle Reproduktion nachgewiesen werden (Fry, 2008; Fry et al., 2009).

Die Kraut- und Knollenfäule ist für mehrere schwere Hungerkatastrophen in der Vergangenheit verantwortlich, die schwerste davon war im Jahr 1845-46 in Europa. Allein in Irland starben damals eine Millionen Menschen, eine weitere Millionen Iren flüchtete, größtenteils nach Nordamerika. Auch heute kommt es immer wieder zu *P. infestans* Epidemien. Diese Epidemien fielen ab den 1990er Jahren immer häufiger mit der Verbreitung aggressiver und fungizidresistenter Stämme des Kreuzungstypes A2 in Europa und Nordamerika zusammen (vorher war der Kreuzungstyp A1 vorherrschend) (Fry und Goodwin, 1997a; Fry und Goodwin, 1997b; Garelik, 2002; Schiermeier, 2001; Shattock, 2002; Smart und Fry, 2001). Seit 2005 verbreitet sich in Europa der aggressive Genotyp Blue13_A2 (Fry et al., 2009). Er verursachte bereits zwei Jahre später in Großbritannien den größten *Phytophthora*-Ausbruch der letzten 50 Jahre. Blue13_A2 sporuliert bereits bei niedrigeren Temperaturen und durchläuft alle 4,5 Tage einen Infektionszyklus, während die meisten anderen Stämme 7-8 Tage benötigen.

Einleitung

Die genetische Flexibilität von *Phytophthora* und die Coevolution der *P. infestans* Populationen mit den *Solanum* Arten in Zentral- und Südamerika resultierte in einer außergewöhnlichen genetischen Diversität der *P. infestans* Arten mit der alarmierenden Fähigkeit sich extrem schnell an den Selektionsdruck in unserer modernen Landwirtschaft anzupassen (Fry, 2008). Trotz intensiver Bemühungen um die Züchtung resistenter Sorten ist der Erfolg daher nur mäßig (Hein et al., 2009).

1.4 Effektoren von pflanzlichen Pathogenen

1.4.1 Allgemeines

Effektoren sind meist kleine, sekretierte Proteine, die im Apoplasten, außen an der Zelloberfläche oder in der Zelle wirken. Effektoren mit intrazellulärer Wirkweise werden von verschiedenen Pathogenen mit speziellen Strukturen in die Zielzelle eingebracht. Bakterien nutzen ein Typ-III-Sekretionssystem, um ihre Effektoren direkt in die Zellen zu injizieren, ähnlich wie Nematoden mit ihrem Stilet (Block et al., 2008; Davis et al., 2008; Mansfield, 2009). Pilze, Oomyceten und parasitäre Pflanzen penetrieren die Zellwand der Wirtszelle mit einem Haustorium (Gao et al., 2003; Schornack et al., 2009; Westwood et al., 2010). Dabei trennt jedoch eine Membran der Wirtszelle das Haustorium vom Cytoplasma der Zielzelle und regelt den Nährstoffaustausch (Ivanov et al., 2010).

Effektoren manipulieren Vorgänge in oder an der Wirtszelle zum Vorteil des Pathogens. Bei phytopathogenen Bakterien scheinen einige „Kerneffektoren“ essentiell für die Virulenz des Pathogens zu sein; viele andere Effektoren sind jedoch austauschbar (Lindeberg et al., 2012). Der genaue Wirkmechanismus bzw. das genaue Zielprotein im Wirt ist in vielen Fällen immer noch unbekannt, wobei das meiste Wissen über bakterielle Effektoren existiert (Boller und He, 2009; Göhre und Robatzek, 2008; Lindeberg et al., 2012). Effektoren haben vielfältige Aufgaben: Sie unterstützen Pathogene beim Eindringen in das Wirtsgewebe, helfen beim Überdauern im Wirt, unterdrücken Immunantworten (PTI und ETI) und unterstützen bei Nährstoffgewinnung, Zellteilung und Wachstum. Dabei greift die Vielzahl von Effektoren oft auf vielen Ebenen der pflanzlichen Abwehr gleichzeitig ein. AvrPto und AvrPtoB stören gezielt die Aktivierung des *FLAGELLIN-SENSITIVEN* Rezeptors 2 (FLS2) und der *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE* 1 assoziierten Kinase 1 (BAK1) (Shan et al., 2008; Xiang et al., 2008). Mit Effektoren, wie HopF2 und HopAII, blockiert *Pseudomonas* die Aktivierung verschiedener MAP-Kinasen, die an der Weiterleitung der PAMP-Perzeptionssignale beteiligt sind (Wang et al., 2010; Zhang et al., 2007). Da die Induktion der PTI immer auch viele transkriptionelle Veränderungen nach sich zieht, um Immunreaktionen gerichtet zu steuern, zielen viele Effektoren auch direkt auf die Transkription. HopU1 von *P. syringae* modifiziert z.B. RNA-bindende Proteine wie das *GLYZINREICHE-RNA-bindende* Protein 7 (GRP7) und schwächt dadurch die angeborene Immunantwort der Pflanze (Fu et al., 2007; Jeong et al., 2011). Zusätzlich werden Cystein- und Serin-Proteasen, wie HopAR1 und AvrRpt2 aus *P. syringae*, als Effektoren eingesetzt, um Wirtsproteine abzubauen (Gürlebeck et al., 2006).

Ein weiterer angeborener Abwehrmechanismus von Pflanzen ist die proteasomale Degradation. *P. syringae* nutzt diesen Wirtsprozess für seine eigenen Zwecke. Der Effektor AvrPtoB hat eine E3 Ligase Aktivität und ubiquitiniert die cytosolische Tomaten-Kinase Fen sowie die LRR-RLKs FLS2 und BAK1, wodurch diese für die Degradation markiert werden (Göhre et al., 2008; Rosebrock et al., 2007).

Über die Wirkung von Oomyceten-Effektoren ist bisher recht wenig bekannt, allerdings werden in letzter Zeit immer mehr Interaktionspartner und Wirkungsmechanismen aufgedeckt.

1.4.2 Effektoren von Oomyceten

Bei der Sequenzierung der ersten Oomycetengenome, von *Phytophthora infestans*, *P. sojae* und *P. ramnorum*, *Phytium ultimum* und *Hyaloperonospora arabidopsidis* wurden viele Gene identifiziert, die sekretierte Proteine kodieren (Baxter et al., 2010; Haas et al., 2009; Lévesque et al., 2010; Tyler et al., 2006). Oomyceten produzieren sowohl apoplastische als auch cytosolische Effektoren. Sie alle haben ein Signalpeptid für die Sekretion aus dem Haustorium in die extrahaustorielle Matrix.

1.4.2.1 Apoplastische Oomyceten-Effektoren

Es gibt drei Klassen apoplastischer Oomyceten-Effektoren: Inhibitoren von Wirtsproteinen, RGD- (Arginin-Glycin-Aspartat) Proteine und Toxine, die einen Zelltod des Wirtsgewebes auslösen können. Enzyminhibitoren wirken hydrolytischen Wirtsenzymen, wie Chitinasen, Glukanasen und Proteasen, entgegen. So sekretiert *Phytophthora* Kazal-like- und Cystatin-Protease-Inhibitoren um Serin- und Cysteinproteasen zu inhibieren. Die Sekretion von Glukanase-Inhibitoren von *Phytophthora* verhindert eine Freisetzung von Glukan-Fragmenten als Elizitoren der PTI (Kaschani et al., 2010; Rose et al., 2002; Song et al., 2009a; Tian et al., 2004; Tian et al., 2007).

RGD-Proteine, wie IPI-O von *P. infestans*, lösen im Wirtsgewebe die Adhäsion zwischen Zellwand und Zellmembran und stören dabei wahrscheinlich auch Zellwand-assoziierte Abwehrreaktionen, wie die Einlagerung von Callose in die Zellwand (Bouwmeester et al., 2011; Senchou et al., 2004).

Die dritte Klasse apoplastischer Effektoren bilden Toxine, die von nekrotrophen Oomyceten (wie einigen *Phytium*-Arten) und hemibiotrophen Oomyceten (fast alle *Phytophthora*-Arten) sekretiert werden. Man unterscheidet zwei Gruppen von Toxinen: PcF/SCR-Proteine, kleine, sekretierte Hydroxyprolin-enthaltende Toxine (Bos et al., 2003; Liu et al., 2005; Orsomando et al., 2001; Tyler et al., 2006) und NEP1-LIKE PROTEINS (NLPs). NLPs lösen in Dikotyledonen einen Zelltod aus, indem sie sich vermutlich als Pore in die Plasmamembran des Wirtes einfügen (Kanneganti et al., 2006; Qutob et al., 2006).

1.4.2.2 Cytosolische Oomyceten-Effektoren

Effektoren, deren Wirkungsbereich im Cytosol des Wirtes liegt, benötigen ein Translokationssignal, um die Membran der Wirtspflanze zu überwinden.

Drei Klassen von cytoplasmatischen Effektoren konnten anhand ihrer N-terminalen Motive nach dem Signalpeptid zuverlässig vorhergesagt werden: die Crinkler- (CRN), die CHXC- und die RXLR-Effektoren (*Dou et al., 2008b; Haas et al., 2009; Kemen et al., 2011; Rehmany et al., 2005; Schornack et al., 2010; Whisson et al., 2007*).

Am N-Terminus von CRN-Effektoren findet sich typischerweise das LXLFLAK Motiv. Dieses Motiv fungiert in CRNs als Translokationssignal (*Schornack et al., 2010*). Das LXLFLAK-Motiv wurde im Sekretom aller bisher sequenzierter phytopathogener Oomyceten, wie *Aphanomyces euteiches*, *Pythium ultimum*, *Albugo candida* und in den *Phytophthora* Spezies, gefunden (*Cheung et al., 2008; Gaulin et al., 2008; Haas et al., 2009; Lévesque et al., 2010; Schornack et al., 2010*). Daher sind CRNs wahrscheinlich ubiquitär in allen phytopathogenen Oomyceten verbreitet und sind evolutionär sehr früh, noch vor der Entwicklung der Haustorien, entstanden. Der C-Terminus der verschiedenen CRNs ist sehr variabel und löst zum Teil einen Zelltod im Wirtsgewebe aus (*Schornack et al., 2010*).

CHXC-Effektoren wurden bisher vorrangig im Genom des obligat biotrophen Oomyceten *Albugo laibachii* gefunden. Ihr N-Terminus transloziert Effektoren in Pflanzenzellen und sie erhöhen die Virulenz von phytopathogenen Bakterien (*Kemen et al., 2011*).

RXLR-Effektoren sind nach ihrem Arginin-X-Leucin-Arginin-Motiv benannt (*Rehmany et al., 2005*). Der N-Terminus von RXLR-Effektoren besteht aus einem Signalpeptid (für die Sekretion in die extrahaustorielle Matrix), dem RXLR-Motiv und manchmal noch aus einem dEER-Motiv (Aspartat-2xGlutamat-Arginin).

In den Genomen von *P. infestans*, *P. sojae*, *P. ramorum* und *H. arabidopsidis* wurden putative RXLR-Effektoren in großer Zahl und Diversität gefunden (von rund 150 in *H. arabidopsidis* bis >500 in *P. infestans*) (*Haas et al., 2009; Jiang et al., 2008; Win et al., 2007*). In den Genomen entfernter verwandten Oomycetenarten, wie *Aphanomyces euteiches* und *Pythium ultimum*, konnten mittels in silico-Analysen keine RXLR-Effektoren gefunden werden (*Cheung et al., 2008; Gaulin et al., 2008; Lévesque et al., 2010*). Das RXLR-Motiv scheint also größtenteils auf die Klasse der Peronosporaceae begrenzt zu sein.

Das RXLR-Motiv ist wichtig für die Translokation von Effektoren in den Wirt (*Dou et al., 2008b; Whisson et al., 2007*). Es ähnelt in Sequenz, Position und Funktion dem PEXEL/HT-Motiv aus *Plasmodium falciparum* (*Bhattacharjee et al., 2006; Birch et al., 2006*). Dieses PEXEL-Motiv hat die Sequenz RXLX(E/Q) und ist essentiell für die Translokation von Malaria-Proteinen in die Erythrocyten des Wirtes (*Hiller et al., 2004; Marti et al., 2004*). Einen ersten Erklärungsversuch des genauen Aufnahmemechanismus von RXLR-Effektoren lieferte *Kale et al. (2010)*. Seiner bisher sehr kontrovers diskutierten Theorie zufolge bindet das RXLR-Motiv an das Phospholipid Phospho-Inositol-3-Phosphat (PI3P) außen an der Wirtsmembran und ermöglicht so eine Pathogen-unabhängige Effektoraufnahme in die Pflanzenzelle.

Mehrere Publikationen neueren Datums (*Gan et al., 2010; Yaeno et al., 2011*) widersprechen jedoch dieser These, da sie die Ergebnisse von *Kale et al. (2010)* nicht reproduzieren können (*Gan et al., 2010*) bzw. ihre Ergebnisse im Widerspruch zu seiner These stehen (*Yaeno et al., 2011*). Eine aktuelle Untersuchung am *Phytophthora infestans* Effektor AVR3a konnte zeigen, dass bei AVR3a das RXLR-Motiv vor der Sekretion in den extrahaustoriellen Raum abgespalten wird. Desweiteren legt die Untersuchung von *Wawra et al. (2017)* nahe, dass der N-Terminus des reifen AVR3a wahrscheinlich acetyliert ist. Diese Ergebnisse implizieren, dass das RXLR-Motiv von AVR3a für die Sekretion aus dem Pathogen und nicht für die Aufnahme in die Wirtszelle benötigt wird.

So ist zum heutigen Zeitpunkt weder der genaue Translokationsmechanismus von RXLR-Effektoren bekannt, noch existiert eine einheitliche Translokationssequenz. Inzwischen sind verschiedene Variationen dieses RXLR-Motivs bekannt. ATR5, ein Effektor aus *Hyaloperonospora arabidopsidis*, der in *Arabidopsis*-Ökotypen mit dem R-Protein RPP5 Avirulenz vermittelt, hat ein RVRN-Motiv statt eines RXLR-Motivs wie in verwandten Effektoren (*Bailey et al., 2011*). Im Genom von *Pseudoperonospora cubensis* wurden sekretierte Proteine mit Sequenzhomologien zu ATR1 aus *Hyaloperonospora arabidopsidis* und Avr3a aus *P. infestans* gefunden, allerdings haben diese ein QXLR-Motiv (*Tian et al., 2011*).

Auch für die Translokation von *P. falciparum* Effektoren mit PEXEL/HT Motiv wurden verschiedene Mechanismen postuliert. Klar ist, dass ein Großteil des PEXEL-Motives spezifisch im Endoplasmatischen Reticulum (ER) des Parasiten durch die Aspartatprotease Plasmepsin V abgespalten wird (*Boddey et al., 2010; Russo et al., 2010*) und die Effektoren danach eine schrittweise N-Acetylierung durchlaufen, bevor sie über das PTEX-Translocon (Plasmodium Translocon of EXported proteins) unter ATP-Verbrauch aus der parasitären Vakuole in den Erythrocyten sekretiert werden (*de Koning-Ward et al., 2009*). Neueste Erkenntnisse zeigen, dass das PEXEL-Motiv eine Bindung der Effektoren an PI3P im ER des Parasiten vermittelt und so eine Sortierung der Proteine, die in die Wirtszelle transportiert werden sollen, ermöglicht (*Bhattacharjee et al., 2012*).

Der Oomycet *Saprolegnia parasitica* ist ein gefährlicher Fischpathogen. Für den Effektor *S. parasitica* host-targeting protein 3 (SpHtp3) konnte vor Kurzem eine Pathogen-unabhängige Aufnahme in die Fischzelle gezeigt werden. Die Aufnahme wird durch einen gp96-artigen Rezeptor vermittelt. *Trusch et al. (2018)* zeigten des Weiteren, dass der C-terminale Teil mit dem YKARK Motiv und nicht das N-terminale RXLR-Motiv für die Aufnahme wichtig ist. Homologe des gp96 Rezeptors gibt es in verschiedenen Pflanzen. Dieser Aufnahmemechanismus könnte also auch bei anderen Wirt-Pathogen Interaktionen eine Rolle spielen.

Werden Effektoren vom wirtseigenen Immunsystem, z.B. durch (NB-LRR-) R-Proteinen, erkannt, nennt man sie auch Avirulenz- (AVR) Proteine.

Einleitung

In den letzten Jahren wurden viele AVR's aus Oomyceten charakterisiert, darunter Avr1b (Shan *et al.*, 2004) aus *P. sojae*; ATR1 (Allen *et al.*, 2004) und ATR13 (Rehmany *et al.*, 2005) aus *H. arabidopsidis*; AVR3a (Armstrong *et al.*, 2005); AVR4 (van Poppel *et al.*, 2008); AVR-blb1 (Vleeshouwers *et al.*, 2008) und AVR-blb2 (Bozkurt *et al.*, 2011) aus *P. infestans*. Sie alle bringen den Oomyceten einen Vorteil für die Kolonisierung ihres Wirtes. Sie supprimieren z. B. die PAMP-getriggerte Immunität (PTI) oder den programmierten Zelltod (PCD). Die Überexpression von *Avr1b* erhöht die Virulenz von *P. sojae* auf kompatiblen Sojapflanzen und supprimiert den BAX-Zelltod (Dou *et al.*, 2008a). ATR13 supprimiert die Callose-Ablagerungen induziert durch *Pst* DC300 Δ CEL (Sohn *et al.*, 2007). AVR3a aus *P. infestans* bindet und stabilisiert die E3-Ubiquitinligase CMPG1 und verhindert die Induktion des INFESTIN 1 (INF1)-abhängigen Zelltodes in Tabak (Bos *et al.*, 2006). Infestin ist ein PAMP-artiger Elicitor von *P. infestans*, der neben vielen Abwehrreaktionen auch einen Zelltod auslösen kann (Hann und Rathjen, 2007; Heese *et al.*, 2007; Kawamura *et al.*, 2009; Vleeshouwers *et al.*, 2006). Der CMPG1-abhängige Zelltod tritt in Folge der Erkennung einiger Elicitoren außen oder innen an der Wirts-Zellmembran auf. Daher wird vermutet, dass Avr3a CMPG1 beeinflusst, um die ersten Schritte der Pathogen-Perzeption und Signaltransduktion an der Wirtsmembran zu supprimieren (Gilroy *et al.*, 2011b).

Tomczynska *et al.* (2018) zeigten, dass RXLR24 mit verschiedenen RABA GTPasen aus *Arabidopsis* und Kartoffel interagiert. Da die RABA GTPasen wichtig sind für die Vesikelsekretion, wurde dieser Effekt untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass PATHOGENESIS RELATED PROTEIN 1 (PR-1) and DEFENSIN (PDF1.2) in Anwesenheit von RXLR24 im Endoplasmatischen Retikulum verbleiben, statt exportiert zu werden. Somit fungiert RXLR24 wahrscheinlich als Virulenzfaktor durch die Inhibition der vesikulären Exkretion von antimikrobiellen PDF1.2, PR-1 und möglicherweise weiterer Abwehr-relevanter Verbindungen.

Um der Erkennung durch R Proteine zu entgehen, müssen RXLR-Effektoren modifiziert oder angepasst werden. So entkommt *P. infestans* durch den Austausch von nur zwei Aminosäuren im Effektor AVR3a (K⁸⁰I¹⁰³ zu E⁸⁰M¹⁰³) der Erkennung durch das R-Protein R3. AVR1, jedoch nicht sein Homolog A-L wird von R1 erkannt. AVR1 und A-L sind sich strukturell sehr ähnlich jedoch fehlt A-L die 38 Aminosäure-lange T-Region am carboxyterminalen Ende. Du *et al.* (2018) konnten zeigen, dass A-L die Erkennung durch R1 durch die fehlende T-Region und Sequenzunterschiede am konservierten carboxyterminalen Effektormotiv umgeht.

1.4.2.3 Der *P. infestans* RXLR-Effektor PiAVR2

PiAVR2 von *P. infestans* ist mit einer Länge von 116 Aminosäuren ein kleiner RXLR-Effektor. Davon umfasst das Signalpeptid 20 Aminosäuren. Das RXLR-Motiv ist von AS 49 bis 52 und von AS 62 bis 65 ist das EER-Motiv. Damit besteht die Effektordomäne vermutlich aus etwa 50 Aminosäuren (s. Abbildung 3).

PiAVR2 wurde anhand seiner Avirulenzfunktion in einigen Kartoffelsorten identifiziert. Das Resistenzprotein R2 aus der wilden Kartoffelsorte *Solanum demissum* erkennt PiAVR2 spezifisch und es kommt zur HR (Gilroy et al., 2011a). PiAVR2 gehört im *P. infestans* Stamm T30-4 zu einer Familie von 18 Genen, welche für 13 verschiedenen Sequenzen kodieren. Alle diese Proteine sind zwischen 94 und 118 Aminosäuren lang und haben einen ähnlichen C-Terminus (Champouret, 2010; Haas et al., 2009; Vleeshouwers et al., 2011). Im Isolat 06_3928A, welches zum aggressiven Blue13_A2 gehört, wurde eine signifikant divergente Form des Gens gefunden und PiAVR2-like genannt (Gilroy et al., 2011a). PiAVR2-like hat 25 Einzel-Nukleotid-Austausche (SNPs) im Vergleich zu PiAVR2 (s. Abbildung 3). Diese resultieren in 13 Aminosäure-Polymorphismen, wovon acht in der C-terminalen Effektor-domäne liegen (Gilroy et al., 2011a). PiAVR2-like wird nicht von R2 erkannt und das virulente Isolat 06_3928A entkommt damit einer HR in R2-exprimierenden Pflanzen. Gilroy et al. (2011a) konnten weiterhin zeigen, dass in allen getesteten, avirulenten *P. infestans* Isolaten PiAVR2 vorhanden ist, wohingegen in allen virulenten Isolaten PiAVR2-like existiert. Einige Isolate besitzen zwar beide Formen des Gens, allerdings scheint in virulenten Isolaten PiAVR2 nicht transkribiert zu werden, um so eine Erkennung durch R2 zu vermeiden (Gilroy et al., 2011a). R2 gehört zu einer sehr vielfältigen Genfamilie, die auf dem Hauptlokus der Kraut-Knollenfäule-Resistenz im Chromosom IV von Kartoffel (*Solanum tuberosum*) lokalisiert ist (Lokossou et al., 2009; Vleeshouwers et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass auch verschiedene Allele und Orthologe von R2 (u.a. *Rpi-blb1*, *Rpi-blb3* und *Rpi-abpt* aus *S. bulbocastanum*, sowie *R2-like*) aus sechs verschiedenen *Solanum*-Arten PiAVR2 erkennen und so eine Resistenz gegen *P. infestans* ermöglichen (wenn dieser Stamm PiAVR2 exprimiert) (Champouret, 2010; Lokossou et al., 2009).

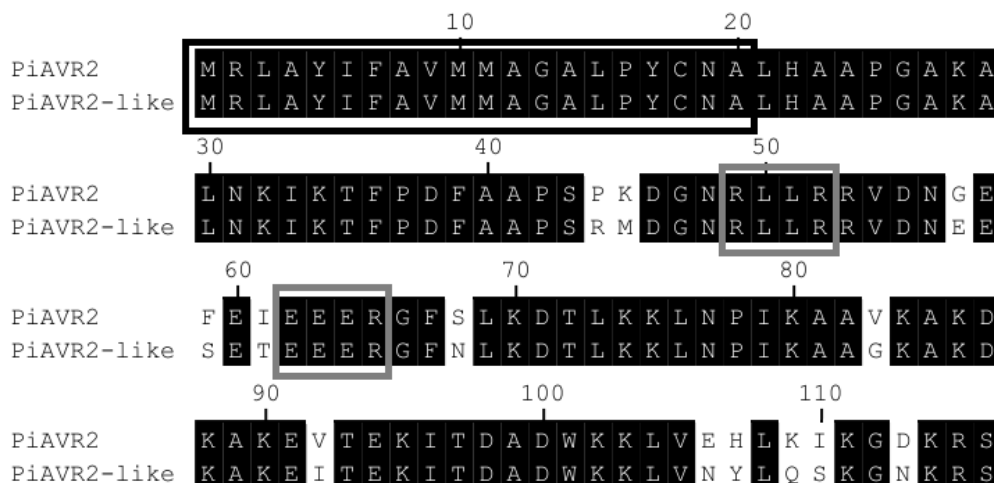


Abbildung 3: Proteinsequenzvergleich von PiAVR2 und PiAVR2-like

Sequenzvergleich der Proteinsequenzen von *PiAVR2* (*PITG_22870* aus Stamm T30-4) und *PiAVR2-like* (= *A2l*; divergentes *PiAVR2*-Gen aus Stamm 06_3928A). Die Sequenzen wurden mittels eines ClustalV-Algorithmus mit MegAlign (DNASar Version 10.0.1) ausgerichtet. Das schwarze Kästchen markiert das Signalpeptid (Sekretionssignal). Die grauen Kästchen zeigen das RXLR- und das EER-Motiv. Die 25 Einzel-Nukleotid-Austausche (SNPs) in der Gensequenz von PiAVR2-like resultieren in 13 Aminosäure-Polymorphismen, wovon acht in der c-terminalen Effektor-domäne liegen.

1.5 Ziel der Arbeit

RXLR-Effektoren sind wichtig für die Kolonisierung des Wirtes. Sie supprimieren das Immunsystem der Wirtspflanze, stören die Ausbildung von Verteidigungsmechanismen, wie die Calloseeinlagerung in die Zellwand, oder verhindern Zelltod-Reaktionen des Wirtes.

Ziel dieser Arbeit war die Erforschung der Funktion des *Phytophthora infestans* RXLR-Effektors PiAVR2. Durch die frühzeitige Identifizierung der Interaktionspartner BSL1, BSL2 und BSL3, welche als positive Regulatoren der Brassinosteroid-Signalweges gelten, wurde der Einfluss von PiAVR2 auf den BR-Signalweg und typische BR-Entwicklungsphänotypen erforscht. In der weiteren Arbeit wurde untersucht, ob die Interaktion mit BSLs und der vermutliche Einfluss auf BR-Signalwege letztendlich auf eine PTI-Suppression abzielt. Die in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden im Modellorganismus *A. thaliana* durchgeführt. *Arabidopsis* ist zwar keine Wirtspflanze von *P. infestans*, jedoch wurde von der Prämisse ausgegangen, dass einige Effektoren auf universelle pflanzliche Faktoren zielen. In *Arabidopsis* stehen viel mehr molekularbiologische und genetische Ressourcen zur Verfügung, so dass die hier erzielten Ergebnisse neue Wege für die Forschung in den Wirtspflanzen aufzeigen konnten.

Zeitgleich wurde im Labor von Paul Birch (SCRI, Dundee, Schottland) an derselben Fragestellung allerdings in den Wirtspflanzen von *Phytophthora infestans*, *N. benthamiana*, Kartoffel und Tomate geforscht (Doktorarbeit Susan Breen & Dione Thurnbull).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden, soweit nicht anders im Text angegeben, von Amersham Biosciences (Freiburg), Biorad (München), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, NL), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Carlsbad, USA), Molecular Probes Inc. (Eugene, USA) und von der Firma Sigma (Steinheim) bezogen. Restriktionsenzyme, Ligasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme wurden von Fermentas (St. Leon-Rot) geliefert. Die verwendeten Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Die Antikörper für die Immundetektionen wurden von Sigma-Aldrich (Taufkirchen), New England Biolabs (Beverly, USA) and Acris Antibodies GmbH (Herford) geliefert. Synthetisch hergestelltes flg22-Peptid wurde freundlicherweise von Georg Felix (ZMBP, Tübingen) zur Verfügung gestellt. Für Medien wurde *Aqua dest.* Wasser verwendet. Chemikalien und Antibiotika wurden in Wasser gelöst, das durch eine MILLI-Q-Apparatur (Direct-Q™ Tap-Fed Water Systems, Millipore, Schwalbach) filtriert wurde.

2.1.2 Nährmedien

In Tabelle 1 sind die verwendeten Nährmedien aufgeführt. Nach Abkühlen auf 60°C wurde den Medien, gemäß Tabelle 2, die für die Selektion erforderlichen Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugegeben. Es wurden entweder flüssige Nährmedien eingesetzt oder zu den Bakterienmedien 15 g/l Agar (Roth) und zu ½ MS – Medium 8 g/l Agar-Select (Sigma) hinzugefügt.

Tabelle 1: Verwendete Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe
LB	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
½ MS	2,2 g/l MS-Salz (Invitrogen); 10 g/l Saccharose; pH 5,6-5,7, bei Bedarf 0,8% Agar (Roth)
YEBS	1 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 5 g/l Glucose, 5 g/l Bacto-Pepton, 0,5 g/l Magnesiumsulfat; pH 7
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)

Material und Methoden

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Lösungsmittel
Ampicillin	50 µg/ml	50% Ethanol
Kanamycin	50 µg/ml	Wasser
Chloramphenicol	25 µg/ml	Ethanol
Gentamycin	25 µg/ml	Wasser
Rifampicin	50 µg/ml	DMSO
Spektinomycin	100 oder 200 µg/ml	Wasser
Tetracyclin	12,5 µg/ml	50% Ethanol

2.1.3 Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen

Die verwendeten Bakterienstämmen sind mit ihren Genotypen in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Verwendete Bakterienstämmen.

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5α	F-(φ80 <i>dlacZ</i> Δ M15) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K - m _K ⁺) <i>deoR, thi-1phoA supE44 glnV44 λ - gyrA96 relA1</i> F-
	<i>ccdB</i> Survival TM -T1R	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> Δ139 D(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG tonA::Ptrc -ccdA</i> (Invitrogen)
	One Shot® TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 ara</i> D139 Δ(<i>ara-leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG λ-</i> (Invitrogen)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90	T-DNA ⁻ vir ⁺ Rif ^r pMP90 Gent ^r (Koncz und Schell, 1986)
	C58C1[pGV2260]	C58C1 pTiB6s3ΔT Rif ^r Carb ^r (Deblaere et al., 1985)

2.1.4 Verwendete Plasmide

Alle für diese Arbeit benötigten Plasmide sind in Tabelle 4 charakterisiert.

Tabelle 4: Verwendete Plasmide

Vektor	Charakteristika	Verwendung
pDONR201/221 Gateway	ori pUC rrnB T2 rrnB T1 attP1 und attP2 ccdB Cm ^r Kan ^r / Gent ^r	Eingangsvektoren für Gateway®-Klonierung (Invitrogen)
pCR4.1_Topo Gateway	pUC ori Plac lacZ-ccdB Kanr Ampr	Eingangsvektor für TOPO-Klonierung (Invitrogen)
p2GW7 (VIB) Gateway	p35S t35S attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Gateway®-Expressionsvektor ohne Fusion (http://www.vib.be)
P2GWF7 (VIB) Gateway	p35S t35S eGFP attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Vektor für carboxyterminale GFP-Fusion (http://www.vib.be)
p2FWG7 (VIB) Gateway	p35S t35S eGFP attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Gateway®-Expressionsvektor für aminoternale GFP-Fusion (http://www.vib.be)
p2GWR7 (VIB) Gateway	p35S t35S rfp attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Gateway®-Expressionsvektor für carboxyterminale RFP-Fusion (http://www.vib.be)
p2RWG7 (VIB) Gateway	p35S t35S rfp attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Gateway®-Expressionsvektor für aminoternale RFP-Fusion (http://www.vib.be)
p2KozHAGW7 Gateway	p35S t35S 3xHA attR1 und attR2 ccdB Cmr Ampr	p2GW7 (VIB) modifiziert für aminoternale HA-Fusionsproteine
p2KozMycGW7 Gateway	p35S t35S 3xmyc attR1 und attR2 ccdB Cmr Ampr	p2GW7 (VIB) modifiziert für aminoternale myc-Fusionsproteine
pGreenII0229	pSaOri LB nos-bar lacZ RB ColE1 ori BASTA ^r	Binärer Vektor für Überexpression in Pflanzen http://www.pgreen.ac.uk/JIT/pG0229.htm
pSOUP	ColEI ori, oriV, RepA, trf ^A , MCS, Tet ^r	Helferplasmid (<i>Hellens et al., 2000</i>)
pK7FWG2 (VIB) Gateway	p35S t35S eGFP attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Kan ^r Sm/Sp ^r	Binärer Vektor für carboxyterminale eGFP-Fusion (http://www.vib.be)
pTA7002	p35S GAL4 VP16 GR nos-Hpt 6xGAL4 _UAS p35S MCS	binärer Vektor zur Expression nach Induktion mit Dexamethason; (<i>Aoyama und Chua, 1997</i>)
pABind_FRET Gateway	G10-90 XVE hpt <i>lexA</i> GFP-mCherry T3A attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Sp ^r	binärer FRET-Vektor; Expression induziert durch Estradiol; (<i>Bleckmann et al., 2010</i>)
pABind_mCherry Gateway	G10-90 XVE hpt <i>lexA</i> mCherry T3A attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Sp ^r	binärer FRET-Vektor; Expression induziert durch Estradiol; (<i>Bleckmann et al., 2010</i>)

2.1.5 Verwendetes Pflanzenmaterial

In den durchgeführten Analysen wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen des Ökotyps Columbia 0 (Col-0) verwendet.

2.2 Anzuchsbedingungen

Zur Anzucht von Flüssigkulturen wurden Innova®44 Schüttler der Firma New Brunswick Scientific (Nürtingen) eingesetzt.

2.2.1 Anzucht von *E.coli*

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle *E.coli* Stämme entweder auf LB-Agar im Inkubator bei 37°C oder in LB-Medium bei 37°C mit 220 Upm für 18 h kultiviert. Je nach Bakterienstamm und transformiertem Plasmid wurden zur Selektion die entsprechenden Antibiotika in den benötigten Konzentrationen (s. Tabelle 2) zugegeben.

2.2.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens der Stämme GV3101 und C58C1 wurden auf YEBS-Agar oder in YEBS-Medium mit den benötigten Antibiotika angezogen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 28°C und die Flüssigkulturen wurden bei 28°C mit 220 Upm kultiviert.

2.2.3 Anzucht von *A. thaliana* Zellkulturen

Die Zellkulturen wurden im Dunkeln bei 26°C und 120 Upm in MSCol-Medium angezogen und einmal wöchentlich in frisches Medium überimpft. Die Kultivierung erfolgte durch die zentrale Einrichtung für Pflanzentransformation des ZMBP der Universität Tübingen.

2.2.4 Anzucht der Versuchspflanzen

Die Samen der Versuchspflanzen wurden auf dampfsterilisierter, vermikulit angereicherter GS90-Erde (Gebrüder Patzer, Sinntal) oder nach mindestens 3-stündiger Oberflächensterilisation mit Chlorgas auf ½ MS ausgesät. Nach Stratifikation über Nacht bei 4°C erfolgte die Anzucht in Pflanzenkammern. Je nach Versuchsbedingungen wurden die Pflanzen entweder unter Kurztag- (8 h Licht mit 150 µmol/m²s / 16 h Dunkel), Langtag- (16 h Licht und 8 h Dunkelheit) oder Dauerlichtbedingungen angezogen. Die Temperatur betrug in allen Fällen 22°C und die Luftfeuchtigkeit lag bei 40-60%.

2.3 Transformationen

2.3.1 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden bei -80°C aufbewahrte Aliquots chemisch kompetenter DH5 α -Zellen, OneShot®-Top10™ Zellen (Invitrogen) oder *ccdB* Survival™-T1R (Invitrogen) auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Vektor-DNA und kurzem Mischen wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe 45 Sek. im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und nach Zugabe von 250 μl LB-Medium für eine Stunde bei 37°C mit 220 Upm inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde dann kurz zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet im Rücklauf resuspendiert. Die Hälfte dieser konzentrierten Bakterienlösung wurde auf die entsprechenden selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und diese dann über Nacht bei 37°C kultiviert.

2.3.2 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobakterien der Stämme GV3101 oder C58C1 wurden in 1 ml Übernachtskultur in LB-Medium bei 28°C mit 180 Upm angezogen. Mit dieser Vorkultur wurden 200 ml LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde bei 28°C mit 180 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,5 bis 0,8 kultiviert und dann bei $2650 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen, in 20 ml LB resuspendiert und in 250 μl Aliquots aufgeteilt und diese dann nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Nach Auftauen auf Eis, wurde zu den 250 μl Aliquots die zu transformierende Plasmid-DNA gegeben und die *Agrobakterien* bei 1800 V elektroporiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte eine zweistündige Inkubation unter Schütteln (180 Upm) bei 28°C . Die *Agrobakterien* wurde dann 5 min bei $4500 \times g$ und 4°C pelletiert und zu einem Endvolumen von 450 μl in LB-Medium wieder resuspendiert. Es wurden dann je 50 μl und 400 μl auf den entsprechenden selektiven LB-Agar Platten ausplattiert und diese für 48 h bei 28°C inkubiert.

2.3.3 Transformation von *A. thaliana* Zellkultur-Protoplasten

Die Protoplasten einer drei Tage alten Vorkultur (10 ml) wurden bei $400 \times g$ für 5 min geerntet und zweimal mit Zellwandverdauungspuffer ohne Enzyme (8 mM CaCl_2 ; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 7 ml Zellwandverdauungspuffer (1 % (w/v) Zellulase; 0,25 % (w/v) Mazerozym; 8 mM CaCl_2 ; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) aufgenommen und in eine Petrischale gegeben. Nach sechsstündiger Inkubation bei 26°C mit 50 Upm wurden die Protoplasten geerntet und nochmals mit Zellwandverdauungspuffer ohne Enzyme gewaschen ($100 \times g$, 5 min). Das Zellpellet wurde nach Entfernen des Überstands in der verbleibenden Lösung vorsichtig resuspendiert und langsam unter Zugabe von 10 ml W5-Lösung (154 mM NaCl; 125 mM CaCl_2 ; 5 mM KCl; 5 mM α -D-Glucose; pH 5,8-6,0) äquilibriert.

Material und Methoden

Nach erneuter Zentrifugation bei 100 x g für 5 min und Aufnahme in 10 ml W5-Lösung wurde ein Aliquot abgenommen und 20 min bei 4°C im Dunkeln gelagert, um darin die Zellzahl zu bestimmen. Nach Zentrifugation (100 x g, 5 min) der restlichen Lösung wurde das Pellet zu einer Zelldichte von 2×10^6 Protoplasten/ml in MMM-Lösung (15 mM MgCl₂; 0,1 % MES (w/v); 0,5 M Mannitol; pH 5,8) aufgenommen und in 250 µl Proben aliquotiert. Zu einem Aliquot wurden 20-25 µg Plasmid-DNA gegeben, langsam 250 µl PEG-Lösung (40 % (w/v) PEG 4000; 0,4 M Mannitol; 0,1 M Ca(NO₃)₂; pH 8,0-9,0) zupipettiert und 15-20 min inkubiert. Sukzessive wurden 10 ml W5-Lösung zugegeben, anschließend zentrifugiert und die Zellen in 2 ml K3-Lösung (1,5 g/l NaH₂PO₄ * H₂O; 9 g/l CaCl₂; 25 g/l KNO₃; 2,5 g/l NH₄NO₃; 1,34 g/l (NH₄)₂SO₄; 2,5 g/l MgSO₄ * 7H₂O) bei 26°C etwa 18 h im Dunkeln inkubiert.

2.3.4 Transformation von *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten

Mesophyll-Protoplasten wurden nach *Yoo et al. (2007)* aus 4,5 Wochen alten *A. thaliana* Col-0 Pflanzen isoliert, auf eine Konzentration von 2×10^5 Pp/ ml verdünnt und transformiert. Für den Luciferase-Assay wurden die Protoplasten 6-24h bei 20°C im Dunkeln inkubiert, bevor durch Zugabe von Luciferin der Assay gestartet wurde. Für Lokalisationsstudien betrug die Expressionszeit der Protoplasten 18 h und für Immundetektionen 24 h. Die Anzahl der lebenden Protoplasten wurde, wie in *Bush et al. (1986)* beschrieben, durch Doppelfärbung mit 50 mg/ml Fluorescein-Diazetat und 10 mg/ml Propidiumjodid 24 h nach der Transformation mikroskopisch bestimmt (s. Kapitel 2.6.9).

2.3.5 Transformation von *A. thaliana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. thaliana* Col-0 Pflanzen mit *A. tumefaciens* wurde nach dem Protokoll von *Davis et al. (2009)* durchgeführt. Die Agrobakterien wurden dazu in einer 50 ml Vorkultur in YEBS bis zur Sättigung der Zelldichte angezogen, diese dann zu 450 ml YEBS hinzugefügt und weitere 8h kultiviert. Nach Zugabe von 150 µl Silwet L-77, wurden junge Blütenstände von *Arabidopsis* 3 Sek. in der Bakterienlösung geschwenkt und dann für 24 h mit einer Plastiktüte abgedeckt. Danach wurden die Pflanzen zum Abreifen im Langtag kultiviert.

2.3.6 Transformation von *Nicotiana benthamiana* mittels *A. tumefaciens*

Die *Agrobakterien* (s. Kapitel 2.3.2) wurden in 10 ml Kulturen über Nacht bei 28°C mit 180 Upm angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (4500 x g, 4 °C, 5 min) und die Pellets mit 10 mM MgCl₂ gewaschen und anschliessend zu einer OD₆₀₀ von 1 in einer Lösung aus 10 mM MgCl₂ und 150 µM Acetosyringon aufgenommen. Anschließend wurden diese *Agrobakterien* zu gleichen Teilen mit p19-tragenden *Agrobakterien* gemischt. P19 ist ein *Silencing*-inhibitor aus *tomato bushy stunt virus* (*Hearne et al., 1990*), so dass die Expressionsrate der zu transformierenden Proteine erhöht werden kann (*Voinnet et al., 2003*). Die Suspension wurde 2 h bei RT inkubiert und danach mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseite von ca. 5 Wochen alten Tabakpflanzen infiltriert.

Die Blätter wurden nach zwei bis drei Tagen geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend erfolgte eine Proteinextraktion für Co-Immunoprecipitations-Experimente (s. Kapitel 2.6.3 und 2.6.4).

2.4 DNA-Analytik

2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis*-Pflanzen

Ein Blattstück der betreffenden *Arabidopsis*-Pflanzen wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit einem Plastikpistill unter Zugabe von 200 µl Edwardspuffer (200 mM Tris/HCl, pH 7.5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8; 0,5% SDS (w/v)) gemörsert. Danach wurden alle festen Bestandteile bei 18506 x g und 4°C 5 min pelletiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 200 µl Isopropanol wurde die DNA ausgefällt und anschließend bei 18506 x g und 4°C in 10 min herunterzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (18506 x g, 4°C, 5 min), getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 über Nacht bei 4°C resuspendiert.

2.4.2 Plasmid-Präparation aus *E.coli* DH5α

2.4.2.1 Plasmid-Minipräparation aus DH5α-Zellen mittels alkalischer Lyse

Für Anwendungen, die nicht allzu hohe Reinheit der Probe erforderten, wurde Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse extrahiert. Dazu wurden 2 ml Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterien in LB-Medium mit selektiven Antibiotika bei 37°C mit 220 Upm angezogen. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 200 µl Puffer 1 (25 mM Tris/HCl pH 8; 10 mM EDTA; 50mM Glucose; 0,1 g/l *RNase*) resuspendiert. Durch Zugabe von 400 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS) wurden die Bakterien lysiert. Nach Zugabe von 300 µl Puffer 3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5 und 11,5% (w/v) Essigsäure) wurde der Ansatz für 3 min auf Eis inkubiert und anschließend 10 min bei 18506 x g und 4°C zentrifugiert. Damit wurden sowohl Zelltrümmer als auch Proteine ausgefällt. Aus dem wässrigen Überstand wurde die DNA mit 700 µl Isopropanol ausgefällt und anschließend abzentrifugiert (18506 x g, 4°C, 20 min). Das Pellet wurde nach dem Waschen mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol und der vollständigen Trocknung in 40 µl H₂O_{dd} aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.4.2.1 Plasmid-Minipräparation mittels *QIAprep spin Miniprep kit* (QIAGEN)

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Probe erforderten, wurde Plasmid-DNA mit dem *QIAprep spin Miniprep kit* der Firma QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.2.2 Plasmid-Midipräparation mittels *Promega Midiprep kit*

Für die Transformation von Protoplasten, die eine hohe Reinheit und große Mengen von Plasmid-DNA erforderte, wurde die DNA aus 150 ml Übernachtskulturen des entsprechenden Bakterienstammes mittels des *Promega Midiprep kits* nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.3 Plasmid-Minipräparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Plasmid-Minipräparation aus den entsprechenden *Agrobakterien* wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 13000 x g und RT 3 min pelletiert. Nachdem das Pellet in 100 µl Lösung I (450 g/l Glucose; 200 g/l *Lysozym*; 0,25 M EDTA; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und diese Suspension 30 min bei RT inkubiert worden war, wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (200 µM NaOH; 1 % (w/v) SDS) zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurden 30 µl alkalisches Phenol (1 ml Phenol; 60 µl 1 M NaOH) zugegeben, schnell gemischt und sofort 150 µl Kaliumacetatpuffer (60 % (v/v) 5 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure) hinzugefügt. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer und ausgefallten Proteine bei 18506 x g und RT für 10 min wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) gemischt und abzentrifugiert (18506 x g; RT; 5 min). Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. Chloroform gemischt und zentrifugiert (18506 x g; RT; 10 min). Aus der so gewonnenen wässrigen Phase wurde dann mit 500 µl Isopropanol die Plasmid-DNA 5 min bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (20800 x g; 4°C; 15 min) wurde das resultierende Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 40 µl H₂O_{dd} gelöst.

2.4.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in Lösung

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und Reinheit wurde mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Scientific, Willmington, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.5 Restriktionsverdau

Es wurden 2 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10 x Reaktionspuffer und 0,2 µl Restriktionsenzym mit H₂O_{dd} auf 19,75 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 2 h bis 16 h inkubiert und dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.4.6 Klonierung

Die Klonierung von PCR-Produkten in den pCR4-TOPO erfolgte nach Angaben des Herstellers. Für Gateway®-Klonierungen wurden die Anleitung des Herstellers für eine zweistufige PCR verwendet, in der eine PCR mit genspezifischen Primern als Inokulum für eine PCR mit Adapter-Primern (*attB1* und *attB2*; s. Tabelle 12) diente. Die so hergestellten Eingangsvektoren mit spezifischen Genen wurden nun für LR-Rekombinationen in die verschiedenen Gateway®-Zielvektoren (s. Tabelle 4) verwendet. Für Rekombinationen in carboxyterminale Fusions-Vektoren wurde, wie im Gateway® Protokoll beschrieben, das STOP-Kodon am Ende des Genes in der genspezifischen PCR entfernt. Von diesem LR-Ansatz wurden 2 µl in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem für den Expressionsvektor spezifischen Antibiotikum.

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* Pflanzen wurden zwei verschiedene Vektoren benutzt. Zum Generieren von Überexpressionslinien wurde pGreenII0229 verwendet, wohingegen für Pflanzen mit induzierbarer Expression des PiAVR2-Proteins der Vektor pTA7002 eingesetzt wurde.

PiAVR2 wurde mittels Gateway®-Technologie in p2GW7, p2FGW7 und p2KozHAGW7 inseriert. Der Vektor pGreenII0229 hat keinen Promoter für die Expression in Pflanzen. Daher wurde

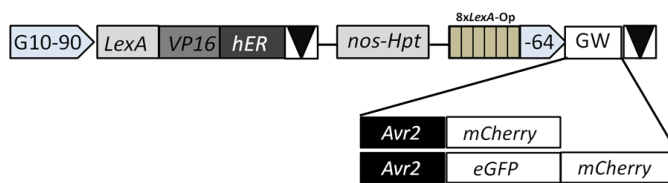
mittels Restriktionsverdau (*XhoI* und *SpeI*) die gesamte Expressions-Kassette p35S::GFP/3xHA::*PiAVR2*::t35S aus den Vektoren p2FGW7_*PiAVR2* oder p2KozHAGW7_*PiAVR2* entnommen und in pGreen ligiert. Die Selektion erfolgte in *E. coli* und in *A. tumefaciens* C58C1 jeweils mit Kanamycin sowie in Pflanzen mit Glufosinat (BASTA).

Für die Klonierung der induzierbaren Pflanzen-Vektoren wurde *PiAVR2* mit der kodierenden Sequenz des EGFP aus p2FGW7 mittels PCR amplifiziert. Durch die verwendeten Primer (ptaGFPfor und ptaAVR2rev) wurden die Amplikons um *XhoI* und *SpeI* Schnittstellen erweitert und konnten darüber in pTA7002 ligiert werden. Die Selektion in *E. coli* und *A. tumefaciens* GV3101 erfolgte jeweils mit Kanamycin sowie in Pflanzen mit Hygromycin.

Für die transiente Expression in Tabak wurde *BSU1*, *BSL1*, *BSL2* und *BSL3* jeweils mittels Gateway®-Technologie in PUGT2 kloniert. Dadurch entstanden aminoterminal GFP-Fusionsproteine, deren Expression unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors ist. Die transiente Expression von PiAVR2-RFP in Tabak erfolgte mit dem Konstrukt für die FRET-Messung (s. Kapitel 2.6.11) Die entstandenen Konstrukte sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Material und Methoden

XVE-Expressionssystem in *pABind* und *pABindFRET*



GVG-Expressionssystem in *pTA7002*



pUbiquitin10-Überexpressionssystem in *pUGT2*



35S-Überexpressionssystem in *pGreenII0229*

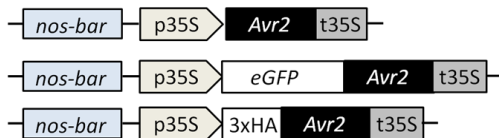


Abbildung 4: Verwendete Expressionssysteme.

Schematische Darstellung von Ausschnitten aus den in dieser Arbeit für die Pflanzentransformation verwendeten Vektoren. p35S = *CaMV* 35S Promotor; t35S = *CaMV* 35S Terminator; *Gal4* = AS 1-47 der *Gal4* Bindedomäne von *Saccharomyces cerevisiae*; *VP16* = Transkriptions-Aktivierungsdomäne *VP16* aus *Herpes simplex*; *rGR* = Ligandenbindedomäne des Glucocorticoid-Rezeptors aus Ratte; *Gal4-UAS* = *Gal4-Upstream Activation Signal*; Hygromycin-Resistenzgen unter der Kontrolle des Nopalins-Synthase Promotors; *LexA* = AS 1-87 des *E. coli lexA* Repressors; *hER* = Ligandenbindedomäne des menschlichen Östrogenrezeptors; *LexA-Op* = *LexA-Operator*; G10-90 = synthetischer Promotor (8x stärker als p35S); -64 = p35S Minimalpromotor; eGFP = verstärktes (enhanced) grünfluoreszierendes Protein; mCherry = rotfluoreszierendes Protein; MCS = *Multiple Cloning Site*; GW = Gateway Kasette; pUBQ10 = Ubiquitin 10 Promotor; rbs 3' = Terminator; schwarzer Pfeil nach unten = Poly(A)-Signal

XVE- und GVG-Expressionssystem: Abbildung modifiziert aus *Moore et al. (2006)*

2.4.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das Gemisch für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen bestand, sofern nicht anders angegeben, aus 0,5 μM 5'- und 3'-Primern (MWG), 0,125 mM dNTP Gemisch (Biomaster), 1x Taq-Polymerase Puffer (Fermentas), 1 μl genomischer DNA oder cDNA aufgefüllt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ zu 19 μl und 0,05 U/ μl Taq-Polymerase (freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Nina Jaspers). Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Allgemeinen mit folgendem Programm: 94°C für 2 min, 22-40x: 94°C für 15 Sek., T_{anneal} für 30 Sek., 72°C für 1 min pro kb und dann 72°C für 10 min und 20°C für immer. Die Reaktionen wurden mit dem Gerät PTC-200 der Firma MJ Research (Waltham, USA) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 12 aufgelistet.

2.4.8 Transkriptanalyse durch quantitative real time PCR (qPCR)

qPCR Amplifikationen und Messungen wurden mit einem iQ5 Multicolour Real Time PCR Detektionssystem (Bio-Rad) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Amplifikation wurde mit dem Maxima[®] SYBR Green/Fluorescein qPCR Master Mix (Fermentas) detektiert. Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte unter Berücksichtigung der PCR-Effizienz mittels der qPCR Amplifikation einer cDNA-Verdünnungsreihe mit dem Faktor fünf (1:1, 1:5, 1:25 und 1:125). Die Expressionsniveaus wurden mit Hilfe der C_t Werte des *Aktin* Gens normalisiert. Das Vorhandensein eines einzelnen, spezifischen PCR-Produktes wurde durch Schmelzpunktanalyse und Agarosegelelektrophorese (s. Kapitel 2.4.9) überprüft. Die Quantifizierung wurde aus drei biologischen, mit je zwei technischen Replikaten bestimmt. Dabei wurde die relative Expression durch die iQ5 Software unter Einbeziehung der PCR Effizienz bestimmt. Die Standardabweichung wurde aus den biologischen Replikaten errechnet.

2.4.9 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Es wurden 0,8 – 2% ige Agarosegele in 1 X TAE-Puffer [aus 50 X TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat pH 8,0; 100 mM EDTA pH 8,0) hergestellt] bei einer angelegten Spannung von 5 V/cm Elektrodenabstand verwendet. Die zu analysierenden Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 1 x Ladepuffer (5 x Gelladepuffer: 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 5 x TAE; 30 % (v/v) Glycerol) versetzt. In allen Experimenten wurde GeneRuler[™] 1 kb DNA ladder (Fermentas) als Größenstandard eingesetzt. Die Zugabe von Ethidiumbromid zu einer Endkonzentration von 0,01 µg/ml Agarosegel ermöglichte die Visualisierung der DNA im Gel mittels eines UV-Transilluminators.

2.4.10 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die mit Ethidiumbromid angefärbten, zu reinigenden DNA-Banden wurden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die DNA wurde danach mit dem *QIAEX II Agarose gel extraction kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.11 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung der Vektoren wurde jeweils 30 µl 150 ng/µl DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (s. Kapitel 2.4.2.1) mit den entsprechenden Primern an GATC (Konstanz) gesandt.

2.4.12 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Daten, die nach Sequenzierung erhalten wurden, wurden mittels der Lasergene DNA*STAR Software ausgewertet. Außerdem wurde zu weiteren Sequenzanalysen das öffentlich zugängliche Software ClustalW (www.ebi.ac.uk/clustalw) und CLC-Workbench (Aarhus, Dänemark) genutzt.

2.5 RNA-Analytik

2.5.1 Isolierung von RNA aus Blattmaterial

Es wurden pro Probe 2-16 Blätter geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Pistill gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (Invitrogen) zu 100 mg Blattpulver wurde das Gemisch unter Vortexen aufgetaut und 10 min bei RT belassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, etwa 15 sek gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 18506 x g und 4°C für 15 min wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und zehnmütiger Inkubation bei RT gefällt. Das nach Zentrifugation (18506 x g, 4°C, 10 min) erhaltene Pellet wurde mit 70 %igem (v/v) Ethanol (in DEPC-behandeltem H₂O) gewaschen, getrocknet und in 20 µl nukleinsäurefreiem H₂O (Fermentas) wieder gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (s. Kapitel 2.4.4)

2.5.2 DNase-Verdau isolierter RNA und Reverse Transkription

Die Trizol-isolierte RNA wurde mit nukleinsäurefreiem H₂O (Fermentas) auf eine Konzentration von 0,2µg/µl verdünnt. 9 µl davon wurden mit 1 µl *rDNase* (Machery-Nagel, 1:10 verdünnt in *rDNase* Reaktionspuffer) nach Angaben des Herstellers 20 min verdaut und danach die Reaktion mit 1 µl *DNase*-Stop-Puffer (25 mM EDTA) und zehnmütiger Inkubation bei 65°C beendet. Mit diesen 11µl DNA-freier RNA wurde nun die cDNA-Synthese mithilfe der MMuLV (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*) Reversen Transkriptase (Fermentas) in einem Gesamtvolumen von 20µl nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.3 Mikroarrayanalysen

RNA wurde aus je 9 *A. thaliana* Pflanzen isoliert (s. Kapitel 2.5.1). Es wurden drei unabhängige Experimente als Replikate angefertigt. Die Mikroarrayanalysen wurden vom Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (Loughborough, UK) durchgeführt. Es wurden Aragen st 1.0 gene chips von Affimetrix entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Die Sondensignale wurden über alle Arrays normalisiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software GeneSpring GX 7.3.1 von Agilent. Um die Expressionsniveaus zu errechnen, wurden die normalisierten Sondensignale dem *robust multi-array average* (RMA) Algorithmus (Irizarry *et al.*, 2003) unterzogen. Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der ImFit Funktion aus dem Softwarepaket „Linear Models for Microarray Data“ (limma) analysiert (Smyth, 2004). Die eBayes Funktion der Software limma wurde verwendet, um p-Werte, die q-value Funktion und Storey q-Werte (Storey, 2003) zu errechnen.

2.6 Protein-Analytik

2.6.1 Verwendete Lösungen

Tabelle 5: Verwendete Lösungen für die Proteinanalytik

Lösung	Inhaltsstoffe
SDS-Probenpuffer	50 mM Tris/HCl pH6,8; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau; 100 mM DTT
IP-Extraktpuffer	50 mM HEPES pH 7,4; 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 0,1% Triton X-100; 1x Protease Inhibitor Cocktail [Roche], 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail [Roche]
Waschpuffer	50 mM HEPES pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,2% Triton X-100; 1x Protease Inhibitor Cocktail [Roche], 1x Phosphatase Inhibitor Cocktail [Roche]
Elektrophorese-Puffer	25 mM Tris; 0,25 M Glycin pH 8,3; 0,2 % (w/v) SDS
Blockinglösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBST
TBST	20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20
AP-Puffer	15mM Tris/HCl pH 9,5; 0,5mM MgCl ₂ ; 10mM NaCl; 250 ng/ml BCIP; 250 ng NBT

2.6.2 Zellaufschluss von *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten

Für die Expressionskontrolle von *A. thaliana* Protoplasten (s. Kapitel 2.3.4) wurden 20-24 h nach der Transformation 100 μ l bei 18506 x g für 5 Sek. zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 μ l 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. 20 μ l davon wurden per SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert (s. Kapitel 2.6.7).

2.6.3 Zellaufschluss von Blattmaterial

Für die Expressionskontrolle von *A. thaliana* und *Nicotiana benthamiana* wurde je eine Blattscheibe mit 5 mm Durchmesser aus einem Blatt ausgestochen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Mit einem gekühltem Pistill wurde die Blattscheibe gemörsert und nach Zugabe von 20 μ l IP-Extraktionspuffer solange auf dem Vortex gemischt, bis die Probe aufgetaut war. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden für 20 min bei 4° C und 18506 x g die extrahierten Proteine von den Zelltrümmern getrennt. 20-22 μ l vom Überstand wurden nun mit 10 μ l 3x-SDS-Probenpuffer vermischt und nach fünfminütiger Inkubation bei 95° C vollständig für SDS-PAGE mit anschließender Western-Blot-Analyse benutzt.

2.6.4 Immunopräzipitation von Fusionsproteinen

Für Immunopräzipitationen von HA-PiAVR2-Fusionsproteinen aus Mesophyll-Protoplasten wurden 1 bzw. 5 ml Protoplasten pelletiert und kurz in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe von 1 ml IP-Extraktpuffer wurden die Protoplasten mittels Vortexen gelöst und durch viermaliges zehnekündiges Sonifizieren (jeweils mit 30 Sek. Pause) vollständig aufgebrochen. Die immer noch auf Eis gekühlte Probe wurde nun 10 min 18506 x g bei 4°C zentrifugiert, um die verbleibenden Zelltrümmer zu entfernen.

Material und Methoden

Für die Immunpräzipitationen von *GFP-PiAVR2*-Fusionsproteinen aus Überexpressionspflanzen wurden jeweils acht Pflanzen (2 bzw. 4 Wochen alt) geerntet. In flüssigem Stickstoff wurde das Blattmaterial gemörsert und in 1 ml IP-Extraktbuffer aufgeschlossen (s. Kapitel 2.6.1). Die Konzentration des Proteinextrakts wurde mittels Bradford-Reagenz (s. Kapitel 2.6.5) bestimmt und durch Zugabe von zusätzlichem IP-Extraktionspuffer auf 0,8 mg/ml eingestellt.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgte über HA-Epitop-Sepharose (Roche) bzw. über anti-GFP-Antikörper und Protein-A-Agarose (Roche). Die *GFP-PiAVR2*-Fusionsproteinextrakte wurden durch Zugabe von 10 µl gewaschener Protein-A-Agarose 30 min bei 4° C nach Angaben des Herstellers geklärt. Zum Proteinextrakt wurde 1 µg/ml anti-GFP-IgG (TP401, Acris Antibodies GmbH, Herford) zugegeben und 1 h bei 4° C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Durch Zugabe von 30 µl vorgewaschener Protein-A-Agarose konnten nun innerhalb einer weiteren Stunde die *GFP-PiAVR2*-Fusionsproteine an die Agarose binden. Die Aufreinigung der HA-*PiAVR2*-Fusionsproteine erfolgte mit 20-30 µl Agarose für 1h oder über Nacht bei 4°C unter ständigem Invertieren. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml Waschpuffer wurden die Fusionsproteine mit 20 µl SDS-Probenpuffer ohne DTT bei 95°C 5 min von der Agarose gekocht oder mit 50 µl Elutionspuffer (0.5 mg/ml HA-Epitope [Roche] in IP-Extraktionspuffer) 1h bei 4°C eluiert.

2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung des Proteingehaltes einer Lösung nach Bradford (*Bradford, 1976*) wurde der *Bio-Rad Proteinassay* (BioRad) genutzt. Die Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben. BSA (Rinderserumalbumin, Fraktion V, Serva) in den Konzentrationen 0,01; 0,02; 0,04; 0,08 mg/ml wurde zur Erstellung einer Eichkurve verwendet. Die Absorptionmessungen erfolgten mit einem Sirius HAT injector (MWG) gemäß Herstellerangaben bei einer Wellenlänge von 595 nm.

2.6.6 Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Laemmli (*Laemmli, 1970*) als diskontinuierliche Elektrophorese nach den Angaben von Sambrook und Russell (*Sambrook, 2001*) durchgeführt. Dabei werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Als Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1) wurde eine Rotiphorese Gel30-Lösung von der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 8, 11 oder 13,5 %igen Trenngelen und 5 %igen Sammelgelen in Minigelelektrophoresekammern der Firma BioRad in 1 x Elektrophorese-Puffer bei 25 mA/Gel und maximaler Spannung. Die zu analysierenden Proben wurden in 1 x SDS Probenpuffer 5 min bei 95°C denaturiert und nach Zentrifugation (20800 x g, RT, 1 min) der Überstand auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden anschließend für Western-Blot-Analysen (s. Kapitel 2.6.7) genutzt. Als Größenstandard wurde *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet.

2.6.7 Western-Blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurden Westernblots mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden jeweils mittels SDS-PAGE (s. Kapitel 2.6.6) aufgetrennt und mittels einer Apparatur von BioRad nach Herstellerangaben elektrophoretisch auf eine Hybond ECL-Membran (GE Healthcare) übertragen. Es erfolgte im Anschluss eine Inkubation für 1 h bis über Nacht bei 4°C in Blockinglösung. Der jeweilige Antikörper wurde in der entsprechenden Konzentration (s. Tabelle 6) in Blockinglösung verdünnt und die Membran darin 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen der Membran mit TBST wurde eine Inkubation mit einer Zweit-Antikörperlösung 1 h bei RT vorgenommen. Nachdem die Membran dreimal 10 min mit TBST bei RT gewaschen worden war, erfolgte die Detektion der gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP) mittels dem *ECL Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Chemolumineszenz wurde durch Auflegen eines Hyperfilm ECL Röntgenfilmes (Amersham) und anschließende Entwicklung nachgewiesen. Die Detektion der gekoppelten Alkalischen Phosphatase fand in AP-Puffer statt.

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Antikörper und entsprechende Verdünnungen

Antikörper	Detektion von	Verdünnung	hergestellt in
α - GFP (Acris Antibodies GmbH)	GFP-tag	1:5000	Kaninchen
α - GFP (Acris Antibodies GmbH)	GFP-tag	1:5000	Ziege
α - myc (Santa Cruz Biotechnology)	myc-tag	1:5000	Maus
α - HA (Roche)	HA-tag	1:2000	Ratte
α - p44/p42 MAPK (Cell Signalling)	phosphorylierte MAPK 3,6 und 4	1:2000	Kaninchen
α - rabbit-AP (Sigma)	Kaninchen-AK	1:3000	Ziege
α - rabbit-HRP (Sigma)	Kaninchen-AK	1:37500	Ziege
α - mouse-AP (Sigma)	Maus- und Ratten-AK	1:3000	Ziege
α - mouse-HRP (Sigma)	Maus- und Ratten-AK	1:10000	Hase
α - goat-AP (Sigma)	Ziege	1:3000	Kaninchen
α - goat-HRP (Sigma)	Ziege	1:8000	Kaninchen

2.6.8 Massenspektrometrieanalyse

Immunopräzipitiertes Material wurden von Mirita Franz-Wachtel (Proteomzentrum, Tübingen) mittels Flüssigkeitschromatographie (LC)-MS-MS analysiert. Dazu wurden die Proben auf ein 12-prozentiges NuPAGE Bis-Tris Gel (Invitrogen) geladen, um die Probe zu reinigen. Nach einer Laufstrecke von 0,5-1 cm wurden die Proben aus dem Gel geschnitten, die Proteine mittels Trypsin (Promega) nach Angaben des Herstellers verdaut und aus dem Gel eluiert. Die LC-MS-MS Analyse wurde mit einer EasyLC Nano-HPLC (Proxeon Biosystems) und einem LTQ Orbitrap XL Massspektrometer (Thermo Scientific) durchgeführt, wie in (*Koch et al., 2011*) beschrieben. Die MS-Daten wurden mit der MaxQuant Software (v1.0.14.3, (*Cox und Mann, 2008*)). Die Peptidfragmente wurden mit der Mascot Database Suchmaschine (Matrix, Science, UK, Version 2.2.0) mit der IPI-A. *thaliana*-Proteom-Datenbank (Version 3.82) abgeglichen.

Material und Methoden

Die ungefilterten Ergebnisse wurden mit einer FDR (false discovery rate) von 0,01 prozessiert. Diese Falschpositivrate gibt dabei den Schätzwert für den vorliegenden Datensatz an, wie viele falschpositive Identifikationen in der Liste der "positiven" Identifikationen enthalten sind. In großen Datensätzen galt ein Protein als sicher identifiziert, wenn es einen PEP-Wert kleiner oder gleich 0,01 und eine hohe Intensität < 20.000 hatte. Ein PEP kleiner 0,01 bedeutet, dass das Peptid mit einer über 99-prozentigen Wahrscheinlichkeit identifiziert wurde (Kall *et al.*, 2008).

War der Datensatz nicht groß genug, z. B. durch eine zu geringe Proteinmenge, konnte keine statistische Filterung vorgenommen werden. Diese Spektren wurden mit MaxQuant prozessiert und nach dem Mascot Ionen Werten (mascot ion score) der identifizierten Peptide gefiltert. In diesem kleinen Datensatz, bei der Identifizierung von Interaktionspartnern von GFP-AVR2 aus Überexpressionspflanzen, wurden alle identifizierten Peptide in drei Kategorien geteilt. Gruppe A enthält Proteine, deren Mascot Werte $p < 0,01$ sind, die also mit einer über 99-prozentigen Wahrscheinlichkeit identifiziert wurden. In Gruppe B waren Proteine mit Mascot Werten $0,05 > p \geq 0,01$ und in Gruppe C war $0,1 > p \geq 0,05$. Bei dieser Verrechnungsmethode muß der Mascot Wert aller Peptide einer Proteingruppe über der Summe der Mascot Werte von B+C liegen, damit das Protein als sicher identifiziert gilt.

2.6.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die Kontrolle der Transformations-Effizienz von Mesophyll-Protoplasten für den Luciferase Assay und der Screen nach GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen wurde mit einem *Nikon Eclipse 80i* durchgeführt. Die Anregung von GFP erfolgte bei 465-495 nm, die Detektion bei 500 nm.

2.6.10 Konfokale *Laserscanning* Mikroskopie

Zur Analyse der zellulären Lokalisation von PiAVR2 und den Proteinen der BSU1-Familie *in vivo*, wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen mittels Gateway®-Rekombination (s. Kapitel 2.4.6) in die Vektoren pABind_mCherry bzw. pUGT2 kloniert (s. Abbildung 4) und in *Nicotiana bethamiana* (s. Kapitel 2.3.6.) exprimiert. 36-48 h nach Transformation wurde die Lokalisation der exprimierten GFP- und mCherry-Fusionsproteine mit dem Laserkonfokalmikroskop TCS SP2 von Leica (Heidelberg) analysiert und mit der Leica Confocal Software, Version 2.5, visualisiert. Die eGFP-Fluoreszenz wurde dabei mit einem Argon-Krypton-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht bei 496-552 nm detektiert. Die Extinktion für die mCherry-Fluoreszenz lag bei 526 nm und die Emission der Photonen wurde zwischen 570-620 nm gemessen. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wurde bei 660-726 nm detektiert. Alle Aufnahmen wurden mit einem HCxPLApo_63x1,2 Objektiv gemacht.

2.6.11 FRET-Messungen

In-vivo Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Messungen wurden in *Arabidopsis thaliana* Columbia 0 (Col-0) Zellkultur-Protoplasten (s. Kapitel 2.3.3) durchgeführt. FRET bezeichnet den strahlungslosen Energietransfer eines angeregten Donorfluorophors auf einen Akzeptorfluorophor, welcher die erhaltene Energie in Form von Fluoreszenz abgibt. FRET kann entstehen, wenn die verwendeten Fluorophore eine geringe Distanz besitzen und das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt. Als Donorfluorophor wurde eGFP verwendet. Das Akzeptorfluorophor für den Energietransfer war mCherry. Es wurde die Abnahme der Fluoreszenz-Lebenszeit des eGFP gemessen.

Aminoternale GFP-Fusionen der Proteine der BSU1-Familie wurden durch Gateway-Rekombination der cDNA-Sequenzen der entsprechenden Gene in p2FGW7 hergestellt. Die carboxy-terminale Fusion von PiAVR2 mit RFP erfolgte durch Rekombination von *PiAVR2* in pABind_mCherry. Als Positivkontrolle diente der Vektor pABind_FRET_*PiAVR2*. Alle Vektoren und Konstrukte sind in Tabelle 4 und in Abbildung 4 gezeigt.

Durch diese Vektoren wurden die entsprechenden GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine in den Protoplasten 20-24 h nach Induktion mit 1 μ M Estradiol exprimiert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz wurden zusätzlich Protoplasten mit dem Vektor p2FGW7 transformiert. Die Herstellung und die Transformation der Protoplasten wurden von Catarina Brancato aus einer zentralen Einrichtung für Pflanzentransformation des ZMBP der Universität Tübingen durchgeführt.

Die Protoplasten wurden 24 h nach der Transformation wie in *Wanke et al. (2011)* beschrieben analysiert. Als Anregungs-Laserquelle wurde eine 473-nm Puls laser-Diode mit einer Wiederholungsrate von 20 MHz verwendet (LDH-P-C-470, Picoquant GmbH, Berlin, Germany). Ein 500 nm dichroitischer Spiegel (FF500-Di01-25636, Semrock) wurde verwendet um Anregungslicht und die GFP-Fluoreszenz zu trennen. Zurückgestreutes Licht wurde mit einem steilen Kantenfilter (LP02-473RU-25 Semrock) gefiltert. Die GFP Fluoreszenz wurde mit einem 633 nm Kurzpass-Filter (SP01-633RU-25, Semrock) und einem 500 nm Bandpass-Filter von der Autofluoreszenz getrennt.

2.7 Reportergen-Assays

Um zu Testen, ob PiAVR2 odere andere *P. infestans* RXLR-Effektoren die frühen Antworten der PAMP-induzierten Immunität supprimieren, wurde ein Luciferase-Assay durchgeführt, welcher mittels einem GUS-Assays normalisiert wurde. Dazu wurden *Arabidopsis thaliana* Mesohyll-Protoplasten (s. Kap 2.3.4) jeweils gleichzeitig mit drei Konstrukten transformiert. Für das erste Konstrukt wurde die cDNA-Sequenz des Effektors in p2GW7 oder p2FGW7 mittels Gateway®-Technologie rekombiniert (s. Kapitel 2.4.6). Alternativ wurde der leere p2FGW7-Vektor (exprimiert freies GFP) oder p2GW7-*AvrPto* transformiert. Der Effektor *AvrPto* aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* dient in diesem Test als Positivkontrolle für die Suppression, wohingegen p2FGW7 (GFP) als Negativkontrolle fungiert.

Material und Methoden

Das zweite Konstrukt *pFRK1-Luc-nos* (He et al., 2006) kodiert für die Luziferase, deren Expression unter Kontrolle des PAMP-induzierbaren FRK1-Genpromoters ist. Zum Normalisieren der Transformationseffizienz und als Kontrolle für Zelltod wurde als drittes Konstrukt *pUbi10-GUS-nos* (Norris et al., 1993) genutzt, um anschließend einen GUS-Assay (s. Kapitel 2.7.2) zu machen. Diese drei Plasmide wurden in einem Verhältnis 4,5:4,5:1 gemischt und davon 10 µg/100µl Protoplasten transformiert (s. Kapitel 2.3.4). Die Protoplasten wurden danach im Dunkeln bei 22° C für 16 h vor der Messung inkubiert.

2.7.1 Luciferase-Assay

Zu 100 µl Protoplasten (2×10^5 Pp/ ml) wurde mit 1 µl Luciferin (20 mM Leuchtkäfer-D-Luciferin, synthetisch, PJK, Kleinblittersdorf) vorsichtig vermischt und nach 40 min 1µl flg22 (50mM, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Georg Felix) oder Wasser dazugegeben. Die Lumineszenz wurde alle 2 h, über einen Zeitraum von 8 h, mit dem Luminometer Mithras LB940 (Berthold) gemessen und mit der Software MicroWin 2000, Version 1.2, dargestellt. Die produzierte Lichtmenge (Relative Lichteinheiten = RLE) wurde über die Zeit aufgetragen. Von jeder Probe wurden Triplikate gemessen und jedes Experiment mindestens dreimal wiederholt.

2.7.2 GUS-Assay

Für den GUS-Assay wurden 100 µl Protoplasten, wie oben beschrieben, mit dem Reporterkonstrukt *pUbi10-GUS-nos* (Norris et al., 1993) transformiert. Nach 16 h bei 22°C wurde die Hälfte der Protoplasten mit flg22 (500 nM Endkonzentration) elizitiert, die andere Hälfte wurde unbehandelt als Kontrolle mitgeführt. Sechs Stunden später wurden die Protoplasten 5 sek bei maximaler Beschleunigung abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Pellets wurden mit 100 µl 1 x CCLR (Zell-Lyse-Puffer aus Promega Luciferase Kit) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Triplikate á 10 µl wurden mit 90 µl MUG (1 mM MUG; 100 mM Tris-HCl pH 8; 2 mM MgCl₂) gemischt. Nach 30 min Inkubation bei 37° C wurde eine weitere Umsetzung des Substrates durch Zugabe von 900 µl 0,2 M Na₂CO₃ gestoppt. Im MWGt Sirius HT Injector wurde die entstandene Fluoreszenz gemessen ($\lambda_{ex} = 360$ nm, $\lambda_{em} = 460$ nm). Das Verhältnis von GUS-Aktivität im Pellet zur GUS-Aktivität im Überstand wurde mit Microsoft Excel gaphisch dargestellt und diente als Kontrolle für Zelltod.

2.7.3 Auswertung LUC-/GUS-Rate

Zur Auswertung der Induktion der FRK1-Luciferase Expression wurden die RLE-Werte der Luciferase-Messung zum Zeitpunkt 6 h (nach der Elizitierung) mit den GUS-Werten nach der folgenden Formel in Microsoft Excel verrechnet und visualisiert:

$$\frac{\text{LUC(+Flg22/-Flg22)}}{\text{GUS(+Flg22/-Flg22)}}$$

2.8 Phänotypische Pflanzenversuche

2.8.1 Infektionsstudien mit verschiedenen Pathogenen

Es wurden mit Dexamethason-induzierbaren GFP-PiAVR2-Linien und GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien Infektionsstudien mit dem hemi-biotrophen Oomyceten *Phytophthora parasitica* und dem obligat biotrophen Oomyceten *Hyaloperonospora arabidopsidis* durchgeführt.

2.8.1.1 Infektion mit *Phytophthora parasitica*

Diese Infektionsstudien wurden freundlicherweise von Agnès Attard (INRA, Sophia-Antipolis, France) durchgeführt. Die Wurzelinfektionen der *A. thaliana*-Linien mit Zoosporen von *Phytophthora parasitica* (Stamm 310) wurden, wie in Attard *et al.* (2010) beschrieben, durchgeführt und mit dem dort definiertem Befallsindex ausgewertet.

2.8.1.2 Infektion mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* Noco2

Diese Infektionsstudien wurden freundlicherweise von Harald Keller (INRA, Sophia-Antipolis, Frankreich) durchgeführt. Dafür wurden sieben Tage alte *A. thaliana* Col0 Pflanzen und verschiedene Überexpressionslinien mit einer einer frischen Sporenlösung (40 Sporen/ μ l) besprüht. Die Pflanzen wurden für 24 h bei hoher Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 5 Tagen wurden die Pflanzen mit destilliertem Wasser erneut befeuchtet und weitere 24-48 h bei hoher Luftfeuchtigkeit gehalten. Danach wurden die Blätter geerntet und die Sporenmenge pro mg Frischgewicht gezählt.

2.8.2 Hypokotyllängen-Messungen

Die relative Hypokotyllänge der Keimlinge von *A. thaliana* Col-0, zwei pGreen0229-Kontroll-Linien und drei unabhängigen 35S::GFP-PiAVR2-Linien wurde nach sieben Tagen vertikalem Wachstum in vollständiger Dunkelheit auf $\frac{1}{2}$ MS (1% Saccharose \pm 1 μ M Brassinazol, Sigma) mit ImageJ (1.45; Windows) gemessen. Die Werte wurden in Microsoft Excel exportiert und es wurde der Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils mindestens 25 Werte berechnet. Es wurden drei biologische Replikate angefertigt.

2.8.3 Wurzellängen-Messungen

Für die Bestimmung der Wurzellängen wurden Keimlinge von Col-0, zwei pGreen_0229-Kontrolllinien und drei unabhängigen 35S::GFP-PiAVR2-Linien nach sechs Tagen vertikalem Wachstum in Dauerlicht von $\frac{1}{2}$ MS (1% Saccharose) auf $\frac{1}{2}$ MS (1% Saccharose \pm 2 nM Epibrassinolid, Sigma) umgesetzt und nach sechs bis zehn Tagen ausgewertet (s. Kapitel 2.8.2).

2.9 Hormon- und Sterolmessungen

2.9.1 Bestimmung der Hormonlevel in Pflanzen

Für die Hormonmessungen in den Keimlingen wurden zwei 35S::GFP-PiAVR2-Linien und zwei pGreen_0229 Kontrolllinien 14 Tage bei kontinuierlichem Licht angezogen. Die erwachsenen Pflanzen der gleichen Linien wuchsen fünf Wochen bei 8 h Licht täglich. Die Aufarbeitung der Proben und die Analyse mittels Gaschromatographie (GC)-Massenspektrometrie (MS) wurde freundlicher-weise von Karl Wurster (ZMBP) durchgeführt, wie in *Lenz et al. (2011)* beschrieben.

2.9.2 Bestimmung des Sterolgehaltes von Pflanzen

Die Messungen des Sterolgehalt in den Überexpressionslinien und den Kontrollpflanzen wurden freundlicherweise von Vera Wewer (IMBIO, Bonn) durchgeführt. Die Quantifizierung der freien Sterole wurde, wie in *Wewer et al. (2011)* beschrieben, mittels GC-MS durchgeführt und ein Aliquot der Lipidextraktion wurde mit Q-TOF weiter analysiert, um die konjugierten Sterole zu detektieren.

2.10 Datenbankanalysen

Die Sequenzen der Gene der *BSU1*-Familie wurden *TAIR – The Arabidopsis Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) entnommen. Die Transkriptlevel der *BSU1*-Genfamilie wurden mit dem *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) visualisiert.

3 Ergebnisse

3.1 Allgemeines

RXLR-Proteine sind als eine große Familie der Effektoren von Oomyceten bekannt. Eine Vielzahl von ihnen wird von Resistenzproteinen des pflanzlichen Immunsystems erkannt und löst damit eine Effektor-vermittelte-Immunität (ETI). PiAVR2 ist ein RXLR-Effektor von *P. infestans*, der vom *Solanum demissum* Resistenzprotein R2 erkannt wird. In Zusammenarbeit mit Paul Birch (SCRI, Dundee) sollte PiAVR2 näher charakterisiert werden. Während die Gruppe um Paul Birch die Wirkungsweise von PiAVR2 in den Wirtspflanzen Kartoffel und *N. benthamiana* untersuchte, wurde für die hier vorgelegte Arbeit die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* verwendet.

3.2 PiAVR2 interagiert mit BSL1, BSL2 und BSL3

Für die Analyse von PiAVR2 wurde das korrespondierende Gen (PITG_22870) aus dem *Phytophthora infestans* Isolat T30-4 amplifiziert (ohne die Sequenz für das Signalpeptid) und in pDONR221 kloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von E. Gilroy) und danach mittels Gateway®-Technologie in verschiedene Zielvektoren kloniert.

Um mögliche pflanzliche Interaktionspartner von PiAVR2 zu identifizieren, wurde HA-PiAVR2 in *Arabidopsis*-Protoplasten exprimiert und anschließend eine Immunopräzipitation (IP) durchgeführt. Vorarbeiten haben gezeigt, dass die herkömmlichen Expressionsvektoren nur sehr geringe Mengen an Protein liefern (s. Abbildung 5). Dementsprechend wurde der Expressionvektor durch Einbau einer Kozak-Sequenz modifiziert, um die für die IP erforderliche erhöhte Expression zu ermöglichen. Die Kozak-Sequenz dient für das Ribosom als Startsignal für die Translation von eukaryotischer mRNA. Das resultierende 35S::Koz-HA-PiAVR2-Konstrukt wurde erneut in Protoplasten transformiert und damit konnte eine sechsmal stärkere Expression von HA-PiAVR2 erzielt werden (s. Abbildung 5).

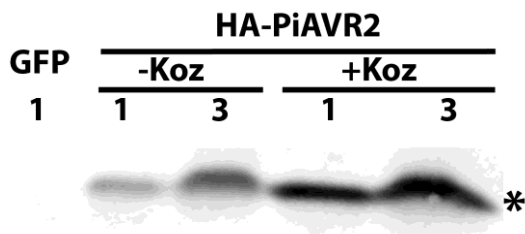


Abbildung 5: Optimierung der HA-PiAVR2-Expression

A. thaliana Mesophyll-Protoplasten wurden mit p2FGW7 (GFP-Expressionskontrolle) bzw. 35S:: HA-PiAVR2 (mit oder ohne Kozak Sequenz) in p2GW7 Plasmidkonstrukten transformiert. Nach 24 h wurde der Proteinextrakt aus (1) 10.000 bzw. (3) 30.000 Protoplasten mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit HA-Antikörpern analysiert. *HA-PiAVR2-Bande = 10 kDa

Ergebnisse

Mit diesem Konstrukt wurde HA-PiAVR2 in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. 24 h nach der Transformation wurden die Protoplasten aufgeschlossen und eine Immunopräzipitation an HA-Agarose durchgeführt. Das Ergebnis der Immunopräzipitation von HA-PiAVR2 ist in Abbildung 6 dargestellt.

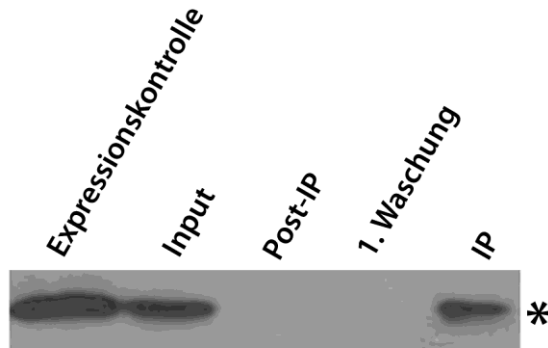


Abbildung 6: Immunopräzipitation von HA-PiAVR2

HA-PiAVR2 wurde transient in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Das Immunopräzipitat wurde mit anti-HA-Agarose gewonnen. Die Immunodetektion erfolgte mittels HA-Antikörper. IP: Immunopräzipitat; Post-IP: Durchlauf; *HA-PiAVR2-Bande

Nach der erfolgreichen Immunopräzipitation von HA-PiAVR2 wurde eine tandem-massenspektrometrische Analyse der PiAVR2-Interaktoren durchgeführt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer massenspektrometrischen Analyse zuvor chromatographisch aufgetrennter Peptide nach tryptischen Verdau eines Proteingemisches. Dabei werden ausgewählte Peptide durch Ionisierung weiter aufgespalten und die Fragmente erneut massenspektrometrisch analysiert und mit einer Datenbank verglichen, um sie den entsprechenden Proteinen zuzuordnen (Link *et al.*, 1999). In Kooperation mit Mirita Franz (Proteomzentrum, Tübingen) wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse beider Analysen sind in Tabelle 7 bzw. und Tabelle 8 aufgelistet. Als Kontrolle wurde in beiden IP-Tandem-MS-Analysen das HA-AvrPto des Bakteriums *Pseudomonas syringae* verwendet. Proteine, die sowohl für HA-PiAVR2 als auch HA-AvrPto identifiziert wurden, wurden aus Tabelle 7 und Tabelle 8 entfernt, so dass nur die spezifischen Interaktoren aufgelistet wurden. HSP 70 wird in vielen MS-Analysen gefunden (*persönliche Kommunikation Mirita Franz*) und wird deshalb als falsch positiv gewertet. Aus beiden Experimenten geht hervor, dass PiAVR2 mit *BSU1-LIKE 1* (BSL1), BSL2 und BSL3, drei Serin-Threonin-Phosphatasen der BSU1-Familie interagiert. *BRI1 SUPPRESSOR 1* (BSU1) und BSL1, eines seiner drei Homologe sind positive Regulatoren im BR-Signalweg (s. Einleitung). Interessanterweise konnte in keiner der beiden Analysen BSU1 als Interaktionspartner von PiAVR2 identifiziert werden.

Tabelle 7: Ergebnisse der Tandem MS Analyse der ersten Immunopräzipitation von HA-PiAVR2

Es wurden nur die Proteine aufgelistet, die ausschließlich nach der IP mit HA-PiAVR2 und nicht mit HA-AvrPto identifiziert wurden. Ein Protein galt als sicher identifiziert, wenn der PEP-Wert $< 1 \cdot 10^{-5}$ war, pro Protein mindestens zwei Peptide gefunden wurden und die Intensität mindestens 20000 erreichte. PEP: Posterior error probability= Wahrscheinlichkeit für eine falsche Identifikation eines Proteins. Die Proteinsequenz von BSL2 und BSL3 ist zu ähnlich, um die identifizierten Peptide eindeutig einer von beiden Phosphatasen zuordnen zu können.

Name	Funktion	Uniprot	Peptide	PEP	Intensität
HSP70	Hitzeschockprotein	Q42445; Q9LHA8; Q9ZS55	12	4,73E-87	215.690
BSL1	Serin/Threonin-Protein Phosphatase	Q8L7U5	15	3,01E-68	3.164.900
At1g07010	Calcineurin-ähnl. Phosphoesterase Protein	Q8L774	2	4,62E-14	261.980
BSL2; BSL3	Serin/Threonin-Protein Phosphatase	Q9SJF0; Q9SHS7-1; Q9SHS7-2	5	1,70E-13	304.500
APS1	chloropl. Protein der Stärkesynthese	P55228	2	1,60E-11	140.820
ATASE2	Amidophosphorybosyltransferase	Q39000; Q5MAT8; Q9STG9	2	3,06E-10	206.250
PIFI	Post-illumination Chlorophyll Fluorescence increase protein	Q9FPH6; Q9LVZ5	3	2,92E-07	519.670

Tabelle 8: Ergebnisse der Tandem MS Analyse der zweiten Immunopräzipitation von HA-PiAVR2

Es wurden nur die Proteine aufgelistet, die ausschließlich nach der IP mit HA-PiAVR2 und nicht mit HA-AvrPto identifiziert wurden. Ein Protein galt als sicher identifiziert, wenn der PEP-Wert $< 1 \cdot 10^{-5}$ war, pro Protein mindestens zwei Peptide gefunden wurden und die Intensität mindestens 10000 erreichte. PEP: Posterior error probability= Wahrscheinlichkeit für eine falsche Identifikation eines Proteins. Die Proteinsequenz von BSL2 und BSL3 ist zu ähnlich, um die identifizierten Peptide eindeutig einer von beiden Phosphatasen zuordnen zu können.

Name	Funktion	Uniprot	Peptide	PEP	Intensität
HSP70	Hitzeschockprotein	Q42445; Q9LHA8; Q9ZS55	11	2,78E-86	68.494
BSL1	Serin/Threonin-Protein Phosphatase	Q8L7U5	19	3,45E-55	1.878.100
BSL2; BSL3	Serin/Threonin-Protein Phosphatase	Q9SJF0; Q9SHS7-1; Q9SHS7-2	14	2,60E-52	822.360
F-ATPase	ATP-Synthase, γ -Kette, chloropl.	Q01908; B9DI66; Q9SUI9	3	9,87E-19	101.810

3.3 *In-vivo* Interaktionsstudien zwischen PiAVR2 und den Kelchphosphatasen der BSU1-Familie

Die vier Proteine der BSU1 Familie bilden die Klasse der Kelchphosphatasen. Die Proteinsequenz von BSU1 zeigt in *Arabidopsis* eine 53 prozentige Ähnlichkeit mit BSL1 und eine 43-prozentige Ähnlichkeit mit BSL2 und BSL3. Hingegen weist BSL1 eine Ähnlichkeit von über 60 % mit BSL2 und BSL3 auf und BSL2 und BSL3 haben untereinander sogar eine Ähnlichkeit von 98 %. An ihrem N-Terminus haben die Phosphatasen der BSU1-Familie einen β -Kelch-Propeller (Farkas *et al.*, 2007), der sich aus sechs β -Faltblättern zusammensetzt, wobei der n-terminale Verschluss des Propellers aus dem ersten n-terminalen und den letzten drei c-terminalen β -Strängen geformt ist (Farkas *et al.*, 2007; Mora-Garcia *et al.*, 2004). In Abbildung 7 ist ein Sequenzvergleich der Proteine der BSU1 Familie gezeigt. Die n-terminale Region bildet die Kelchdomäne (blau) und ist über eine Linker-Region (grün) mit der katalytischen Untereinheit (rot) verbunden. Die Sterne markieren die für Kelchdomänen typischen Glycin-Paare. Sie formen in der dreidimensionalen Propeller-Struktur jeweils die schmalste Stelle eines jeden β -Faltblatt-„Rotorblattes“. Aufgrund von biochemischen Untersuchungen geht man davon aus, dass Proteine mit Kelchdomänen wahrscheinlich mit den verschiedenen Interaktionsstellen an ihren β -Propeller-Domänen in Multi-Protein-Komplexen agieren (Farkas *et al.*, 2007). Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Interaktion der Kelchphosphatasen mit PiAVR2 mittels Überexpression bestätigt werden kann.

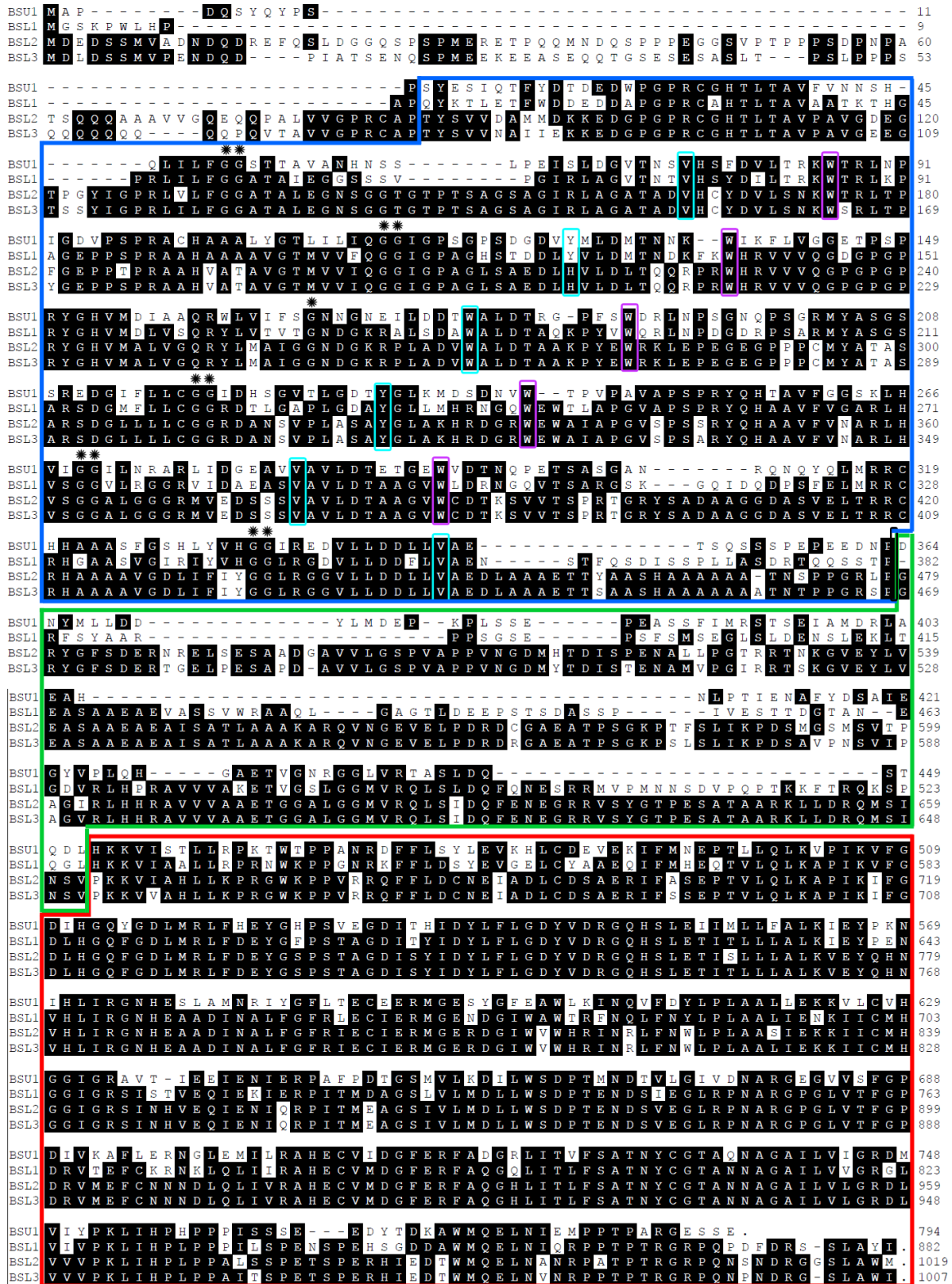


Abbildung 7: Sequenzvergleich der BSU1 Familie

Proteinsequenzalignment von AtBSU1 (AT1G03445.1), AtBSL1(AT4G03080.1), AtBSL2 (AT1G08420.1) und AtBSL3 (AT2G27210.1) Die Sequenzen wurden mittels der ClustalW-Methode mit „MegAlign 5.0“ von DNASTar ausgerichtet. Es sind die Kelch-Domäne (blau), die Linker-Region (grün) und die Phosphatase-Domäne (rot) markiert. Die Sterne markieren die für Kelch-Domänen charakteristischen Glycin-Paare, welche in unregelmäßigen Abständen von einer hydrophoben Aminosäure (türkis) und einem Tryptophan (violett) gefolgt werden.

Ergebnisse

Eine Co-IP-Analyse sollte einen direkten immunologischen Nachweis für die *in vivo* Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs liefern und die Spezifität der Interaktion bestimmen. Dafür wurden die kodierenden Sequenzen aller Mitglieder der BSU1-Familie aus *A. thaliana* cDNA amplifiziert und in einen Gateway Vektor für einen N-terminalen Myc-Tag kloniert. Die Myc-BSL-Konstrukte wurden mit HA-PiAVR2-Konstrukten in Mesophyll-Protoplasten kotransformiert. Das anti-HA-Agarose-Immunopäzipitat wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Immundetektion mit myc-bzw. HA-Antikörpern analysiert. Es war eine deutliche Interaktion von HA-PiAVR2 mit myc-BSL3 zu erkennen (s. Abbildung 8). Aufgrund der stärkeren Expression von myc-BSL2 wurde absolut die gleiche Menge HA-PiAVR2 immunopräzipitiert wie mit dem deutlich geringer exprimierten myc-BSL3. Jedoch ist die Interaktion von HA-PiAVR2 mit myc-BSL1 und mit myc-BSL2 etwas schwächer ausgeprägt als mit myc-BSL3. Es konnte keine Interaktion von myc-BSU1 mit HA-PiAVR2 detektiert werden. Dadurch bestätigt sich das Ergebnis der MS-basierten IP-Analyse.

Myc-BSU1 (rund 90 kDa) weist bei jeder Expression eine Doppelbande in der Western-Blot Analyse auf. Es handelt sich bei der kleineren Bande entweder um ein Abbauprodukt von myc-BSU1 oder um die dephosphorylierte Form der Phosphatase. Doppelbanden wurden auch für myc-BSL2 und selten für myc-BSL3 beobachtet. Da für die SDS-PAGE-Gelelektrophorese jedoch die Proteine denaturiert werden, konnte nicht festgestellt werden, ob HA-PiAVR2 nur mit einer spezifischen Bande der BSLs interagiert.

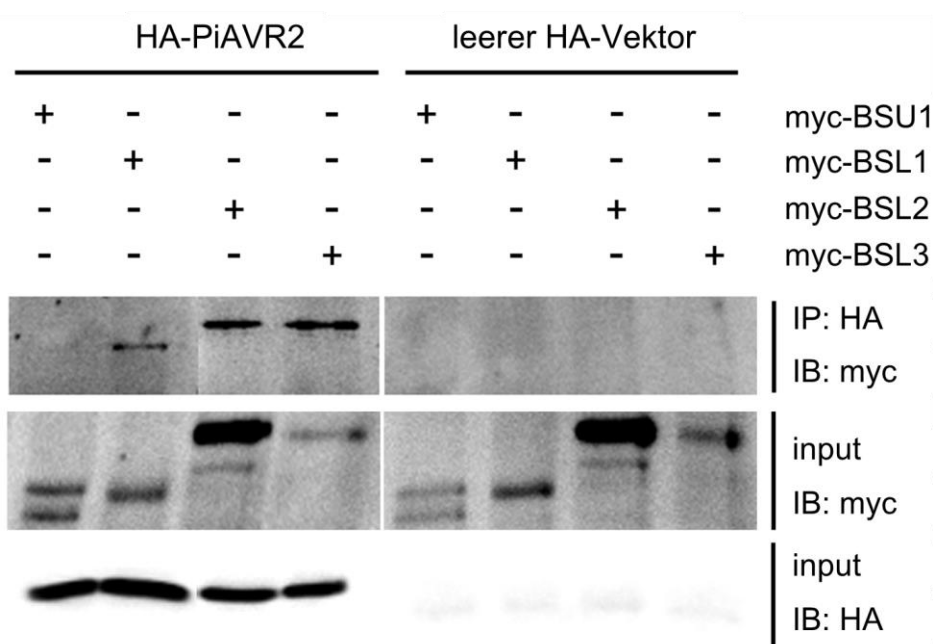


Abbildung 8: In vivo Co-Immunopräzipitationen von PiAVR2 mit BSU1, BSL1, BSL2 und BSL3

HA-PiAVR2 wurde zusammen mit myc-BSLs transient in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Die Immunopräzipitate wurden mit anti-HA-Agarose gewonnen. Die Immundetektion wurden mit myc- bzw. HA-Antikörpern analysiert. IB: Immunoblot (HA-PiAVR2 = 10 kDa; myc-BSU1 = 90 kDa; myc-BSL1 = 90 kDa; myc-BSL2 = 110 kDa; myc-BSL3 = 109 kDa)

Das *P. infestans* Isolat 06_3982A besitzt statt PiAVR2 eine divergente Form dieses Effektors, PiAVR2-like genannt.

Diese hat im Vergleich zu PiAVR2 13 Aminosäure-Polymorphismen, acht davon in der C-terminalen Effektor-domäne (Gilroy *et al.*, 2011a). PiAVR2-like wird nicht vom Solanaceen-Resistenzprotein R2 erkannt und somit entkommt dieses virulente *P. infestans* Isolat einer R2-induzierten Hypersensiblen Reaktion (Gilroy *et al.*, 2011a). Eine weitere Co-IP-Analyse sollte klären, ob auch PiAVR2-like mit den Kelchphosphatasen interagiert. Wie in Abbildung 9 gezeigt ist, interagiert PiAVR2-like auch mit BSL1, BSL2 und BSL3. Wie in der vorangegangenen Co-IP-Analyse, konnte auch hier keine Interaktion mit myc-BSU1 nachgewiesen werden. Es kann also geschlossen werden, dass die 13 Aminosäure-Austausche in PiAVR2-like keinen Einfluss auf die Bindung der BSLs haben. Mögliche Erklärungsansätze hierfür sind: Es wird nicht die Bindung von PiAVR2 an die BSLs von R2 erkannt, sondern der ausgelöste Effekt. Oder bei der Bindung von PiAVR2-like an die BSLs kommt es zu einer veränderten Konformation im Vergleich zum PiAVR2-BSL-Komplex und dadurch wird der Proteinkomplex nicht von R2 erkannt.

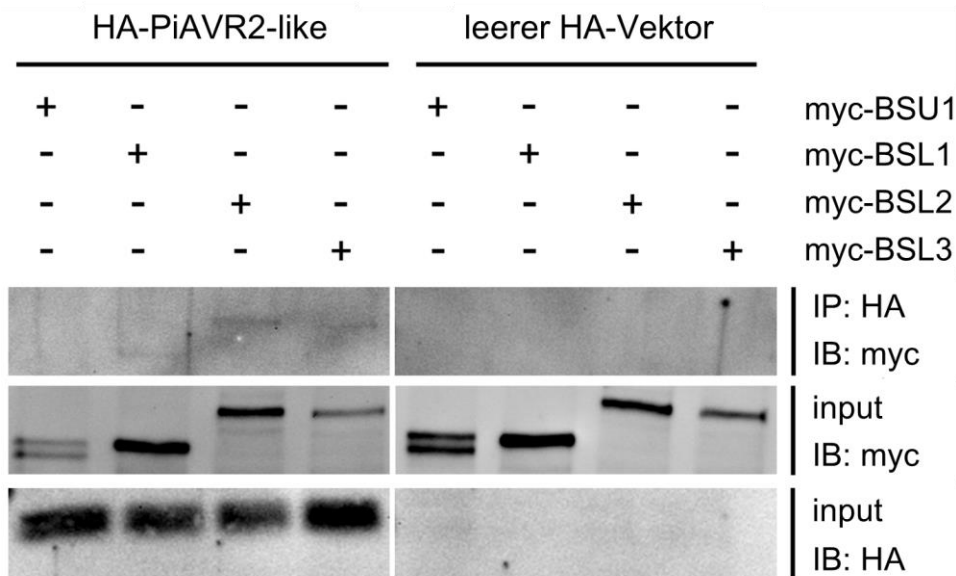


Abbildung 9: In vivo Co-Immunopräzipitationen von PiAVR2-like mit BSU1, BSL1, BSL2 und BSL3

HA-PiAVR2-like wurde zusammen mit myc-BSLs transient in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten exprimiert. Die Immunopräzipitate (IP) wurden mit anti-HA-Agarose gewonnen. Die Immunondtektion wurden mit myc- bzw. HA-Antikörpern analysiert. IB: Immunoblot

3.4 In vivo Interaktionsstudien mittels FRET-FLIM

Um die zuvor postulierten Interaktionen zwischen PiAVR2 und BSL1-3 *in vivo* weiter zu untersuchen und zu validieren, wurde ein Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) mit einer Zwei-Chromophor-Fluoreszenz-Lebenszeit-Image Mikroskopie (FLIM)-Analyse gekoppelt. Die Mitglieder der BSL-Familie wurden mit einem aminoterminalen GFP-tag unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors exprimiert (Abbildung 4 in Material und Methoden: Plasmid PUGT2).

Ergebnisse

PiAVR2 wurde mit einem carboxyterminalen *mCherry* unter der Kontrolle eines Estradiol-induzierbaren Promotors exprimiert (Abbildung 4 in Material und Methoden: XVE-System).

Das aminoterminal an die BSLs fusionierte GFP diente als Anregungs-Energie-Donor. *PiAVR2*-RFP diente als Akzeptor für den Energietransfer. *PiAVR2*-GFP-RFP wurde als Positivkontrolle für einen optimalen Energietransfers verwendet. Die GFP-Fluoreszenzlebenszeit von freiem GFP in Kombination mit *PiAVR2*-RFP fungierte als Negativkontrolle. Die Transformation der Zellkultur-Protoplasten wurde freundlicherweise von Catarina Brancato (zentrale Einrichtung, ZMBP) durchgeführt.

Die Messungen mit GFP-BSL1, GFP-BSL2 und GFP-BSL3 jeweils zusammen mit *PiAVR2*-RFP weisen signifikante Reduktionen ($p < 0,05$) der GFP-Fluoreszenzlebenszeit im Vergleich zur Negativkontrolle auf (s. Abbildung 10A). *PiAVR2* befindet sich also in ausreichender räumlicher Nähe zu BSL1-3, um einen Energietransfer zu ermöglichen. Obwohl die Reduktionen der Fluoreszenzlebenszeit verhältnismäßig gering sind, unterstützt dieses Ergebnis klar eine *in vivo* Interaktion von *PiAVR2*-RFP mit GFP-BSL1, GFP-BSL2 bzw. GFP-BSL3. Die Fluoreszenzlebenszeit von GFP-BSU1 war verglichen mit der Negativkontrolle nicht verringert, wenn es mit *PiAVR2*-RFP koexprimiert wurde. Das heißt, dass sich *PiAVR2*-RFP nicht nah genug an GFP-BSU1 befindet, um eine Interaktion dieser zwei Proteine zu ermöglichen.

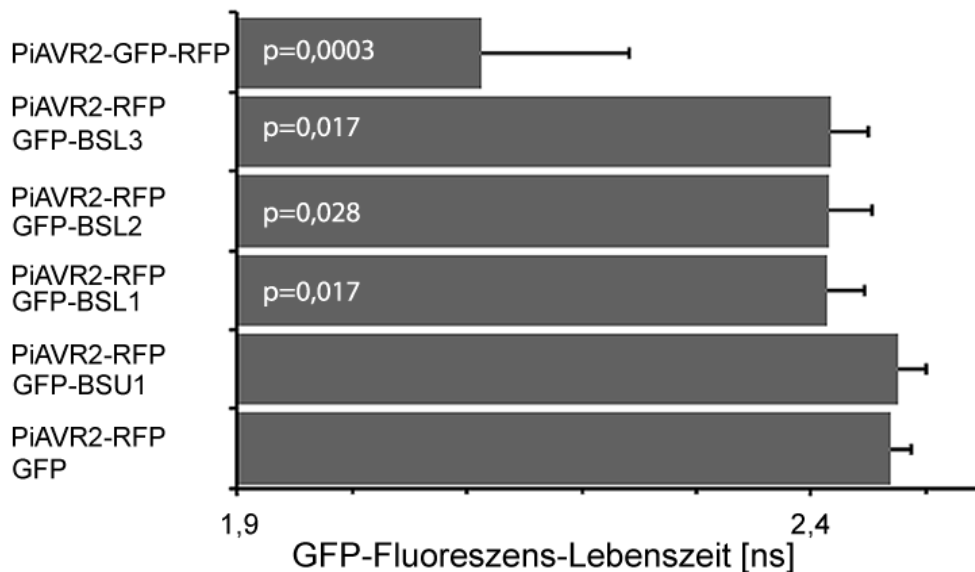


Abbildung 10: *In vivo* Interaktionsstudien mittels FRET-Messungen

In vivo GFP-Fluoreszenzlebenszeit-Messungen mit den angegebenen Proteinkombinationen wurden 24 h nach der Transformation von Zellkultur-Protoplasten durchgeführt. Die Induktion der Expression erfolgte 8 h nach der Transformation durch Estradiolzugabe.

PiAVR2-GFP-RFP = Positivkontrolle; PiAVR2-RFP + freies GFP = Negativkontrolle

3.5 Ko-Lokalisationstudien zwischen PiAVR2 und den Proteinen der BSU1-Familie

Unter der Kontrolle eines 35S-Promotors lokalisiert BSU1-YFP vorrangig im Zellkern und schwach im Cytoplasma (Kim *et al.*, 2009). BSL1-YFP hingegen konnte nur im Cytoplasma und in der Plasmamembran visualisiert werden (Kim *et al.*, 2009).

Um festzustellen, ob PiAVR2 mit den BSLs kolokalisiert, und um herauszufinden, ob PiAVR2 die Lokalisierung der BSLs verändert, wurden Lokalisierungsstudien in Mesophyll-Protoplasten mittels konfokaler Lasermikroskopie durchgeführt. Dafür wurden die gleichen Fusionskonstrukte wie in den FRET-FLIM Analysen verwendet. Abbildung 11 zeigt die Lokalisierung von PiAVR2-RFP und GFP-BSLs in *Arabidopsis*-Protoplasten. Alle GFP-BSLs konnten im Cytoplasma, insbesondere in der Zellperipherie, beobachtet werden. Jedoch lokalisierten nur GFP-BSU1, GFP-BSL2 und GFP-BSL3 auch im Zellkern. PiAVR2-RFP wurde im Cytoplasma der Zellperipherie und im Zellkern visualisiert.

Wie in Abbildung 12 zu sehen ist, kolokalisieren GFP-BSU1, GFP-BSL2 und GFP-BSL3 im Cytoplasma und im Zellkern mit PiAVR2-RFP. Die Koexpression von GFP-BSL1 mit PiAVR2-RFP führte zu einer Verlagerung von PiAVR2. Genau wie GFP-BSL1 allein konnte PiAVR2-RFP in Kombination mit GFP-BSL1 nur noch in der Zellperipherie, jedoch nicht mehr im Zellkern visualisiert werden.

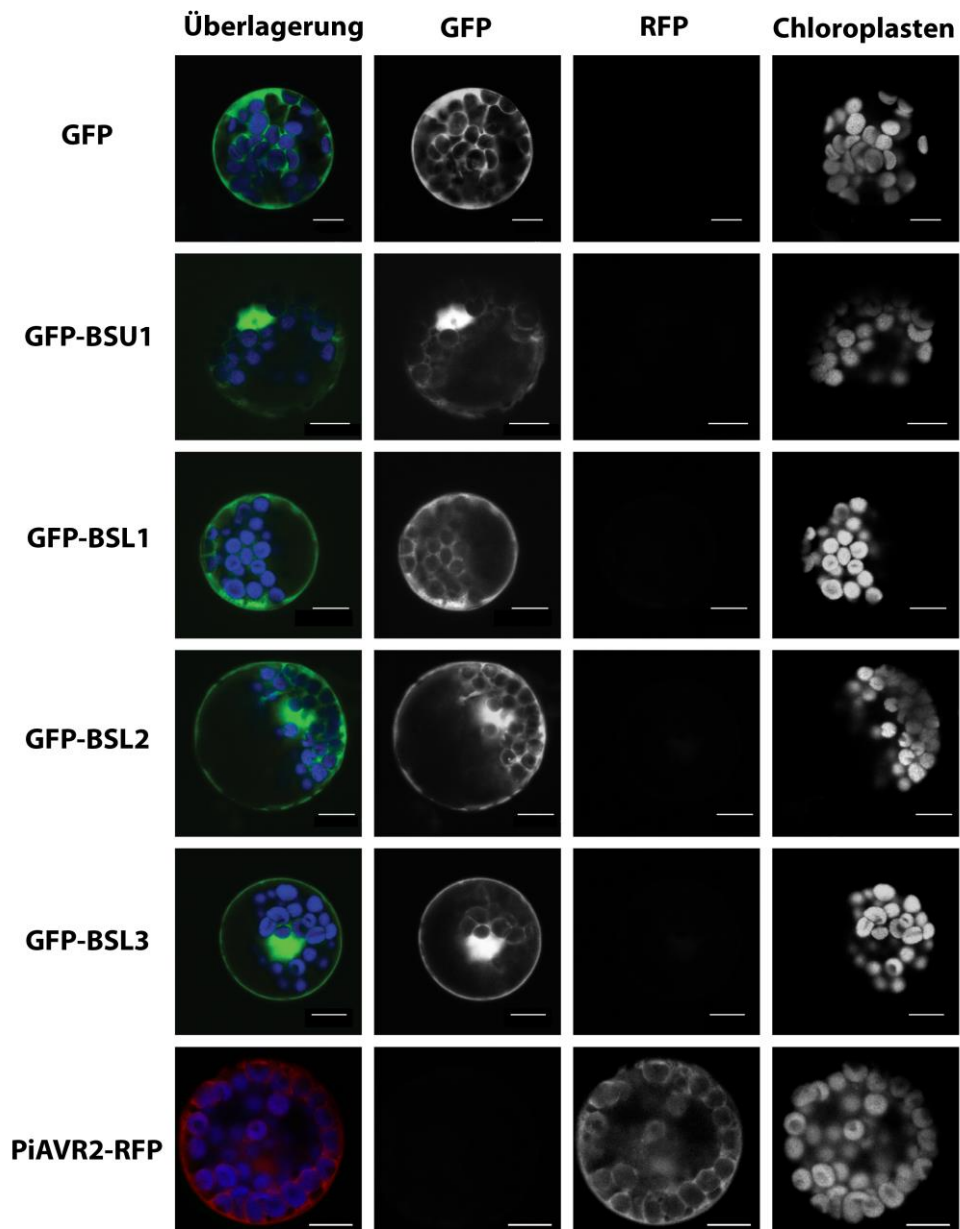


Abbildung 11: Lokalisation der GFP-BSLs und PiAVR2-RFP in Protoplasten

A. thaliana Protoplasten wurden mit den angegebenen Plasmidkombinationen transformiert und 16 h mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. In der farbigen Abbildung ist GFP in grün, RFP in rot und Chloroplasten in blau gezeigt. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

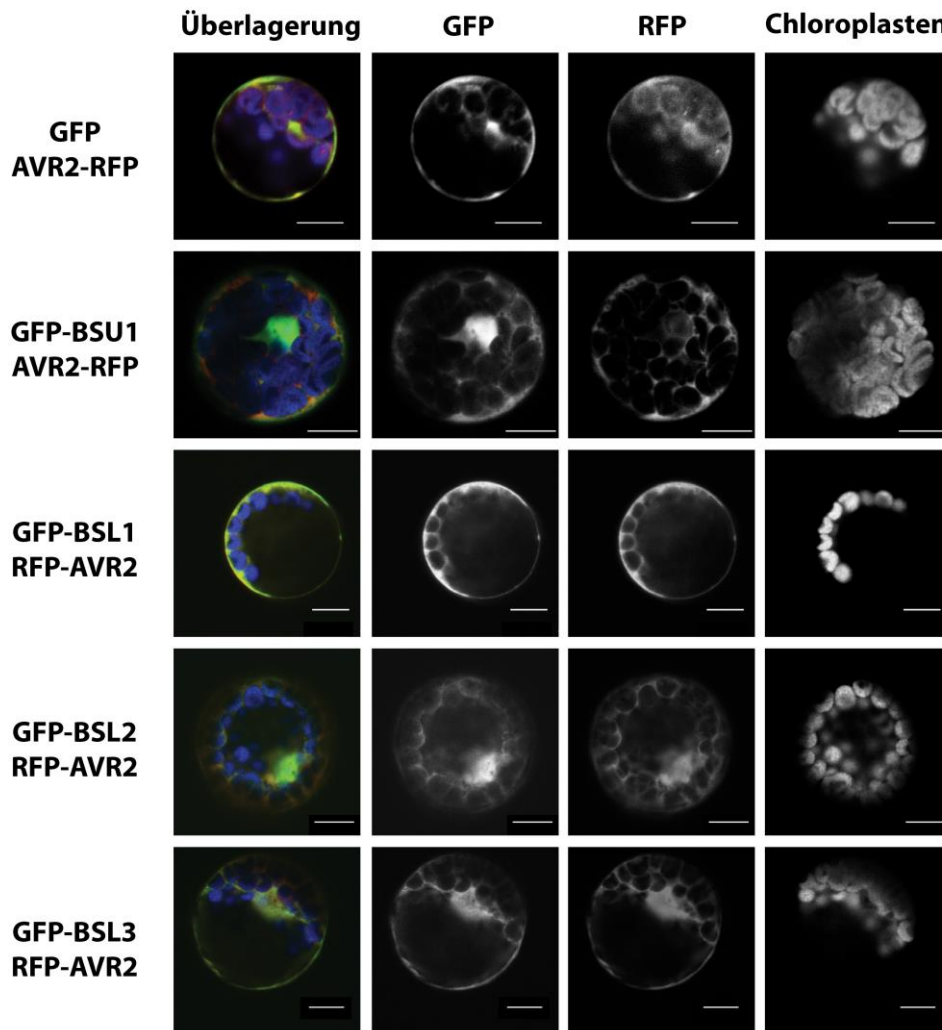


Abbildung 12: Kolokalisationsanalyse der GFP-BSLs und PiAVR2-RFP in Protoplasten

A. thaliana Protoplasten wurden mit den angegebenen Plasmidkombinationen kotransformiert und 16 h mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. In der farbigen Abbildung ist GFP in grün, RFP in rot und Chloroplasten in blau gezeigt. Überlagerungen von GFP und RFP werden in gelb dargestellt. Der Größenbalken entspricht 10 μm .

Mittels Agrobakterien-vermittelter Transformation wurden die gleichen Proteine transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert (s. Kapitel 2.3.6), um die Lokalisation der Proteine *in planta* zu bestätigen. Nach 48 h wurde die Lokalisation der Kelchphosphatasen und von PiAVR2 mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. GFP-BSU1 lokalisierte wie erwartet stark im Zellkern und schwach im Cytoplasma (s. Abbildung 13 A). Der dunkle Fleck auf dem Zellkern ist das Zentralkörperchen, in dem kein GFP-BSU1 visualisiert werden konnte. Obwohl BSU1 die größte Homologie mit BSL1 aufweist, lokalisiert GFP-BSL1 als einzige Kelchphosphatase ausschließlich im Cytoplasma (s. Abbildung 13 B). GFP-BSL2 und GFP-BSL3 sind wie GFP-BSU1 vorrangig im Zellkern, ebenfalls nicht im Zentralkörperchen und nur minimal im Cytoplasma, vertreten (s. Abbildung 13 C und D). PiAVR2-RFP lokalisiert in Tabak in den gleichen Kompartimenten wie GFP-BSU1, GFP-BSL2 und GFP-BSL3. Das RFP-Signal konnte in der Zellperipherie, sowie im Cytoplasma und im Zellkern, jedoch nicht im Zentralkörperchen

Ergebnisse

visualisiert werden (s. Abbildung 13 E). Diese Ergebnisse bestätigen die Lokalisationen der Proteine in Protoplasten.

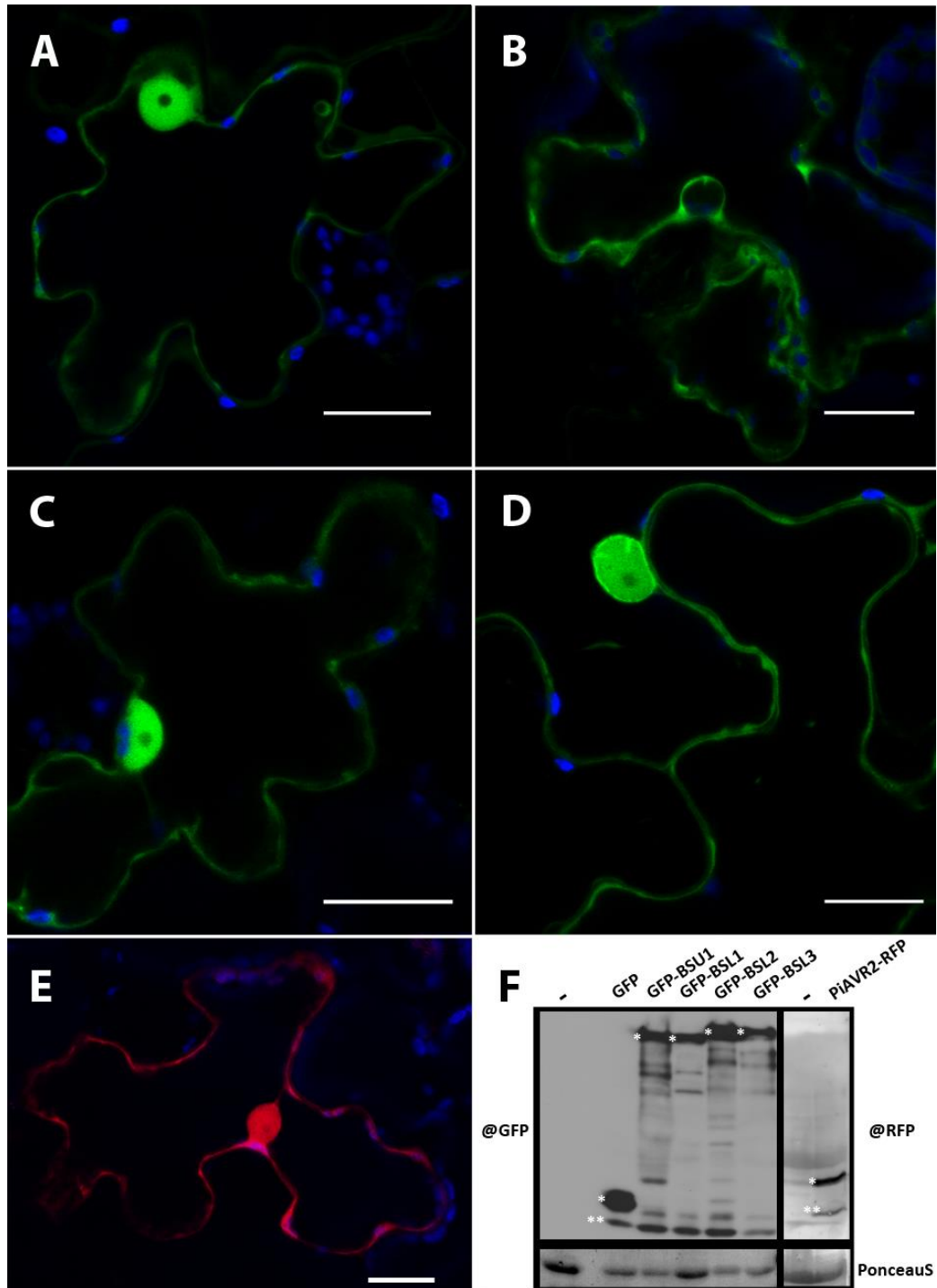


Abbildung 13: Lokalisation von PiAVR2 und den Kelchphosphatasen in Tabak

Die transiente Expression von (A) GFP-BSU1, (B) GFP-BSL1, (C) GFP-BSL2, (D) GFP-BSL3 und (E) PiAVR2-RFP in *N. benthamiana* wurde nach 48 h mittels konfokaler Laser mikroskopie analysiert. grün: GFP; rot: RFP; blau: Chloroplasten; Größenbalken: 20 µm (F) Immundetektionen der Expressionen in Tabak: Die Expressionskontrollen wurden 96 h nach *Agrobakterien*-Infiltration in Tabak geerntet. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit GFP bzw. RFP Antikörpern analysiert. Als Ladekontrolle ist jeweils die Ponceau-Färbung der Membranen nach dem Blot gezeigt. * zu erwartende Banden der Fusionsproteine; ** Degradationsbanden

Die vollständige Expression der Fusionsproteine in Tabak wurde mittels Immundetektion mit GFP- bzw. RFP-Antikörpern überprüft (s. Abbildung 13 F). Die Fusionsproteine der Kelchphosphatasen laufen alle ein wenig langsamer als entsprechend ihrer theoretischen Größe zu erwarten wäre. Dies lässt vermuten, dass sie glykosyliert oder phosphoryliert vorliegen. Sowohl die GFP-Fusionsproteine als auch das PiAVR2-RFP zeigen Degradationsbanden. Der Großteil der Proteine ist allerdings intakt.

3.6 Untersuchung des Einflusses von *PiAVR2* auf den Brassinosteroid-Signalweg

Die Kelchphosphatasen BSU1 und BSL1 sind positive Regulatoren im Brassinosteroid (BR)-Signalweg (*Mora-Garcia et al., 2004*). Bindet Epibrassinolid (BL) an den Rezeptor BRI1, so wird der BR-Signalweg induziert und im Zuge dessen BSU1 und BSL1 aktiviert. BSU1 dephosphoryliert die GSK3-Kinase BIN2. Dadurch kann BIN2 nicht mehr die Transkriptionsfaktoren BZR1 und BZR2 (früher BES1: *BRI1-INSENSITIVE-EMS*-Mutante) phosphorylieren und inaktivieren. De-Phosphorylierte BZR1 und BZR2 können so im Zellkern die Regulation von BR-regulierten Genen steuern. Der Transkriptionsfaktor BZR2 und verschiedene BR-regulierte Gene wurden als Marker benutzt, um den Einfluss von PiAVR2 auf den BR-Signalweg zu bestimmen.

3.6.1 Einfluss von *PiAVR2* auf die BR-abhängige Aktivierung von BZR2

Eine Immundetektion von endogenem BZR2 kann nur mit BZR2-spezifischen Antikörpern erfolgen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Yanhai Yin, Ames, IA, USA). Allerdings konnte mit BZR2-Antikörpern kein endogenes BZR2 in Mesophyll-Protoplasten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der Grund hierfür liegt möglicherweise am geringen Expressionsniveau von BZR2 in erwachsenen Pflanzen oder die, aus den Protoplasten extrahierte, Proteinmenge ist nicht ausreichend für eine Immundetektion von endogenem BZR2.

Um diese Problematik zu umgehen, wurde ein BZR2-GFP Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Sacco de Vries, Wageningen, NL) unter der Kontrolle eines 35S-Promotors in Mesophyll-Protoplasten transformiert. In der GFP-Kontrolle in Abwesenheit von BL zeigt die Immundetektion dieser BZR2-GFP Fusionsproteine mit GFP-Antikörpern zwei deutliche Banden (s. Abbildung 14 A). Die Bande bei 70 kDa ist unphosphoryliertes BZR2. Die obere Bande (bei rund 85 kDa) entspricht der phosphorylierten Form von BZR2 (pBZR2).

Bereits nach einer Stunde Behandlung mit 1 μ M Epibrassinolid (BL) akkumuliert unphosphoryliertes BZR2-GFP. Das Protoplastensystem zeigt also dieselbe Reaktion auf BL wie 35S::BZR2-GFP Keimlinge (*Yin et al., 2002*) und scheint bestens geeignet für die Untersuchung eines Effektes von PiAVR2 auf die Aktivierung von BZR2. Die Koexpression von BZR2-GFP mit GFP-PiAVR2 führt zur Detektion von BZR2-GFP nur in seiner aktiven (dephosphorylierten) Form, unabhängig von der Behandlung mit BL (s. Abbildung 14 B). Diese scheinbare Aktivierung des Transkriptionsfaktor BZR2-GFP in Präsenz GFP-PiAVR2 impliziert, dass PiAVR2 ein positiver Regulator der BSLs ist.

Ergebnisse

Daher müsste sich eine GFP-PiAVR2-Expression positiv auf die Aktivierung der Brassinosteroid-Signalkaskade auswirken. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde die Expression von Brassinosteroid-regulierten Genen überprüft.

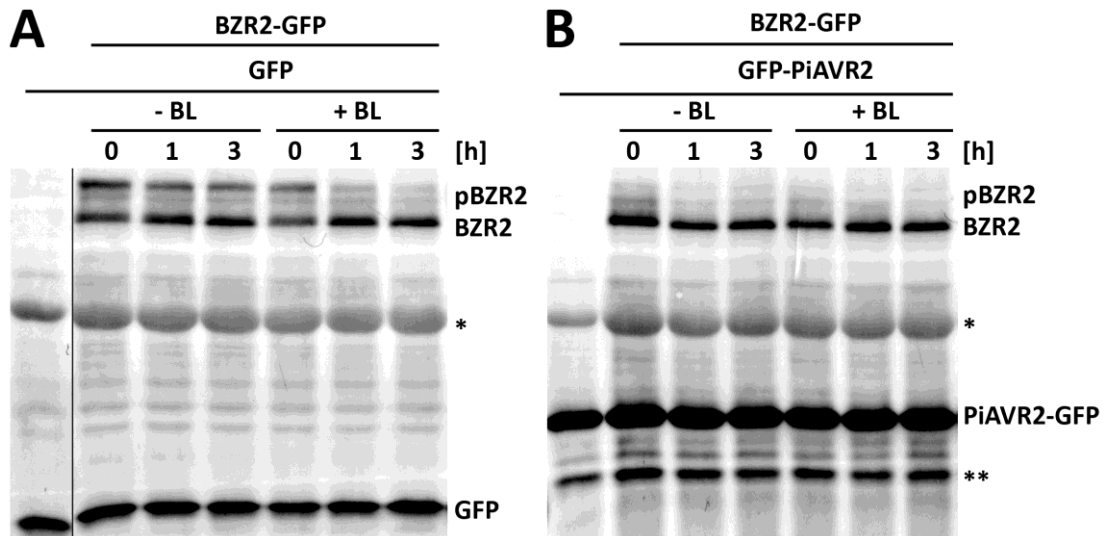


Abbildung 14: Einfluss von PiAVR2 auf die Aktivierung von BZR2-GFP

A. thaliana Mesophyll-Protoplasten wurden mit GFP-BZR2 und GFP bzw. GFP-PiAVR2 kotransformiert und 16 h später 0-3 h mit 1 μ m Epibrassinolid (BL) respektive Wasser behandelt. Die Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit GFP-Antikörpern analysiert.

* Unspezifische Bande = Rubisco, dient als Ladekontrolle; ** Abbaubanden von PiAVR2-GFP; pBZR2 = phosphoryliertes, inaktives BZR2

3.6.2 Einfluss der PiAVR2-Expression auf die Expression von Brassinosteroid-regulierten Genen

Der BR-Signalweg kontrolliert eine große Vielfalt von Genen, wobei das Ausmaß der Variation der Expression bei den meisten Genen jedoch sehr klein ist, im Durchschnitt nur zwei- bis maximal dreifach reguliert (Goda *et al.*, 2002). Es ist ausführlich dokumentiert, dass die Aktivierung des Transkriptionsfaktors BZR2 (in der Mutante *bes1-D*) zur Induktion von über 1800 Genen führt (Yu *et al.*, 2011). Dabei reguliert aktiviertes BZR2 nicht nur BR-responsive Gene, sondern koreguliert auch zusammen mit Auxin die Expression vieler weiterer Gene, darunter die Induktion der Gene *SMALL AUXIN-UPREGULATED (SAUR)*. Zu den frühesten BR-regulierten Genen gehört *SAUR-AC1* (Goda *et al.*, 2002). Durch die Behandlung mit exogenem Epibrassinolid (BL) wird *SAUR-AC1* bereits nach 30 min hochreguliert und die Expression hat ihr Maximum 12 h nach BL-Behandlung (Goda *et al.*, 2002). Wohingegen eine Behandlung mit dem BR-Biosynthese-Hemmer Brassinazol (BRZ) die Expression von *SAUR-AC1* und seine Homologen *SAUR-65* und *SAUR-68* reprimiert (Li *et al.*, 2009).

Brassinazol (BRZ) wird in Experimenten oft als Gegenspieler von Brassinolid eingesetzt. BRZ ist eine künstliche Triazolverbindung, welche die BR-Biosynthese spezifisch blockiert. BRZ inhibiert die Cytochrom P450-Steroid C22-Hydroxylase, die durch das Gen *DWARF 4 (DWF4)* kodiert wird (Asami *et al.*, 2001).

Dadurch verursacht BRZ bei Pflanzen De-Etiolierungen im Dunkeln und Zwergenwuchs, wie bei BR-defizienten Mutanten (Asami *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002).

Im Folgenden wurde untersucht, ob PiAVR2 die Expression der SAUR-Gene induziert. Dafür wurde in GFP- und GFP-PiAVR2-exprimierenden Protoplasten die Expression der Gene *SAUR-AC1* und *SAUR-65* nach Zugabe von jeweils BL oder BRZ mittels qRT-PCR bestimmt. Die Behandlung mit BL führte wie erwartet in GFP-exprimierenden Protoplasten zu einer Induktion der SAUR-Genexpression. Nach Zugabe von BRZ wurde das Transkriptlevel von *SAUR-AC1* und *SAUR-65* um das 8- bzw. 4-fache reduziert. GFP-PiAVR2-exprimierende Protoplasten zeigten ein gleichbleibend niedriges Expressionslevel von *SAUR-AC1* und *SAUR-65* (s. Abbildung 15). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass PiAVR2 eher als negativer Regulator des Brassinosteroid-Signalweges wirkt. Dieses Ergebnis konnte wegen technischer Probleme nur bedingt reproduziert werden. Des Weiteren steht es in Diskrepanz mit dem eher positiven Effekt von PiAVR2 auf BZR2 mit der Stabilisierung der dephosphorylierten Form (s. Kapitel 3.6.1).

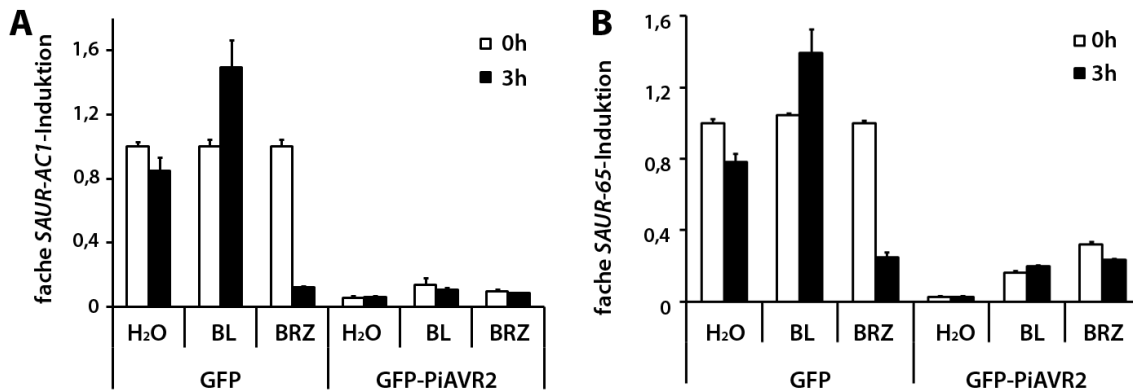


Abbildung 15: Der Einfluss von PiAVR2 auf die Genexpression der SAUR-Gene

16 h nach der Transformation wurden GFP- und GFP-PiAVR2-exprimierende Protoplasten mit 1 μ M Epibrassinolid (BL), 1 μ M Brassinazol (BRZ) oder Wasser (H₂O) behandelt. Die Genexpression wurde nach 0 und 3 Stunden mit RT-qPCR-spezifischen Primern für die entsprechenden Gene untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung. Die jeweiligen 0 h Werte wurden dabei jeweils auf eins gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 Replikaten. *SAUR-AC* = At4g38850 *SAUR-65* = At1g29460

Mithilfe des Protoplasten-Systems konnten oben genannte Erkenntnisse über die Interaktionen und molekularen Effekte von PiAVR2 gewonnen werden. Jedoch zeigte dieses System auch seine Grenzen, da z.B. die BZR2-Aktivierung nicht mit endogenem BZR2 nachgewiesen werden konnte, sondern nur mit artifiziell überexprimiertem GFP-BZR2. Das könnte erklären, warum PiAVR2 einen positiven Effekt auf die Aktivierung von BZR2, jedoch einen negativen Effekt auf die Genexpression der SAUR-Gene zeigt. Daher wurde der Einfluss von PiAVR2 auf den Brassinosteroid-Signalweg im Folgenden in GFP-PiAVR2-Pflanzen untersucht.

3.7 Funktionelle Charakterisierung von PiAVR2 in planta

3.7.1 Generierung von konstitutiven und induzierbaren GFP-PiAVR2- und *A. thaliana*-Linien

Die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse mit Protoplasten zeigen die Notwendigkeit, die Funktion von PiAVR2 in planta zu untersuchen. Dafür wurde eine 35S::*eGFP-PiAVR2*-Kassette stabil in *Arabidopsis thaliana* transformiert. Die Expression des GFP-PiAVR2 erfolgt konstitutiv. Die Pflanzen wurden mit mikroskopischen Analysen und Western Blot-Analysen auf die Expression von GFP-PiAVR2 untersucht. Je stärker die Expression von GFP-PiAVR2 war, desto extremer waren die morphologischen Veränderungen der Pflanzen (s. Abbildung 16 und Kapitel 3.7.3).

Die T1-Pflanzen mit einer mittleren bis starken Expression des Fusionsproteins wurden selektiert und in jeder weiteren Generation auf das Vorhandensein der Fusionskassette überprüft. Bis zur T4-Generation kam es zum Teil zu starker Inaktivierung der Genexpression von *GFP-PiAVR2*. Bei einigen Pflanzen wiesen nur noch einige Zellen ein GFP-Signal in der mikroskopischen Analyse auf. Oft kam es jedoch zu einer Unterdrückung der GFP-PiAVR2-Expression in der ganzen Pflanze (Silencing Effekt) und GFP-PiAVR2 konnte nicht mittels Immunoblot detektiert werden. Mit den Linien *GFP-PiAVR2* #1 und #2 wurden alle weiteren Experimente durchgeführt.

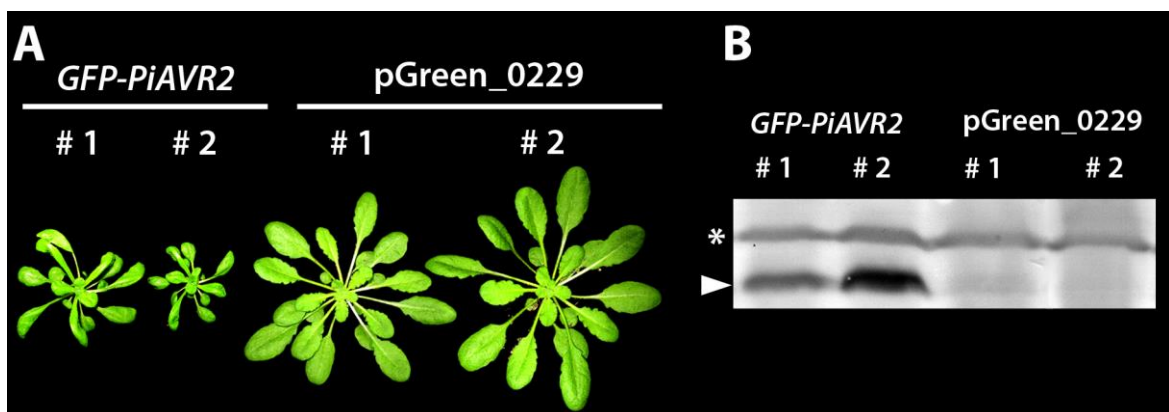


Abbildung 16: Das Expressionslevel von GFP-PiAVR2 beeinflusst den Phänotyp

Das Expressionslevel von GFP-PiAVR2-Pflanzen mit verschieden stark ausgeprägtem Phänotyp (A) wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunblot mit GFP Antikörpern analysiert (B). pGreen_0229 = mit leerem Vektor transformierte Kontrollpflanze; Pfeil = GFP-PiAVR2; * unspezifische Bande als Ladekontrolle

Des Weiteren wurden pDex::*GFP-PiAVR2*-Linien generiert (s. GVG-System Abbildung 4 und Kapitel 2.4.6). Die Expression des GFP-PiAVR2-Fusionsproteins konnte in diesen Pflanzen durch Zugabe von Dexamethason transient induziert werden (s. Abbildung 17). Diese Pflanzen zeigten sowohl im Wachstum als auch in der Entwicklung einen WT-Phänotyp.

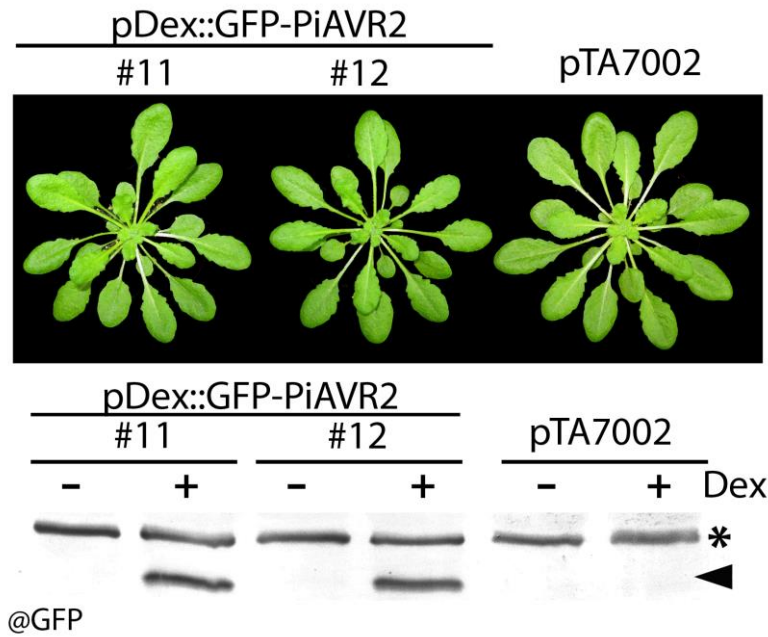


Abbildung 17:
Induzierbare GFP-PiAVR2-Linien zeigen einen WT-Phänotyp

Zwei pDex::GFP-PiAVR2-Linien und eine pTA7002-Kontrolllinie wurden vier Wochen im Kurztag kultiviert. Die Pflanzen wurden mit 20 μ M Dexamethason oder Wasser besprüht und 24 h später je eine Blattscheibe geerntet. Die daraus erhaltenen Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-GFP-Antikörpern analysiert. Pfeil = GFP-PiAVR2; *unspezifische Bande dient als Ladekontrolle

3.7.2 GFP-PiAVR2 lokalisiert in *A. thaliana* im Cytoplasma und im Zellkern

Nach transienter Expression von PiAVR2-RFP in Mesophyll-Protoplasten konnte das Fusionsprotein hauptsächlich im Cytoplasma visualisiert werden (s. Kapitel 3.5 Abbildung 11 Abbildung 12). Eine transiente Expression von PiAVR2-RFP in der Wirtspflanze Tabak zeigte eine deutliche Lokalisation von PiAVR2-RFP in der Zellperipherie sowie im Cytoplasma und im Zellkern (Abbildung 13 E). Diese Lokalisation sollte nun mit mikroskopischen Analysen von *35S::GFP-PiAVR2*-Linien und *pDex::GFP-PiAVR2*-Linien bestätigt werden. Abbildung 18 zeigt, dass GFP-PiAVR2 in stabilen und induzierbaren *Arabidopsis*-Linien im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Das GFP-Signal ist in Membrannähe sehr stark, jedoch sind auch deutlich Cytoplasmastränge, z. B. zum Zellkern (s. Abbildung 18 B), sichtbar. Eine zusätzliche Lokalisierung in der Zellmembran kann nicht ausgeschlossen werden. Zum Teil waren auch in den *Arabidopsis*-Linien Vesikel mit GFP-PiAVR2-Akkumulationen sichtbar. Es kann also geschlossen werden, dass GFP-PiAVR2 vorrangig in der Zellperipherie, im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert.

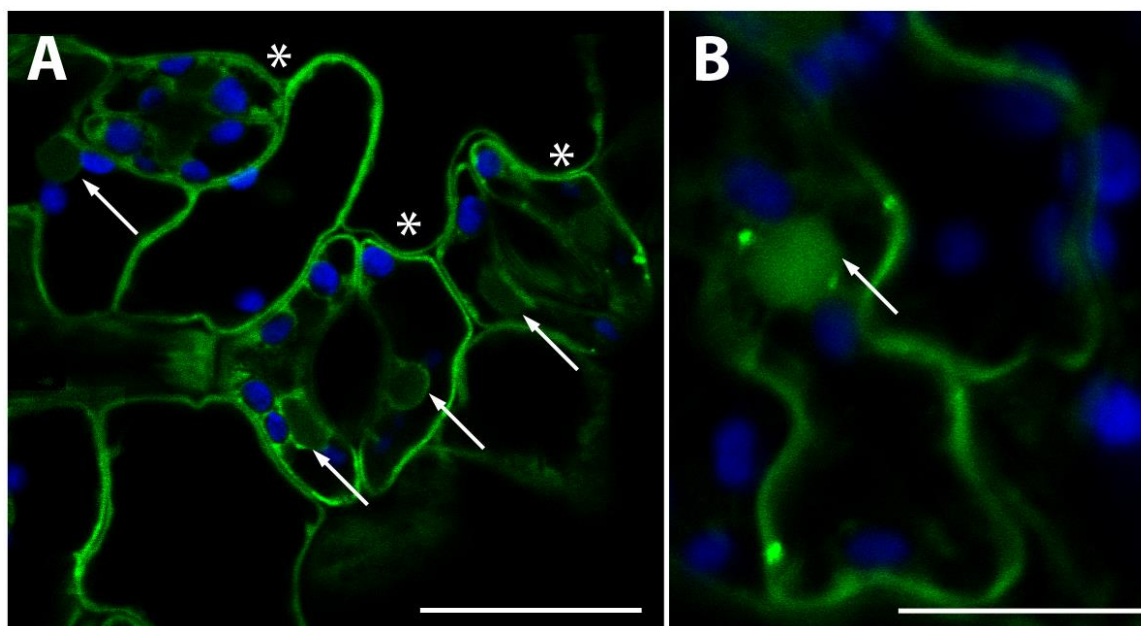


Abbildung 18: Lokalisation von GFP-PiAVR2 in *Arabidopsis thaliana*

Konfokale Lasermikroskopie von (A) *35S::GFP-PiAVR2*- und (B) *pDex::GFP-PiAVR2*-Pflanzen (24 h nach Dexamethason-Behandlung). Grün: GFP; Blau: Chloroplasten; Pfeil: Zellkern; * Stomata; Größenskalen = 20 µm

3.7.3 MS-basierte IP Analyse von *GFP-PiAVR2*-Linien

Im Folgenden sollte getestet werden, ob in *GFP-PiAVR2*-Linien auch eine Interaktion von GFP-PiAVR2 mit BSL1, BSL2 und BSL3 nachgewiesen werden kann, wie bei der transienten Expression von GFP-PiAVR2 in Protoplasten. Dafür wurden diese Überexpressionslinien zwei und vier Wochen bei kontinuierlichem Licht angezogen. Die Proteinextrakte der Keimlinge bzw. Pflanzen wurden mittels Immunopräzipitation an Protein A Agarose, an der kovalent GFP-Antikörper gebunden waren, aufkonzentriert. Diese Proben wurden von Mirita Franz mit LC-Tandem-Massenspektroskopie auf die Anwesenheit der Kelchphosphatasen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Interaktion von GFP-PiAVR2 mit BSL1, BSL2 und BSL3 wurde sicher nachgewiesen. Auch in dieser dritten MS-basierten CoIP-Analyse konnte keine Interaktion mit BSU1 nachgewiesen werden.

Tabelle 9 Ergebnisse der Tandem MS Analyse der Immunopräzipitation von *GFP-PiAVR2*-Pflanzen

Proteine gelten als sicher identifiziert, wenn die Summe der MASCOT-Werte aller Peptide dieses Proteins > 47 war. Rate für Falschpositive: MASCOT > 32; $p < 0,01$. MASCOT > 25; $p < 0,05$.

Name	Funktion	Uniprot	Peptide identifiziert in	
			14 d alten Pflanzen	28 d alten Pflanzen
BSL1	Ser/Thr-Protein Phosphatase	Q8L7U5	7	2
BSL2; BSL3	Ser/Thr-Protein Phosphatase	Q9SJF0; Q9SHS7-1; Q9SHS7-2	12	8

3.7.4 Wachstums- und Entwicklungsphänotyp der GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien

Wie Abbildung 16 zeigt, sind *GFP-PiAVR2*-Pflanzen deutlich kleiner als der Wildtyp. Die Blätter der Überexpressionslinien sind epinastisch (nach unten gewölbt) und weisen eine proximodistale Verkürzung auf. Die *GFP-PiAVR2*-Linien zeigen des Weiteren eine Auswärtskrümmung der Rosettenblätter. Der Wachstums- und Entwicklungsphänotyp der Pflanzen variiert mit der Tageslichtlänge während der Anzucht. Je länger die tägliche Beleuchtung ist, desto ausgeprägter wird der Phänotyp und desto kleiner werden die Pflanzen (s. Anhang: Abbildung 48, Abbildung 49 und Abbildung 50). Erfolgt eine Anzucht mit mindestens 16 h Licht am Tag, sind die *GFP-PiAVR2*-Linien zwergenwüchsig. Nach vier Wochen im Langtag erreichen die Pflanzen je nach GFP-PiAVR2-Expressionslevel nur 25-60 % der durchschnittlichen Wildtypgröße. Im Dauerlicht wird dieser Defekt des Streckungswachstums noch deutlicher. Die Überexpressionslinien erreichen nach vier Wochen nur 6-50 % der Größe des Wildtypes. Je stärker die GFP-PiAVR2-Expression in den einzelnen Pflanzen ist, desto mehr ähnelt ihr Phänotyp den Brassinosteroid Mutanten. Jedoch ist der Phänotyp nicht eindeutig den Brassinosteroid-insensitiven, oder BR-defizienten oder BR-überaktiven Mutantane zuzuordnen.

Die Pflanzen sind extrem klein und kompakt wie der Kohlkopf-Phänotyp der Brassinosteroid-insensitiven Mutante *bri1-1* (Clouse et al., 1996).

Die *GFP-PiAVR2*-Linien zeigen des Weiteren eine Auswärtskrümmung der Rosettenblätter, wie sie für BR-überaktive Mutanten wie *35S::BRI-GFP* (Wang et al., 2001), *35S::DWF4* (Choe et al., 2001) und die *ces-D* Mutante (Poppenberger et al., 2011) typisch ist. Besonders deutlich wird dies bei Anzucht im Kurztag. Allerdings weisen Pflanzen, die eine verstärkte BR-Antwort zeigen, weil sie mehr *BRI1*-Rezeptoren oder eine erhöhte Biosynthese von BR haben, auch eine Verlängerung der Blattstiele auf. Die *GFP-PiAVR2*-Linien haben jedoch im Gegensatz zu diesen Mutanten kürzere Petiolen als der WT (s. Abbildung 19). Dies ist ein typischer Phänotyp für BR-defiziente oder -insensitive Mutanten.

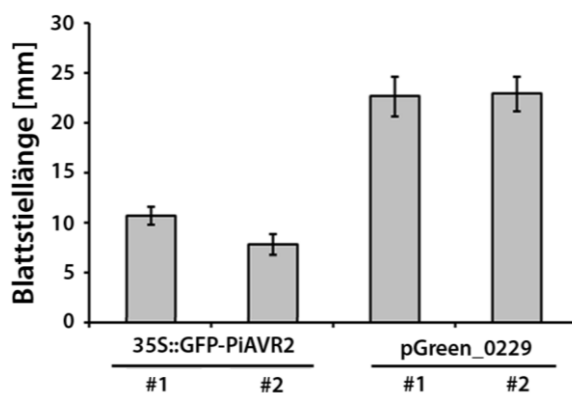


Abbildung 19: Blattstiellänge verschiedener GFP-PiAVR2-Linien

Bestimmung der Blattstiellänge von zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und zwei pGreen_0229-Kontrolllinien. Pflanzen wurden 5,5 Wochen im Kurztag kultiviert und die Petioluslänge des fünften Blattes vermessen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils zwölf Pflanzen aus drei unabhängigen, biologischen Replikaten.

Ergebnisse

Die Schoten der *GFP-PiAVR2*-Linien sind kleiner und dicker als die Schoten des Wildtyps (s. Abbildung 20). Bei Anzucht im Dauerlicht erreichten die kleinsten Schoten nur eine Länge von 2 mm und enthielten keine keimfähigen Samen mehr. Daher wurden die Pflanzen zur Samengewinnung im Kurztag kultiviert.

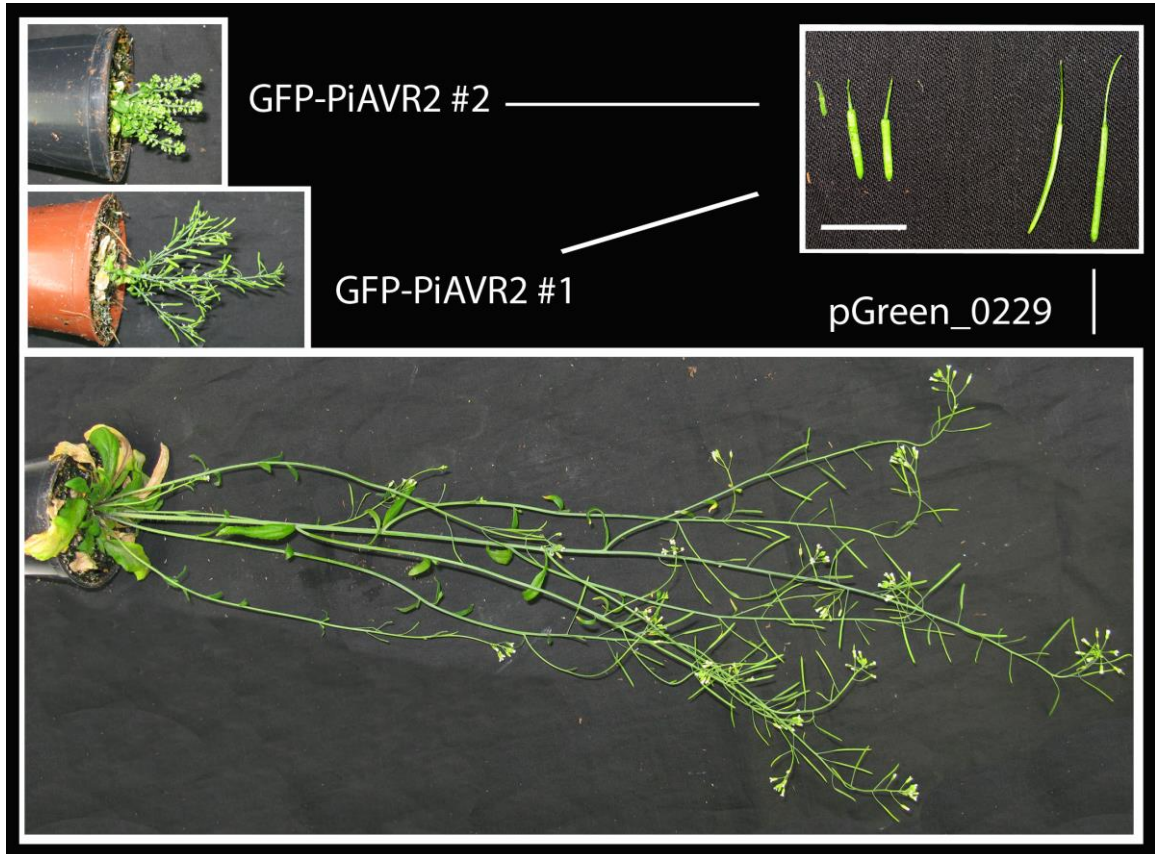


Abbildung 20: Schotenbildung GFP-PiAVR2-Linien

Pflanzen wurden acht Wochen im Dauerlicht kultiviert. Detailaufnahme rechts oben: Schoten dieser Pflanzen im Vergleich. Größenbalken = 1cm

3.7.5 Untersuchung des PiAVR2-Effektes auf BR-regulierte Antworten

3.7.5.1 Die Überexpression von GFP-PiAVR2 beeinflusst die BR-regulierte Stomata Bildung und Dichte

Die Expression von GFP-PiAVR2 wurde mikroskopisch überprüft. Dabei fiel eine morphologische Besonderheit der Überexpressionslinien auf. Es kam zu einer Akkumulation von Spaltöffnungen. Im Wildtyp ist immer mindestens eine Epithelzelle zwischen zwei Stomata. In den Überexpressionslinien hingegen finden sich Doppel-, Dreier- oder Kettenstomata, zum Teil sogar ganze „Stomata-Felder“ mit bis zu 32 Spaltöffnungen direkt aneinander (s. Abbildung 21). Damit kommt es in den Überexpressionspflanzen zum Bruch der sogenannten „Eine-Zelle-Abstands-Regel“ (Sachs, 1991).

Bereits seit 1996 ist eine BR-defiziente Mutante bekannt, die Stomata überproduziert (Szekeres et al., 1996). Eine Deletion des Gens CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS AND DWARFISM (CPD) in der Mutante *cpd1* induziert doppelte Stomata in der adaxialen Blattepidermis. CPD kodiert für Cytochrom P450 (CYP) 90A1 ein Enzym der Brassinosteroidsynthese. Kim et al. (2012) zeigten, dass noch weitere BR-defiziente und BR-insensitive Mutanten Spaltöffnungen akkumulieren. Die *bri1*-Nullallelmutante *bri1-116* (Stop-Codon in der extrazellulären Domäne) (Li und Chory, 1997) und BR-Biosynthesemutante *det2-1* zeigen nur einen milden Stomata-Akkumulations-Phänotyp. Die dominante Funktionsgewinnmutation *bin2-1* (Vert und Chory, 2006) sowie auch eine Überexpression dieses negativen Regulators des BR-Signalweges induzieren eine stärkere Anhäufung von Stomata. Besonders schwerwiegend sind die Veränderungen der Stomatogenese in der *bsu-q* Mutante, in der die Expression aller BSLs fehlt bzw. herunterreguliert ist (*amiRNA-BSL2,3 bsu1 bs11*). Es kommt zu Stomata-Gruppierungen am Hypokotyl und die Epidermis der Kotelydonen besteht fast ausschließlich aus Stomata. Die Überexpression von GFP-PiAVR2 führt ebenso zu einer exzessiven Anhäufung von Stomata am Hypokotyl (Daten nicht gezeigt) und in der abaxialen Epidermis von Kotelydonen und Rosettenblättern wie es auch für die *bsu-q* Mutante beobachtet wird (Kim et al., 2012).

Kim et al. (2012) postulieren eine negative Korrelation von Stomatogenese und BR-Signalweg. Der Stomata-Phänotyp in *PiAVR2*-Überexpressionslinien lässt also auf eine verringerte Aktivität von BSU1 (und damit eventuell auch der anderen BSLs) durch die Interaktion mit PiAVR2 schließen.

GFP-PiAVR2-Linien unter der Kontrolle eines Dexamethason-induzierbaren Promotors zeigen WT-Phänotyp. Keimen die *pDex::GFP-PiAVR2*-Linien aber direkt auf MS-Medium mit Dexamethason aus, so finden sich in der Epidermis der Kotelydonen und des Hypokotyls ebenso exzessive Anhäufungen von Spaltöffnungen, wie in den 35S-Überexpressionslinien (s. Abbildung 22)

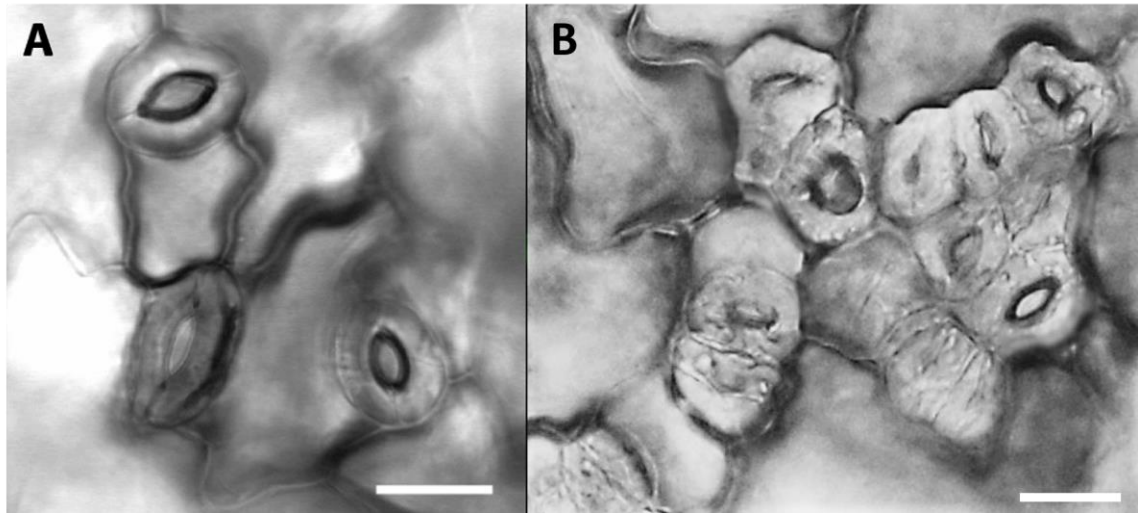


Abbildung 21: Stomata-Phänotyp in 35S::GFP-PiAVR2-Linien

(A) Differenz-Interferenz-Kontrast (DIC) Analyse von 14 Tage alten pGreen_0229 (A) und 35S::GFP-PiAVR2-(B) *A. thaliana*-Linien. Größenbalken 20 μm

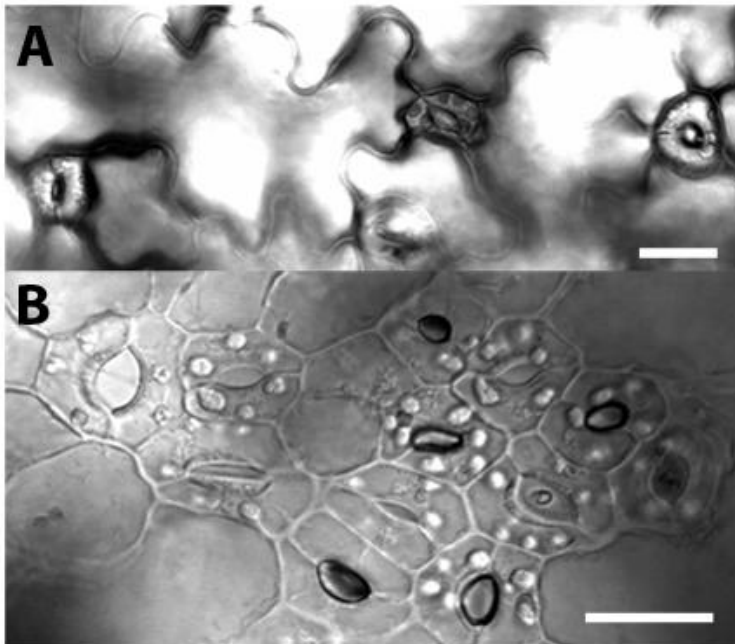


Abbildung 22: Stomata-Phänotyp in pDex::GFP-PiAVR2-Linien

Differenz-Interferenz-Kontrast (DIC) Analyse von 6 Tage alten pDex::GFP-PiAVR2-*A. thaliana*-Kotyledonen ohne (A) bzw. mit 1 μM (B) Dexamethason auf 0,5 x MS angezogen. Größenbalken: 20 μm

Kim *et al.* (2012) zeigten des Weiteren, dass eine Aktivierung des BR-Signalweges den Stomata-Phänotyp der BR-Mutanten zum Teil revertieren kann. Dies wurde durch exogene BL-Zugabe oder mittels BIKININ erreicht. BIKININ ist ein spezifischer Inhibitor der GSK3-ähnlichen Kinasen und hemmt daher BIN2, den negativen Regulator des BR-Signalweges.

Im Folgenden wurde untersucht, ob der Stomata-Phänotyp der stabilen GFP-PiAVR2-Linien ebenso durch Zugabe von exogenem BL revertierbar ist. Wie in Abbildung 23 gezeigt, hat BL-haltiges Medium keinen Einfluss auf die Stomatogenese der Kontrollpflanzen. Keimen jedoch GFP-PiAVR2-Linien auf MS-Medium mit BL, so verringert sich die Anzahl der Stomata pro Akkumulation von durchschnittlich 15-17 Stomata (ohne BL) auf 5-8 Stomata (mit BL).

Der Stomata-Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien ist also durch Zugabe von exogenem BL teilweise revertierbar. Diese Experimente zeigen, dass GFP-PiAVR2 wahrscheinlich eine negative regulatorische Funktion auf die BR-regulierte Bildung und Dichte von Stomata hat.

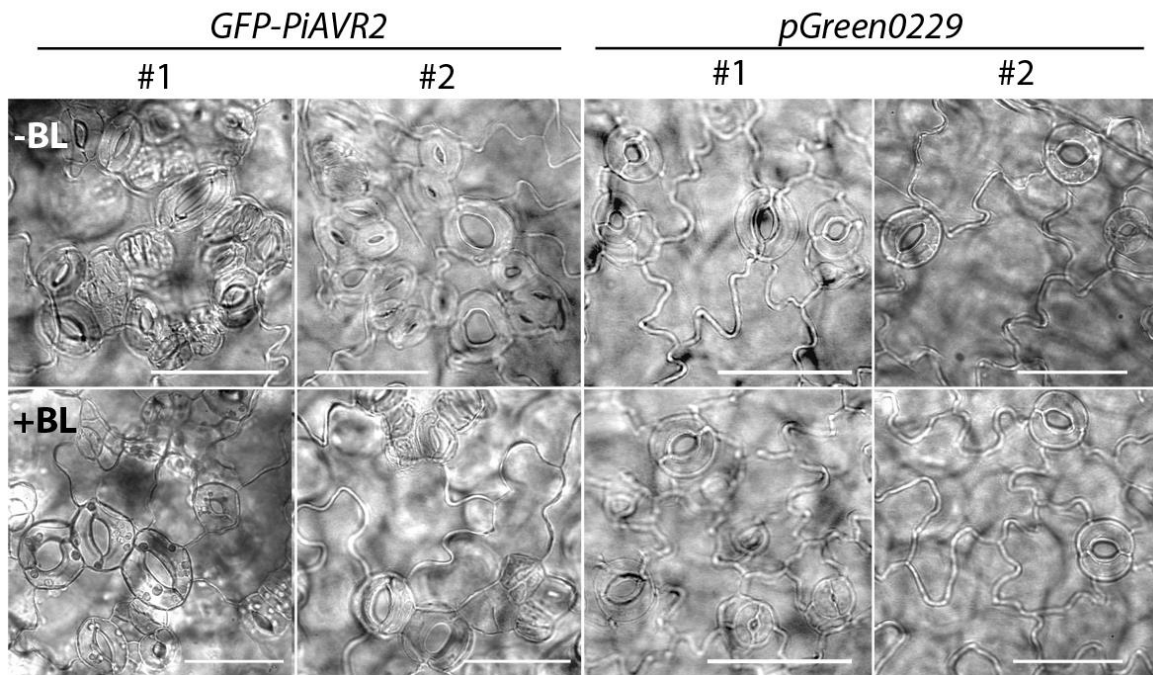


Abbildung 23: Der Stomataphänotyp in 35S::GFP-PiAVR2-Pflanzen ist teilweise revertierbar

Differenz-Interferenz-Kontrastmikroskopie (DIC) Analyse von 8 Tage alten 35S::GFP-PiAVR2-Kotyledonen ohne (-BL) oder mit (+BL) 2 nM Epibrassinolid auf 0,5 x MS Agar angezogen. Größenbalken: 50 µm

3.7.5.2 Die Überexpression von GFP-PiAVR2 beeinflusst nicht das BR-regulierte Wurzelwachstum

Brassinosteroide (BR) spielen in Pflanzen, neben der Regulation der Stomata Bildung, eine weitere essentielle Rolle, da sie ein breites Spektrum an Entwicklungs- und Wachstumsprozessen steuern (Clouse und Sasse, 1998; Kim et al., 2009; Vert et al., 2005). Brassinosteroid-defiziente oder -insensitive Mutanten zeigen viele Defekte, wie z. B. verminderte Samenkeimung, Photomorphogenese im Dunkeln, Zwergenwuchs und männliche Sterilität (Clouse und Sasse, 1998). Sie zeigen auch oft eine verringerte Wurzellänge, wie *brl* (Clouse et al., 1996) *det2* und *cpd1*. Mutationen, welche die Weiterleitung des BR-Signals verstärken, wie in den Funktions-gewinnmutanten *bes1-1D* (Yin et al., 2002), *bzr1-1D* (Wang et al., 2002) und *bsu1-1D* (Mora-Garcia et al., 2004), normalisieren das Wurzelwachstum. Andererseits ist die Hemmung des primären Wurzelwachstums durch exogene Zugabe von Brassinosteroiden in Wildtyp *A. thaliana* gut dokumentiert (Roddick und Guan, 1991). Untersuchungen haben ergeben, dass es sich dabei um eine negative Feedback-Regulation mittels des Transkriptionsregulators *brevis radix* (BRX) handelt. (Mouchel et al., 2006).

Ergebnisse

Wie in Abbildung 24 gezeigt wird, haben *GFP-PiAVR2*-Linien längere Wurzeln als die Kontrollpflanzen (Col-0 und pGreen0229), aber die Behandlung mit exogenem Epibrassinolid (BL) reprimiert gleichermaßen das primäre Wurzelwachstum. Nur die Mutante *bzr1-1D* zeigt wie erwartet eine verringerte Hemmung des primären Wurzelwachstums durch exogenes BL. Daraus kann geschlossen werden, dass das BR-regulierte Wurzelwachstum von *GFP-PiAVR2* nicht beeinflusst wird. Allerdings weisen die längeren Wurzeln der Überexpressionsmutanten auf eine mögliche hormonelle Missregulation hin.

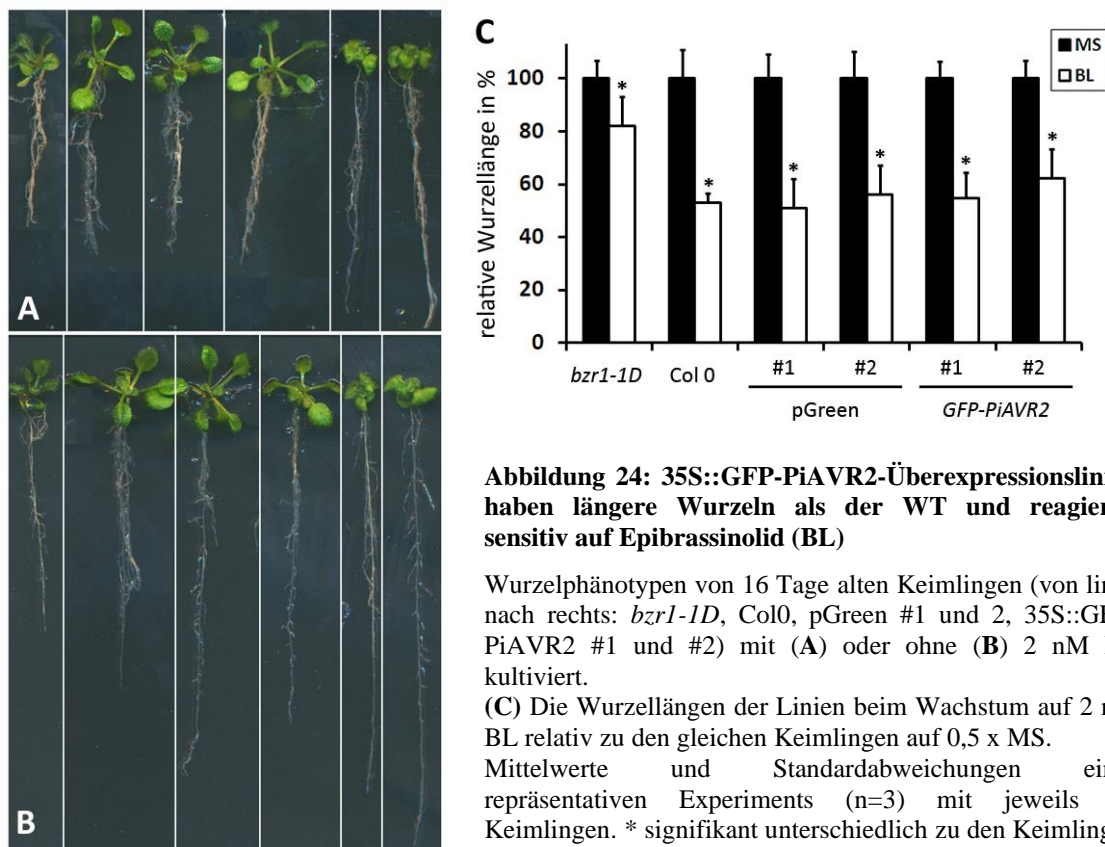


Abbildung 24: 35S::GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien haben längere Wurzeln als der WT und reagieren sensitiv auf Epibrassinolid (BL)

Wurzelphänotypen von 16 Tage alten Keimlingen (von links nach rechts: *bzr1-1D*, Col0, pGreen #1 und 2, 35S::GFP-PiAVR2 #1 und #2) mit (A) oder ohne (B) 2 nM BL kultiviert.

(C) Die Wurzellängen der Linien beim Wachstum auf 2 nM BL relativ zu den gleichen Keimlingen auf 0,5 x MS.

Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments (n=3) mit jeweils 25 Keimlingen. * signifikant unterschiedlich zu den Keimlingen der gleichen Linien auf MS (p<0,01)

3.7.5.3 Die Überexpression von PiAVR2 beeinflusst nicht das BR-regulierte Hypokotylwachstum

Beim Auskeimen in Dunkelheit bildet Wildtyp *Arabidopsis* etiolierte Keimlinge. Bei diesem als Skotomorphogenese genannten Prozess bilden Keimlinge lange, dünne Hypokotyle; die Kotyledonen bleiben als Apikalhaken zusammen und es wird kein Chlorophyll gebildet. Brassinosteroid-defiziente Mutanten zeigen typische Symptome einer Photomorphogenese im Dunkeln, wie kurze verdickte Hypokotyle und geöffnete Kotyledonen (*Chory und Susek, 1994*). Brassinazol (BRZ) hemmt die Brassinosteroidsynthese durch die Inhibition der Cytochrom P450-Steroid -C22-Hydroxylase, welche durch DWF4 kodiert wird (*Asami et al., 2001*). Es bewirkt dadurch bei dunkelkeimenden Wildtyp-Pflanzen eine De-Etiolierung, wie sie für Brassinosteroid-defiziente Mutanten typisch ist (*Asami et al., 2000*). Mutationen, welche die Weiterleitung des BR-Signals verstärken, wie *bzr1-1D* (*Wang et al., 2002*), sind dagegen weniger empfindlich auf BRZ und haben einen etiolierten Phänotyp.

Das Verhalten der GFP-PiAVR2-Überexpressionlinien wurde bei Dunkelkeimung untersucht. Es wurden WT, zwei pGreen-Kontrolllinien und zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und BRASSINAZOLE-INSENSITIVE1 *bzr1-1D* (Wang et al., 2002) sieben Tage kontinuierlich im Dunkeln angezogen. Die *GFP-PiAVR2*-Keimlinge zeigten eine leichte De-Etiolierung (s. Abbildung 25). Die Hypokotyle der Überexpressionlinien waren signifikant kürzer als der WT. In Anwesenheit von BRZ wurde der Effekt noch deutlicher. Während die Mutante *bzr1-1D* wie erwartet kaum auf BRZ reagierte, zeigten die Kontrollpflanzen (Col-0 und pGreen) eine vierfache Verkürzung der Hypokotyle und die *GFP-PiAVR2*-Linien sogar eine siebenfache Verkürzung. Die Expression von GFP-PiAVR2 löste also in dunkelgekeimten Pflanzen einen milden brassinosteroid-defizienten Phänotyp aus, der durch Zugabe von BRZ noch verstärkt werden konnte. Dies spricht für einen negativen regulatorischen Effekt von PiAVR2 auf den BR-Signalweg.

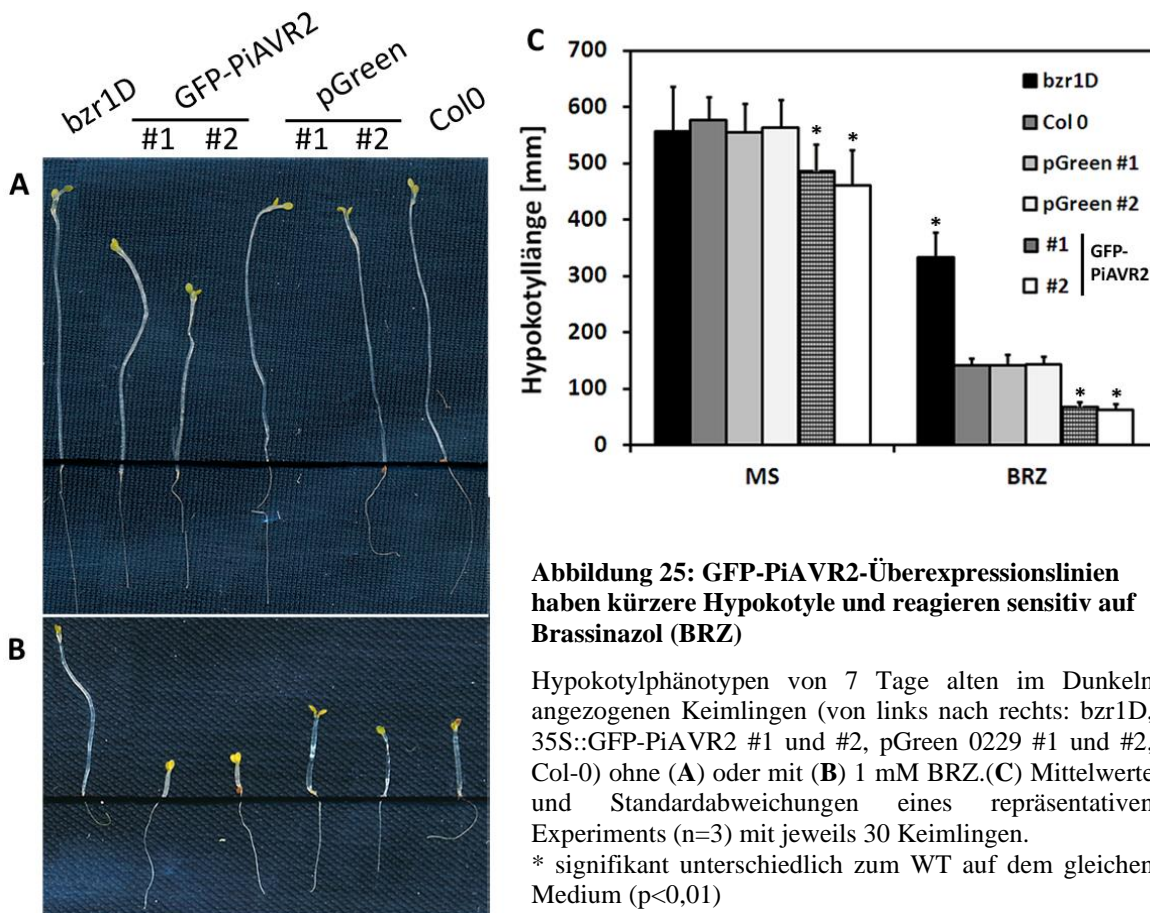


Abbildung 25: GFP-PiAVR2-Überexpressionlinien haben kürzere Hypokotyle und reagieren sensitiv auf Brassinazol (BRZ)

Hypokotylphänotypen von 7 Tage alten im Dunkeln angezogenen Keimlingen (von links nach rechts: *bzr1D*, 35S::GFP-PiAVR2 #1 und #2, pGreen 0229 #1 und #2, Col-0) ohne (A) oder mit (B) 1 mM BRZ. (C) Mittelwerte und Standardabweichungen eines repräsentativen Experiments (n=3) mit jeweils 30 Keimlingen.

* signifikant unterschiedlich zum WT auf dem gleichen Medium (p<0,01)

3.7.6 Untersuchung des PiAVR2-Effektes auf BR-regulierte molekulare Antworten

3.7.6.1 Die Überexpression von GFP-PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die BR-regulierte Aktivierung von BZR2

Eine Expression von GFP-PiAVR2 führte in Protoplasten zu einer Aktivierung (Dephosphorylierung) von GFP-BZR2, unabhängig von der Präsenz von BR (s. Kapitel 3.6.1). In *GFP-PiAVR2*-Linien sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Für die Detektion von endogenem BZR2 wurde von Yanhai Yin freundlicherweise BZR2-Antikörper zur Verfügung gestellt. In vier Wochen alten Rosettenblättern konnte kein endogenes BZR2 mittels Immunoblot detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Daher wurden zwei Wochen alte Keimlinge von zwei GFP-PiAVR2-Linien und einer WT-Kontrolle 2 h mit Epibrassinolid (BL) oder Wasser behandelt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine wurde der Phosphorylierungsstatus von BZR2 mittels Immundetektion analysiert. Wie in Abbildung 26 zu sehen, hatte GFP-PiAVR2 entgegen der Erwartung in Pflanzen jedoch keinerlei Einfluss auf die Phosphorylierung von BZR2. In den mit Wasser behandelten PiAVR2-Überexpressionslinien und Col-0 lag ein Großteil der BZR2-Transkriptionsfaktoren in phosphorylierter Form vor. Durch die Behandlung mit BL konnte in allen getesteten Linien fast das gesamte phosphorylierte BZR2 dephosphoryliert werden.

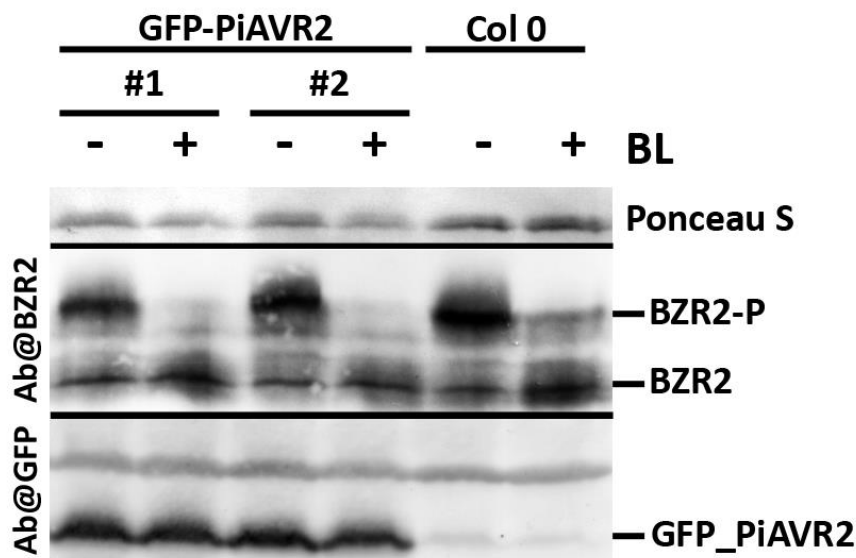


Abbildung 26: Effekt von PiAVR2 auf die Phosphorylierung von BZR2

14 Tage alte Keimlinge von zwei verschiedenen 35S::GFP-PiAVR2-Linien und Col-0 wurden in 0,5x MS mit 1% Saccharose über Nacht äquilibriert, danach mit 10 μ M Epibrassinolid (BL) oder Wasser versetzt und nach 2 Stunden geerntet. Es wurden Proteinextrakte aus jeweils 10 mg Blattpulver mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit BZR2 Antikörpern, welche speziell BZR2 Protein detektieren, analysiert (**Mitte**). Die Expression von GFP-PiAVR2 wurde mit GFP-Antikörpern nachgewiesen (**unten**). Als Ladekontrolle ist die Ponceau-Färbung der Membran nach dem Blot gezeigt.

3.7.6.2 Die Überexpression von GFP-PiAVR2 beeinflusst nicht die BR-regulierte Genexpression

Die Transkriptlevel von *SAUR-AC1* und *SAUR-65* sind in *GFP-PiAVR2*-Linien um das 1,8- bzw. das 1,5-fache reduziert (s. Abbildung 27). Obwohl die Reduktion nicht zweifach ist, so wurde sie jedoch wiederholt in unabhängigen Experimenten mit verschiedenen Linien (auch mit Dexamethason-induzierbaren Linien-Daten nicht gezeigt) gesehen. Eine Behandlung mit Epi-Brassinolid für 2 Stunden führte gleichermaßen bei den *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien wie beim Wildtyp zu einer sehr schwachen Induktion der *SAUR-AC1*- und *SAUR-65*-Expression (Daten nicht gezeigt). Damit zeigt sich in zwei Wochen alten Keimlingen der *PiAVR2*-Überexpressionslinien kein Einfluss von *PiAVR2* auf die BR-regulierte Geneexpression. Aufgrund der schwachen Ausprägung der Suppression der *SAUR*-Gene können drei mögliche Schlüsse gezogen werden: Es handelt es sich um einen zufälligen Effekt oder die Suppression ist so schwach, weil es sich um den Nebeneffekt der Beeinflussung eines anderen Signalweges handelt, oder *PiAVR2* reguliert *BSL1*, *BSL2* und *BSL3* negativ, jedoch wird *BSU1* nicht beeinflusst und daher wird der Effekt fast vollständig ausgeglichen.

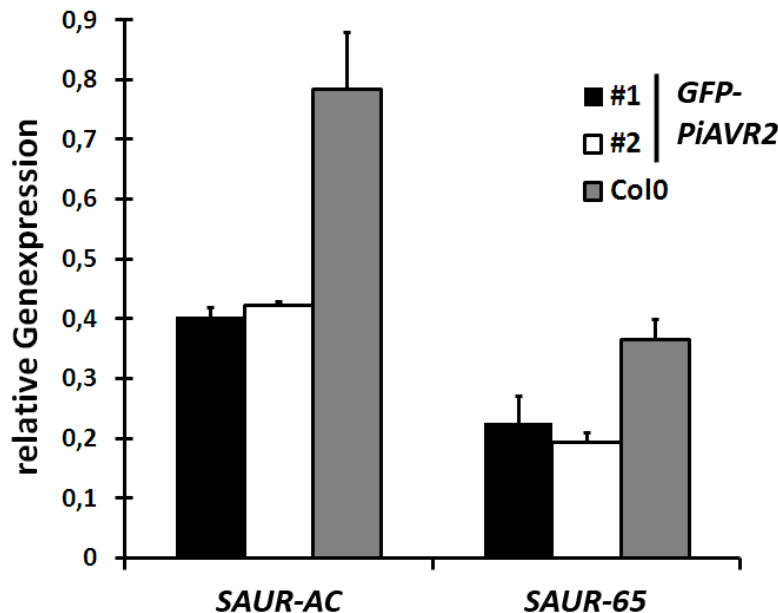


Abbildung 27:
Expression der *SAUR*-Gene

Die Genexpression wurde in 14 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen (Dauerlicht) mit RT-qPCR-spezifischen Primern für die entsprechenden Gene untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von 10 bis 15 Keimlingen. *SAUR-AC* = At4g38850
SAUR-65 = At1g29460

Neben den *SAUR*-Genen, deren Transkription durch BR induziert wird, gibt es auch noch die BR-Synthesegene, deren Expression mittels negativer Feedback-Regulation reprimiert wird. Diese Repression ist die Folge der Bindung von aktivem, dephosphoryliertem *BZR1* an die Promotoren von *CPD*, *DWF4*, *ROT3* und *BR6OX* (Goda et al., 2002; He et al., 2005). Die Bestimmung der Transkriptmenge von BR-Synthesegenen sollte hier einen Hinweis liefern, ob *GFP-PiAVR2* womöglich die *BZR1*-regulierte Genexpression beeinflusst. Daher wurde das Transkriptlevel von *CPD* und *DWF4* in *GFP-PiAVR2* und WT-Keimlingen mit und ohne BL-Behandlung bestimmt. Abbildung 28 zeigt, dass im Vergleich mit Col-0 Keimlingen die Expression von *GFP-PiAVR2* keinen Effekt auf das *CDP*- und *DWF4*-Transkript hatte. Die Behandlung mit BL führte bei allen Keimlingen gleichermaßen zu einer schwachen Abnahme der Expression der BR-Synthesegene. Da die negative Rückkopplungsregulation der BR-

Ergebnisse

Synthesegene immer noch funktional ist, kann daraus abgeleitet werden, dass die Expression von GFP-PiAVR2 wahrscheinlich keinen Einfluss auf die Aktivierung von BZR1 hat.

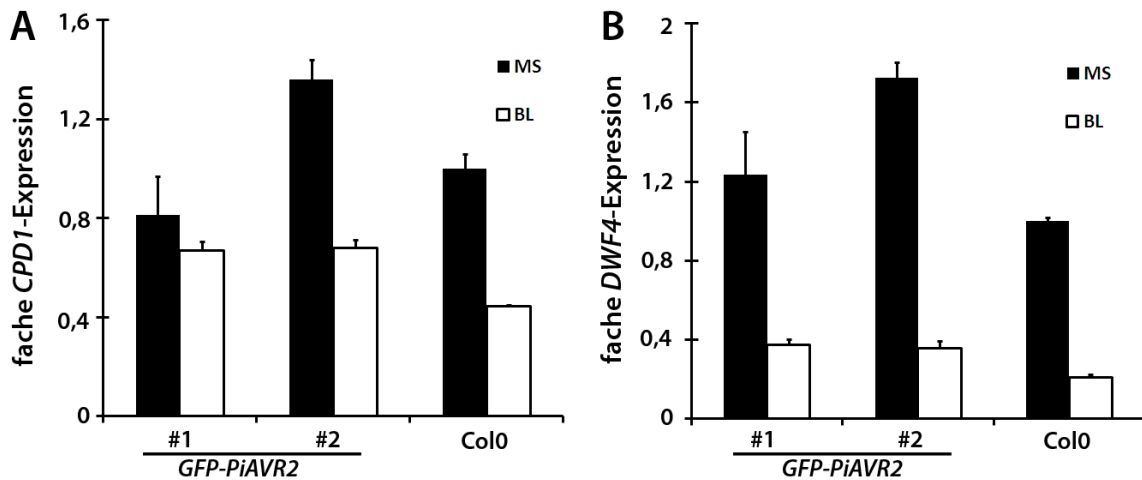


Abbildung 28: Transkriptlevel der BR-Synthesegene CPD1 und DWF4

Die Genexpression wurde in 14 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen (Dauerlicht) mit RT-qPCR-spezifischen Primern für die entsprechenden BR-Synthesegene untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung, *CPD1*- und *DWF4*-Genexpression des WT (MS) wurden jeweils auf eins gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von 10 bis 15 Keimlingen. **A:** *CPD1* = At5g05690 **B:** *DWF4* = At3g50660

Zusammenfassend konnte auf molekularer Ebene kein erkennbarer Einfluss von PiAVR2 auf die BR-abhängige Aktivierung von BZR2 (und wahrscheinlich BZR1) gezeigt werden. Es stellt sich die Frage, ob die Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs den bisher bekannten, klassischen BR-Signalweg beeinflusst. Da durch die Überexpression von GFP-PiAVR2 die Expression der SAUR-Gene reprimiert wird, könnte auch ein anderer Signalweg, wie z.B. der Auxin-Signalweg, beeinflusst werden.

3.8 Untersuchung des PiAVR2 Effektes auf Pflanzenhormone

3.8.1 GFP-PiAVR2-Linien zeigen keinen veränderten Sterolgehalt

Es sollte geklärt werden, ob die Expression von PiAVR2 die Hormonbalance beeinflusst. Der Steroidbiosyntheseweg führt zur Bildung von Brassinosteroid, aber auch von Sterolen. Die Gattung *Phytophthora* zeichnet sich innerhalb der Oomyceten durch eine Sterolauxotrophie aus. Das heißt, *Phytophthora* benötigt aus einer exogene Quelle β -Hydroxy-Sterole für die Sporulation (Erwin und Ribeiro, 1996). Daher sollte untersucht werden, ob der Effektor PiAVR2 die Sterolsynthese und/oder die Akkumulation der Sterole beeinflusst, um die Sterolgewinnung aus seinem Wirt zu optimieren. In Zusammenarbeit mit Vera Wewer (IMBIO, Bonn) wurden Messungen des Sterolgehalts in Keimlingen der *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien und der pGreen_0229 Kontrollpflanzen durch-geführt. Abbildung 29 zeigt, dass alle Linien einen ähnlichen Gehalt der freien Sterole und der Sterolester haben.

Die Menge von Campesterol, dem Vorläufer der Brassinosteroide (*Fujioka et al., 2002*), und andere häufig in Pflanzen vorkommende Sterole, wie Stigmasterol, Sitosterol und Cholesterol, unterschieden sich nicht in PiAVR2 von Kontrollpflanzen. Aufgrund der gemessenen Werte kann kein Einfluss von PiAVR2 auf die BR-Biosynthese sowie auf die Sterol-Biosynthese und -Akkumulation in *Arabidopsis*-Keimlingen festgestellt werden.

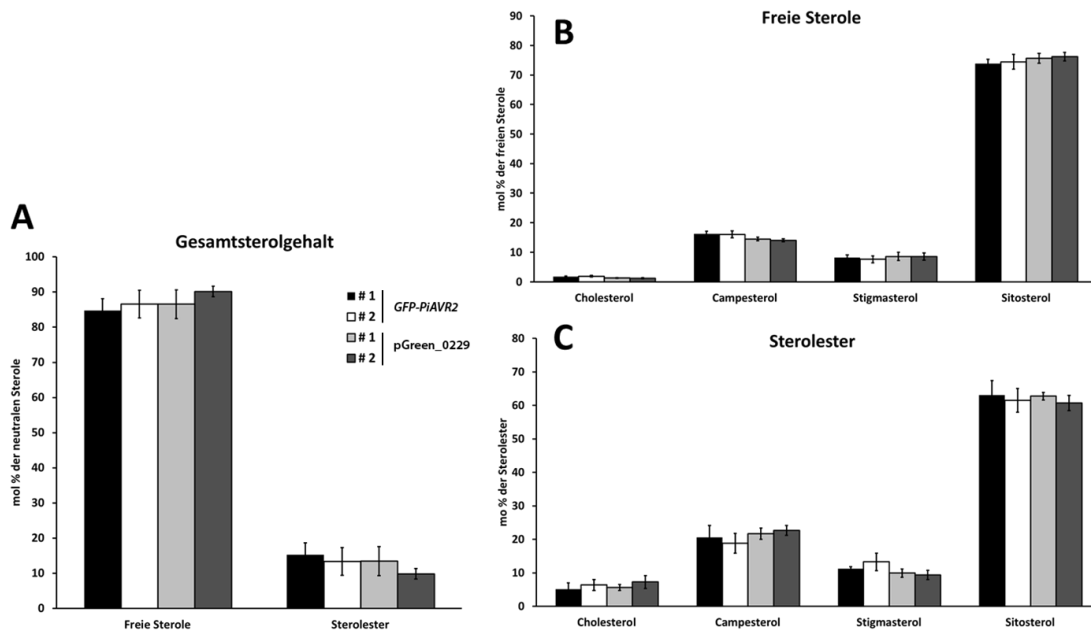


Abbildung 29: Die Überexpression von GFP-PiAVR2 beeinflusst nicht den Sterolgehalt

Sterolkomposition aus 14 Tage alten *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. In zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und zwei pGreen0229-Kontrolllinien wurde der (A) gesamte Sterolgehalt sowie die Sterolkompositionen von den (B) freien Sterolen und den (C) Sterolestern bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Replikaten.

3.8.2 In *GFP-PiAVR2*-Linien haben Abwehrhormone ein erhöhtes Basal-niveau

PiAVR2 hat keinen Einfluss auf den Sterolgehalt. Daher sollte im Weiteren geklärt werden, ob der Gehalt anderer Pflanzenhormone, wie Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), Indol-3-Essigsäure (IAA) oder Abszinsäure (ABA), durch PiAVR2 beeinflusst wird. Dazu wurden je zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und zwei Kontrolllinien nach zwei und fünf Wochen geerntet und mittels GC-MS die Menge an freien und hydrolysierten Hormonen analysiert. Abbildung 30 zeigt für die 14 Tage alten *GFP-PiAVR2*-Pflanzen ein 16-fach erhöhtes Level an Salicylsäure. In den fünf Wochen alten Pflanzen liegt der Salicylsäuregehalt konstant bei rund 15 ng/g Frischgewicht und wird von der *GFP-PiAVR2*-Expression nicht beeinflusst. Ähnliche Effekte konnten auch auf den Jasmonsäuregehalt und auf den Indol-3-Essigsäuregehalt beobachtet werden. Der Indol-3-Essigsäure-Gehalt war in *GFP-PiAVR2*-Keimlingen zweifach erhöht im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (s. Abbildung 38 B). In erwachsenen Pflanzen war dieser Effekt nicht mehr sichtbar, dort war der IAA-Gehalt konstant bei rund 12 ng/g Frischgewicht. Ein besonders starker Effekt konnte auf den Jasmonsäuregehalt beobachtet werden.

Ergebnisse

In *GFP-PiAVR2*-Pflanzen war der Jasmonsäuregehalt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen 1,7-fach und in Keimlingen sogar neunfach erhöht (s. Abbildung 38 A). Der Abszinsäuregehalt war in *GFP-PiAVR2*-Pflanzen und Kontrolllinien vergleichbar in beiden getesteten Entwicklungsstadien.

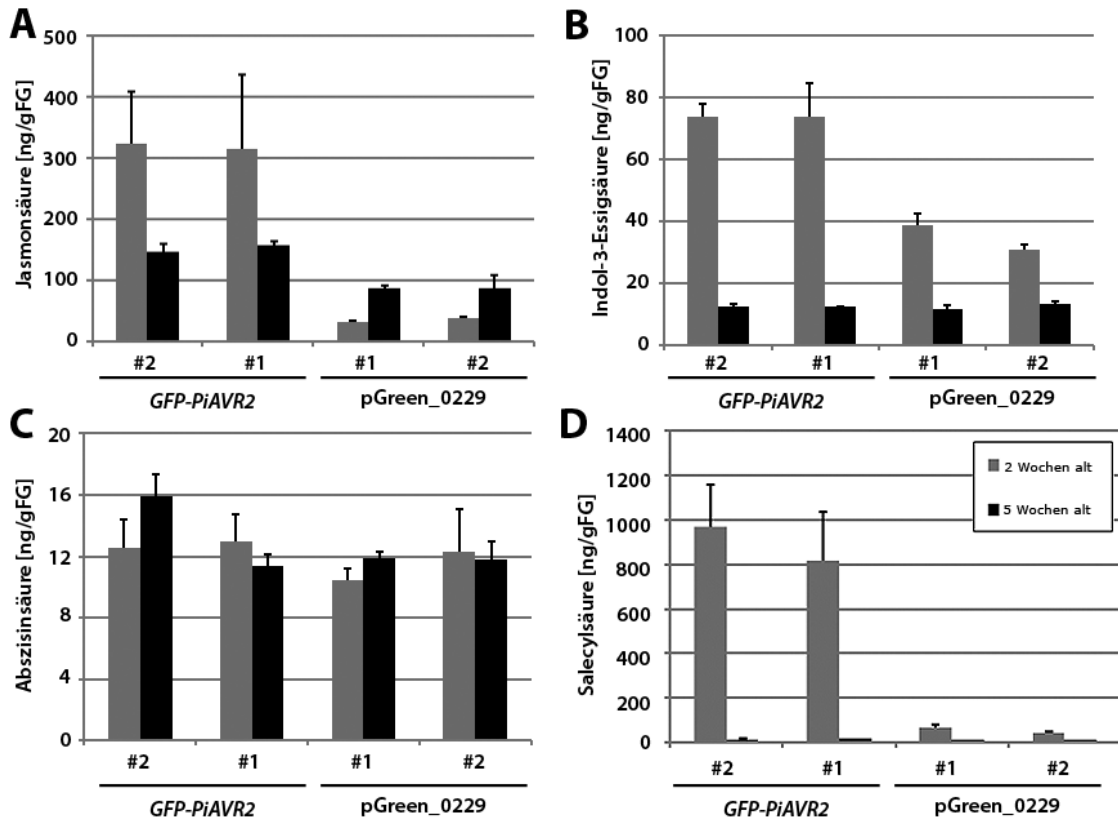


Abbildung 30: Hormonlevel in *GFP-PiAVR2*-Linien und Kontrollpflanzen

Bestimmung verschiedener Hormongehalte (freie Analyte) mittels GC-MS. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von je drei unabhängigen Replikaten mit jeweils 5 bis 10 Pflanzen. FG = Frischgewicht

3.9 Einfluss von PiAVR2 auf PAMP-induzierte Immunantworten

Die häufigste Funktion von Effektoren, insbesondere von bakteriellen Effektoren, ist die Unterdrückung der PAMP-getriggerten Immunität (PTI). Brassinosteroid ist seit einiger Zeit als positiver Regulator der pflanzlichen Immunität, unter anderem auch gegen *P. infestans*, bekannt. Da PiAVR2 mit den positiven Regulatoren des BR-Signalweges BSL1, BSL2 und BSL3 interagiert und diese möglicherweise negativ beeinflusst, sollte im Folgenden untersucht werden, ob PiAVR2 die Weiterleitung von PAMP-induzierten Signalwegen unterdrücken kann.

Neueste Untersuchungen von *Wan et al. (2019)* zeigten eine unerwartet unterschiedliche Regulierung zweier Pattern Recognition Rezeptor (PRR) Familien. Beim Vergleich von Leucine-Rich Repeat Rezeptor Kinasen (LRR-RKs) und die LRR Rezeptor Proteine (LRR-RPs) wurden quantitative Unterschiede der frühen Immunantworten in Zeit und Amplitude festgestellt. Dabei waren die Reaktionen der RP-vermittelten Antworten zumeist langsamer und langanhaltender als die RK-vermittelten Antworten.

Zum Zeitpunkt der Laborarbeiten war dies noch nicht bekannt. Zu dieser Zeit war die anerkannte Lehrmeinung, dass die Signalwege der PAMP-getriggerten Immunität (PTI) früh konvergieren und die PTI-Antworten stark konserviert sind (*Asai et al., 2002*), wodurch die meisten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs) dieselben Reaktionen auslösen. Daher wurden die folgenden Untersuchungen mit dem flg22-Peptid des bakteriellen PAMPs Flagellin durchgeführt.

3.9.1 PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die PAMP-induzierte MAP-Kinase Aktivierung

Die Erkennung des Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP) flg22 durch den Flaggelin-Rezeptor 2 (*FLS2*) induziert eine PAMP-getriggerte Signalkaskade. Dabei werden die kanonischen Mitogen-aktivierten Kinasen (MPKs) sequentiell aktiviert. Dies führt zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus der WRKY-Familie, wodurch die Expression von zeitigen PAMP-induzierten Genen initiiert wird.

Um den Einfluss von PiAVR2 auf die PTI zu untersuchen, wurde zuerst untersucht, ob PiAVR2 die Aktivierung der MPK3, MPK6 und MPK4 inhibiert. Dazu wurden Protoplasten mit PiAVR2 oder GFP-PiAVR2 transformiert und sechs Stunden später mit flg22 eliziert. Die posttranslationale Aktivierung der MPK3, MPK6 und MPK4 wurde mittels Immundetektion mit Antikörpern untersucht, welche spezifisch die aktivierte Form dieser MPKs detektieren. Nur der bakterielle Effektor *AvrPto*, der hier zur Kontrolle in Protoplasten transformiert wurde, inhibiert die posttranslationale Aktivierung der MPKs nach flg22-Behandlung (s. Abbildung 31). Die Expression von PiAVR2 hingegen zeigte in Propoplasten keinen Einfluss auf die Aktivierung der MPKs.

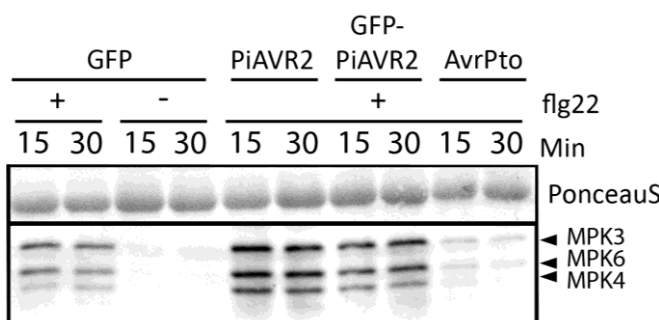


Abbildung 31: Die Expression von PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die posttranslationale Aktivierung der MPKs

Mesophyll-Protoplasten wurden 6 h nach der Transformation mit 0,5 μ M flg22 oder Wasser versetzt und je Zeitpunkt 100 μ l Protoplasten geerntet. Proteinextrakte aus je 10000 Protoplasten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Immunoblot mit phospho-p44/p42 Antikörpern, welche spezifisch für die aktivierte MPK3, 6 und 4 sind, detektiert. Die Färbung der Membran mit Ponceaus S ist als Ladekontrolle gezeigt.

Der Einfluss von PiAVR2 auf die MAP-Kinasen Aktivierung wurde *in vivo* mit den konstitutiv exprimierenden und den Dexamethason-induzierbaren GFP-PiAVR2-Linien untersucht. Keimlinge von GFP-PiAVR2-Linien und pGreen-Kontrolllinien wurden in Flüssigkultur mit flg22-Peptid oder mit Wasser behandelt. Das bakterielle PAMP flg22 löste in allen Keimlingen eine schnelle und transiente Aktivierung der MPK3, MPK6 und MPK4 aus (s.

Ergebnisse

Abbildung 32). Die Expression von GFP-PiAVR2 hatte also in Keimlingen keinen Einfluss diese zeitige PAMP-getriggerte Immunität (PTI) Antwort.

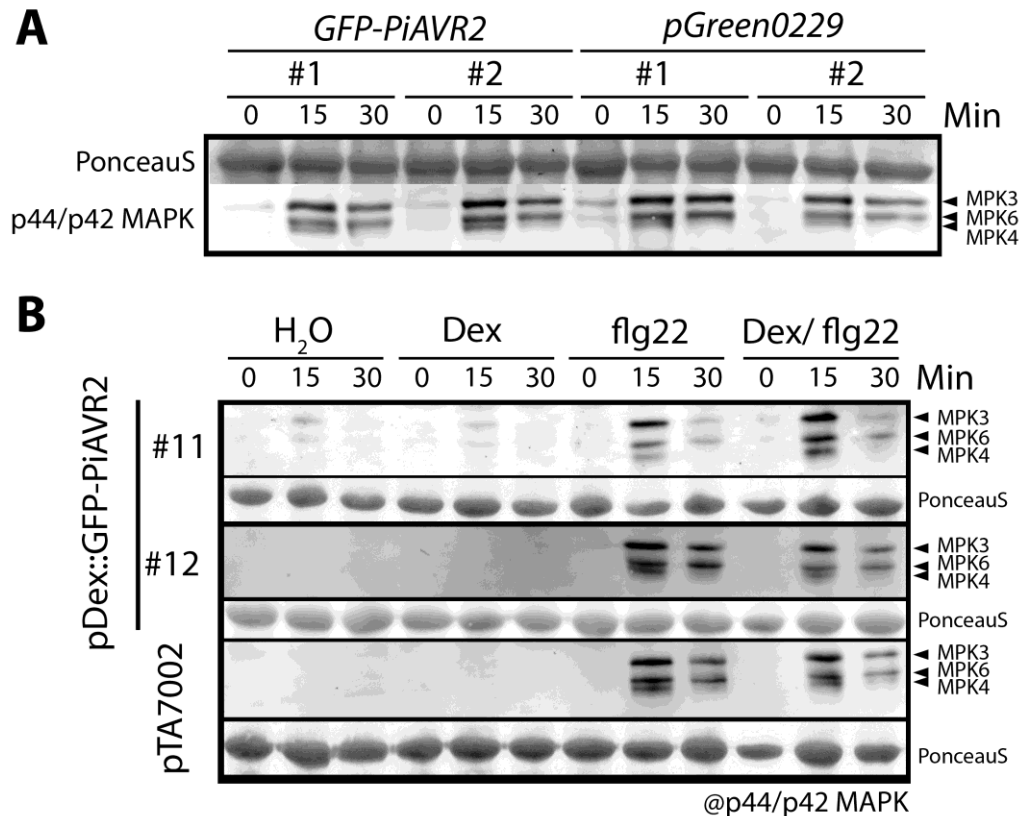


Abbildung 32: GFP-PiAVR2-Linien zeigen keine veränderte posttranslationale Aktivierung der MPKs

(A) Drei bis vier Keimlinge (14 d alt) der jeweiligen Überexpressions-Linien wurden in 0,5 x MS mit 1,5% Saccharose (B24 h äquilibriert und dann mit 10 μ M flg22 oder Wasser induziert. (B) Vier Wochen alte Dex-induzierbare Pflanzen wurden mit 20 μ M Dexamethason oder Wasser gesprüht und 24 h später mit 1 μ M flg22 oder Wasser infiltriert. Je Zeitpunkt wurden drei Replikate geerntet und das Experiment dreimal unabhängig wiederholt. Es wurden 15 μ g Blattprotein mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Immundetektion wurde mit Phospho-p44/p42-MPK Antikörpern, welche speziell die aktivierten MPKs erkennt, nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.9.2 PiAVR2 hat keinen Einfluss auf früh induzierte PAMP-Markergene

Des Weiteren wurde untersucht, ob PiAVR-Expression einen Einfluss auf die Induktion der Genexpression der *Flagellin-Responsive Kinase 1 (FRK1)* hat. Die Aktivierung des *FRK1* Promotors wurde mit einem *pFRK1::Luciferase* Assay untersucht. Dabei wird neben dem zu untersuchenden Effektor ein *pFRK1::Luciferase* und ein *pUbi::GUS* Konstrukt in Mesophyll-Protoplasten transformiert. Durch die Elizitierung mit flg22 wird ein Fremderkennungssignalkaskade aktiviert, die final den *pFRK1* Promotor aktiviert. Durch die Aktivität des Reporterproteins Luciferase kann die Induktion des *pFRK1* Promotors *in vivo* gemessen werden. Mittels Messung der GUS-Expression wurde die Überlebensrate der Protoplasten nach 6 h (mit und ohne flg22) bestimmt und mit der Luciferase-Aktivität verrechnet (s. Kapitel 2.7.3). In Abbildung 33: Die Expression von PiAVR2 in Protoplasten hat keinen Einfluss auf die Induktion des *FRK1*-Promotors nach flg22-Behandlung ist die

normalisierte Aktivität von *pFRK1* 6 h nach *flg22*-Behandlung dargestellt. Die Expression von *PiAVR2* supprimiert nicht die Induktion des *pFRK1*-Promotors.

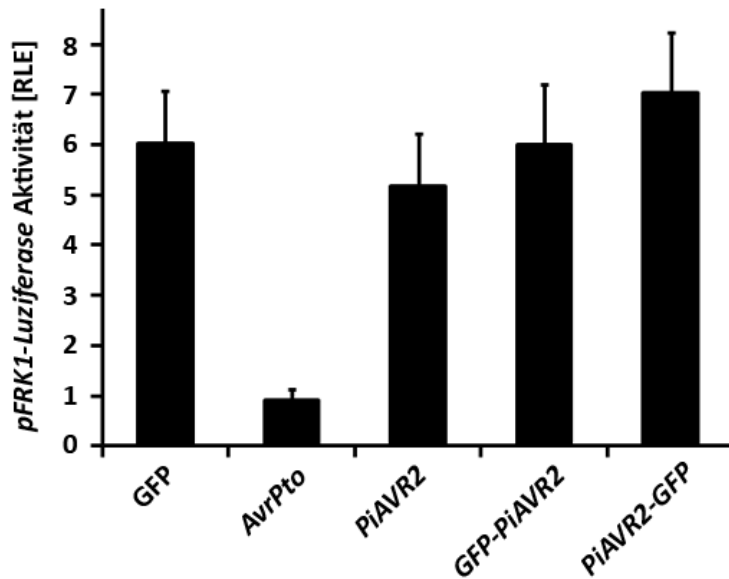


Abbildung 33: Die Expression von *PiAVR2* in Protoplasten hat keinen Einfluss auf die Induktion des *FRK1*-Promotors nach *flg22*-Behandlung

Die *pFRK1::Luciferase* Aktivität 6 h nach Induktion mit *flg22* bzw. Wasser wurde mit der GUS-Aktivität normalisiert (s. Kapitel 2.7.3). Negativkontrolle = GFP; Positivkontrolle = AvrPto; RLE: relative Lichteinheiten. Grafik zeigt Standardabweichungen und Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Es wurde weiterhin untersucht, ob *GFP-PiAVR2*-Linien eine veränderte Induktion der frühen PAMP-induzierten Gene zeigen.

Zur Analyse wurden die frühen PAMP-regulierten Gene *FLG22-INDUCED-RECEPTOR-LIKE-KINASE 1 (FRK1)* und *WRK17* ausgesucht. Die Infiltration von *flg22* in *A. thaliana* Rosettenblätter führt nach 4 h zu einer Erhöhung des *FRK1*-Transkripts um fast das Hundertfache (AtGenExpress). Damit ist *FRK1* eines der am stärksten induzierten frühen PAMP-regulierten Gene. Die Expression des Transkriptionsfaktors *WRKY17* ist laut AtGenExpress 1 h nach *flg22*-Infiltration bereits siebenfach hochreguliert.

Das MS-Medium von 14 Tage alten Keimlingen wurden mit *flg22* versetzt und Keimlinge nach 0,1 und 3 h geerntet. Es wurde das Transkriptlevel der beiden Gene mittels qRT-PCR bestimmt. Abbildung 34 zeigt, dass die *flg22*-Behandlung zu über hundertfacher Induktion des *FRK1*-Transkriptes nach 3 h führt. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen getesteten Linien zu sehen. Die Induktion von *WRKY17* ist nach 1 h *flg22*-Behandlung bereits 6-8 fach in den verschiedenen Linien. Auch hier ist kein Unterschied zwischen den *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien und den Kontrollen sichtbar. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse aus Protoplasten (s. Abbildung 31). Auch dort hatte die Expression von *PiAVR2* oder *GFP-PiAVR2* keinen Einfluss auf die frühen Antworten der PTI.

Es kann also geschlossen werden, dass der RXLR-Effektor *PiAVR2* keine der untersuchten frühen PTI-Antworten unterdrückt.

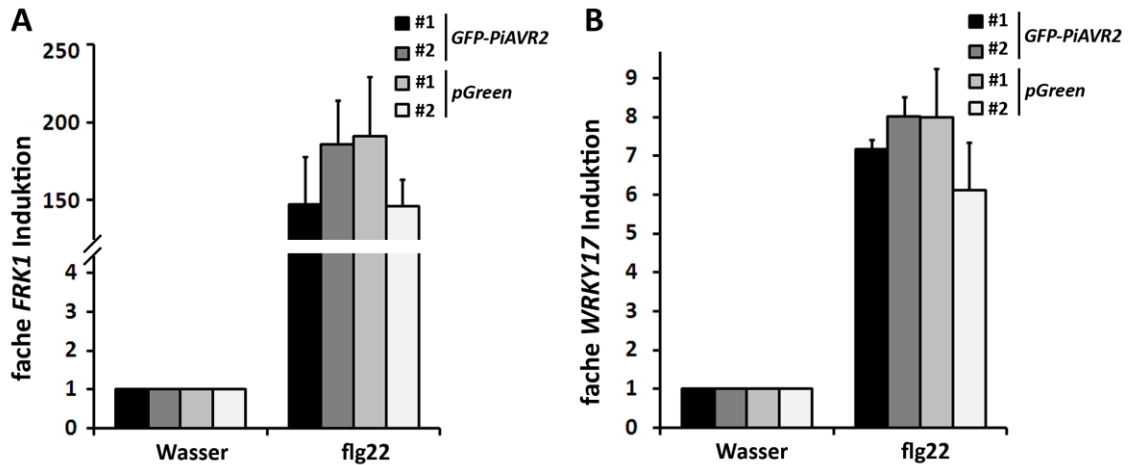


Abbildung 34: Die Induktion der zeitigen PAMP-regulierten Gene ist in *GFP-PiAVR2*-Linien nicht beeinflusst

Die *FRK1* (A) und *WRKY17*-Genexpression (B) wurde in 14 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen (Langtag) 3 h (A) bzw. 1 h (B) nach Behandlung mit 10 μ m flg22 mit RT-qPCR spezifischen Primern untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung. Die entsprechenden Wasserkontrollen wurden auf eins gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von drei unabhängigen Parallelen mit 5 bis 8 Keimlingen. *FRK1*: AT2G19190; *WRKY17*: AT2G24570

3.9.3 PiAVR2 hat keinen Einfluss auf PAMP-induzierte Callose-Bildung

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob GFP-PiAVR2 die PTI zu einem späteren Zeitpunkt (weiter downstream in der Signalkaskade) hemmt. Die Erkennung von Mikroben-assoziierten molekularen Mustern (MAMPs) und PAMPs führt zur Einlagerung von Callose in den Zellwänden, um diese zu verstärken (Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Veit *et al.*, 2001). Die zwei Wochen alten Keimlinge der verschiedenen Linien wurden 24 h nach flg22-Zugabe ins Medium mit Anillinblau gefärbt und unter UV-Licht die Calloseeinlagerungen analysiert. Die Behandlung mit flg22-induzierte in allen getesteten Linien nach 24 h eine Einlagerung von Callose (s. Abbildung 35). GFP-PiAVR2 hat also weder auf die frühen, noch auf die späten Antworten der PTI einen Einfluss.

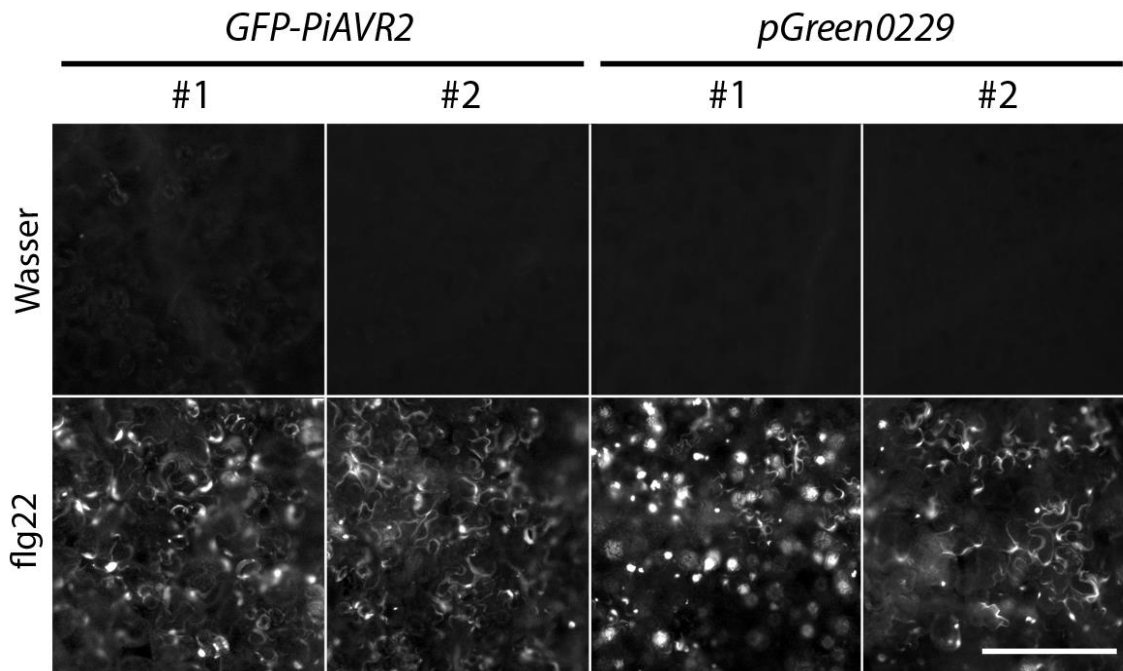


Abbildung 35: Die Expression von GFP-Avr2 hat keinen Einfluss auf die Einlagerung von Callose

GFP-PiAVR2- und Kontrollkeimlinge (14 d alt) wurden in 0,5 x MS mit 1,5% Saccharose 24 h äquilibriert und dann mit 10 μ M flg22 oder Wasser induziert. 24 h später wurden die Blätter mit Anillinblau gefärbt und die Callose-Einlagerungen unter UV-Licht sichtbar gemacht. Das Experiment wurde dreimal unabhängig wiederholt. Größenbalken = 500 μ m

3.10 *GFP-PiAVR2*-Linien haben eine erhöhte Basalexpression von PR-Genen

Eine typische Reaktion der PTI ist die Induktion der PR- (*pathogenesis related*) Genexpression. PR-Gene kodieren für Enzyme, z.B. Glukanasen, Chitinasen und Proteasen, die Pathogene während der Infektion beeinträchtigen können (*Uknes et al., 1992*).

Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob *PiAVR2*-Expression einen Einfluss auf die PR-Genexpression hat. Dafür wurden *GFP-PiAVR2*-Überexpressionspflanzen und WT zwei Wochen im Dauerlicht kultiviert und mittels qRT-PCR die basale Genexpression von *PR1*, *PR2* und *PR5* in diesen Linien bestimmt. Abbildung 36 zeigt, dass die *GFP-PiAVR2*-exprimierenden Linien ein deutlich erhöhtes Transkriptlevel der *PR*-Gene aufweisen. Das deutet auf eine induzierte Abwehr oder eine Stressreaktion in diesen Linien hin.

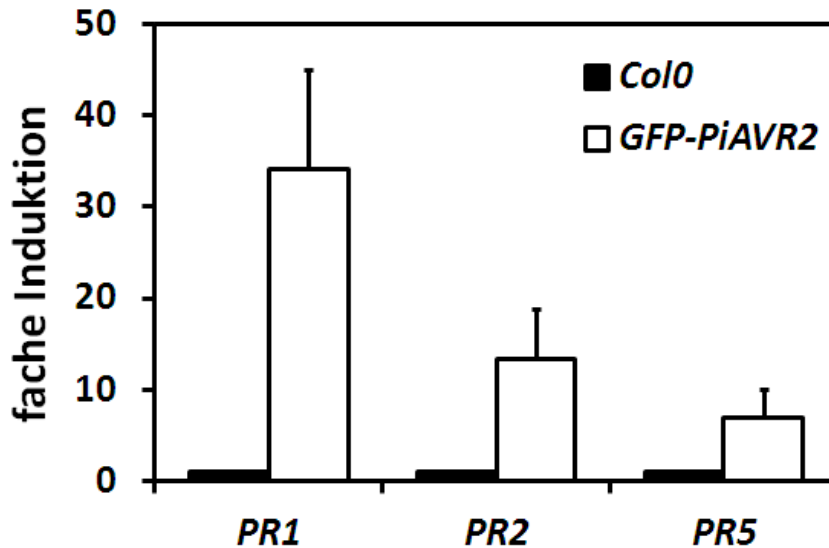


Abbildung 36: Basale Genexpression von PR1, PR2 und PR5

Die Genexpression wurde in 14 Tage alten *A. thaliana* Keimlingen (Dauerlicht) mit RT-qPCR-spezifischen Primern für die entsprechenden Gene untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung. Die Genexpression des WT wurde jeweils auf eins gesetzt. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von 10 bis 15 Keimlingen. PR1 = AT2G14610; PR2 = AT3G57260; PR5 = AT1G75040

In einem weiteren Experiment sollte nun geprüft werden, ob die erhöhte Basalexpression der PR-Gene in den *GFP-PiAVR2*-Linien einen Einfluss auf die PAMP-induzierte Genexpression dieser Abwehrgene hat. Dafür wurden zwei *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien und zwei Kontrolllinien zwei Wochen auf 0,5 x MS-Agar im Dauerlicht kultiviert. Die Keimlinge wurden in Flüssigkulturen umgesetzt und mit 1 μ M flg22 oder Wasser versetzt. Nach 24 h wurde mittels qRT-PCR die Genexpression von PR1, PR2 und PR5 in diesen Linien bestimmt. Abbildung 37 zeigt, dass in allen Linien die Behandlung der Wurzeln mit flg22 zu einer Induktion der PR-Genexpression führt. GFP-PiAVR2-Linien haben folglich eine erhöhte Basalexpression der PR-Gene, jedoch beeinflusst PiAVR2 nicht die Induzierbarkeit dieser Abwehrgene.

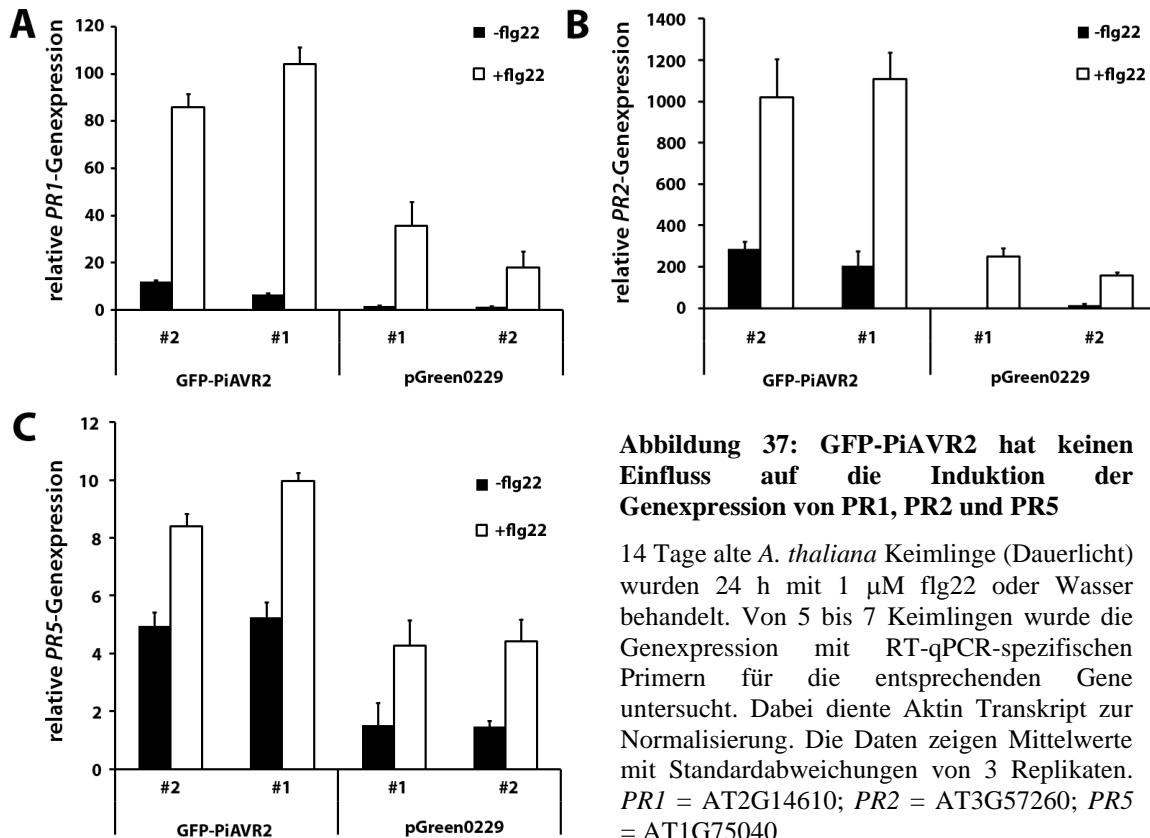


Abbildung 37: GFP-PiAVR2 hat keinen Einfluss auf die Induktion der Genexpression von PR1, PR2 und PR5

14 Tage alte *A. thaliana* Keimlinge (Dauerlicht) wurden 24 h mit 1 μ M flg22 oder Wasser behandelt. Von 5 bis 7 Keimlingen wurde die Genexpression mit RT-qPCR-spezifischen Primern für die entsprechenden Gene untersucht. Dabei diente Aktin Transkript zur Normalisierung. Die Daten zeigen Mittelwerte mit Standardabweichungen von 3 Replikaten. PR1 = AT2G14610; PR2 = AT3G57260; PR5 = AT1G75040

Ein typischer Abwehrmechanismus von Pflanzen in der PAMP-getriggerten Immunität ist die Produktion von Phytoalexinen. Phytoalexine ist ein Sammelbegriff für Sekundärmetabolite mit kleinem Molekulargewicht und antimikrobieller Wirkung, die durch Stress induziert werden. Sie gelten als molekulare Marker für Krankheitsresistenz (Hammerschmidt, 1999; Pedras et al., 2011). Camalexin ist das wichtigste Phytoalexin in *Arabidopsis* (Bednarek et al., 2011). Der genaue Wirkmechanismus von Camalexin ist noch nicht geklärt, jedoch scheint dieses Phytoalexin die Zellmembranen von Bakterien und Pilzen zu zerstören (Ahuja et al., 2012). Die Camalexinbiosynthese ist oft, abhängig vom angreifendem Pathogen, mit dem Anstieg der Abwehrhormone Jasmonsäure oder Salicylsäure verbunden (s. Diskussion). Da in den GFP-PiAVR2-Pflanzen der basale Gehalt der Abwehrhormone Salicylsäure, Auxin und Jasmonsäure erhöht war, wurde des Weiteren untersucht, ob in diesen Pflanzen auch der Camalexingehalt verändert ist. Während der Camalexingehalt in allen erwachsenen Pflanzen unter der Nachweisgrenze lag, zeigte sich bei den Keimlingen eine 20-fache Induktion des Camalexins in den Keimlingen der Überexpressionslinien.

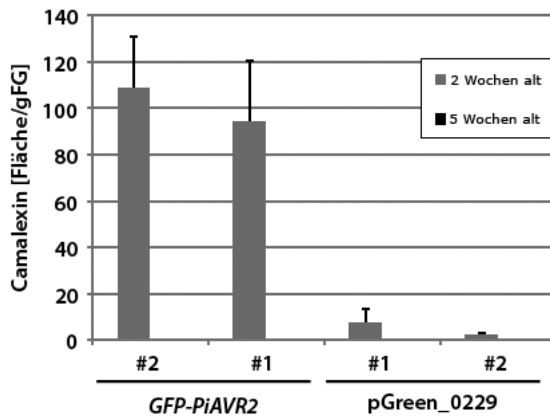


Abbildung 38: GFP-PiAVR2-Pflanzen zeigen einen erhöhten Gehalt des Phytoalexins Camalexin

Bestimmung des Camalexingehaltes (freie Analyte) mittels GC-MS. Die Daten zeigen Mittelwerte und Standardfehler von je drei unabhängigen Replikaten mit jeweils 5 bis 10 Pflanzen. FG = Frischgewicht.

Der erhöhte SA-Gehalt in den 14 Tage alten GFP-PiAVR2-Pflanzen zusammen mit der erhöhten *PR*-Genexpression deutet auf eine SA-abhängige Systemische Resistenz-Reaktion (SAR) durch PiAVR2 hin.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Expression von GFP-PiAVR2 keinen Einfluss auf die Kapazität der Pflanze zur Auslösung von PAMP-induzierten Antworten hat. Jedoch zeigen die Pflanzen eine konstitutive Expression von Abwehrgenen und einen konstant erhöhten Pegel an Abwehrhormonen.

3.11 Die Expression von GFP-PiAVR2 induziert Zelltod

Die Überexpression von GFP-PiAVR2 hat einen starken Entwicklungsphänotyp zur Folge, der stark von der Photoperiode reguliert wird (s. Kap 3.7.3.) Im Laufe der Experimente wurde allerdings noch eine weitere Abhängigkeit von der Photoperiode festgestellt. *GFP-PiAVR2*-Keimlinge, die bei hoher Lichtintensität ($150 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$) angezogen wurden, zeigten einen starken Zelltod der Keimblätter, zum Teil sogar der ersten echten Blätter (s. Abbildung 39). Die Kontrollkeimlinge sowie *GFP-PiAVR2*-Keimlinge, die bei $100\text{-}130 \mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$ wuchsen, zeigten keine Anzeichen eines beginnenden Zelltodes. Der beginnende Zelltod in den Überexpressions-Linien wurde wahrscheinlich von der erhöhten Lichtmenge und dem damit verbundenen Stress ausgelöst.

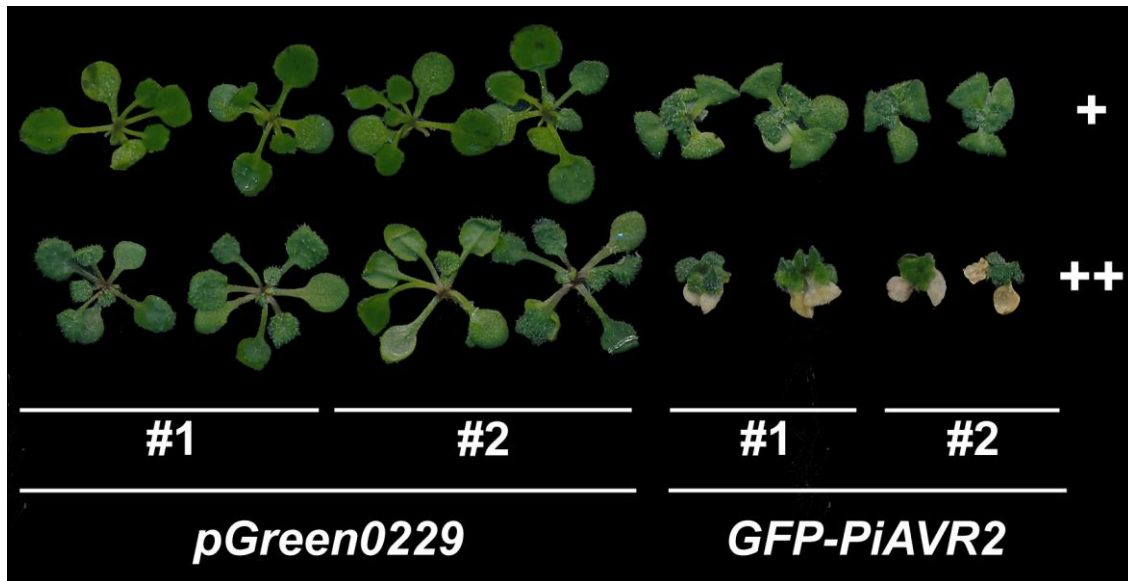


Abbildung 39: Phänotyp von 14 d alten Keimlingen bei verschiedenen Lichtintensitäten

Die Keimlinge der angegebenen Linien wurden 14 d auf 0,5 x MS mit 1 % Saccharose bei kontinuierlicher Beleuchtung mit $100 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (+) oder mit $150 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$ (++) angezogen.

Auch vier Wochen alte Dexamethason-induzierbare *GFP-PiAVR2*-Linien zeigten zehn Tage nach Dexamethason-Behandlung einen Zelltod (Kurztag, Beleuchtung $100 \mu\text{Mol}/\text{m}^2/\text{s}$). Auch hier begann der Zelltod an den Keimblättern und erfasste schrittweise die ältesten echten Blätter. Eine Dexamethason-Behandlung von Col0 (s. Abbildung 40 unten) und den Dexamethason-Kontrolllinien löste jedoch keinen Zelltod aus.



Abbildung 40: Zelltod in Dexamethason-induzierbaren GFP-PiAVR2-Linien

Vier Wochen alte *pDex::GFP-PiAVR2*-Linien und WT wurden mit 20 μM Dexamethason oder Wasser besprüht und zehn Tage später fotografiert. (Lichtintensität: 100 $\mu\text{Mol/m}^2/\text{s}$)

3.12 *GFP-PiAVR2*-Linien sind resistenter gegenüber *H. arabidopsidis*

PiAVR2 wird während der gesamten biotrophen Infektionsphase von *Phytophthora infestans* exprimiert (Gilroy *et al.*, 2011a). Wird die Expression von *PiAVR2* in *P. infestans* mittels RNA Interferenz stark reduziert, so ist nach der Infektion einer suszeptiblen Kartoffelsorte kaum eine Ausbildung von Symptomen zu beobachten (Eleanor Gilroy, persönliche Mitteilung). *PiAVR2* ist also essentiell für die Pathogenität von *Phytophthora infestans*. Daher wurde vermutet, dass die Expression von *PiAVR2* in *Arabidopsis*, die Pflanzen anfälliger für eine Oomyceten-Infektion macht. Um diese Hypothese zu verifizieren, wurde in Kooperation mit Harald Keller (INRA, Sophia Antipolis, Frankreich) eine Infektionsstudie mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* durchgeführt. *H. arabidopsidis* ist ein Oomyzet aus der Familie der *Peronosporales*, die auch als falscher Mehltau bekannt ist (Coates und Beynon, 2010). Dieser obligat biotrophe Oomyzet ist einer der wenigen Pathogene, der *Arabidopsis* in der Natur infiziert. Für die Infektionsstudie wurden sieben Tage alte Keimlinge von drei *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien und zwei Kontrolllinien (WT und *pGreen_0229*) mit einer Sporensuspension besprüht und eine Woche später die Sporenmenge pro mg Blattgewicht bestimmt. Die *GFP-PiAVR2*-Linien waren jedoch nicht sensitiver sondern resistenter gegen *H. arabidopsidis* als die Kontrollpflanzen (s. Abbildung 41). Diese Resistenz ist wahrscheinlich eine Folge der erhöhten Basalexpression von Abwehrgenen und Abwehrhormonen, insbesondere durch den erhöhten Salicylsäuregehalt.

Die Infektionsstudien wurden vorab auch in Dexamethason-induzierbare GFP-PiAVR2-Pflanzen sowie pTA7002-Kontrollpflanzen durchgeführt. Es wurden jedoch Nebeneffekte der Dexamethasonbehandlung beobachtet. Während die Dexamethasonbehandlung WT-Pflanzen sensibler und GFP-PiAVR2-induzierbaren Pflanzen resistenter gegenüber *H. arabidopsidis* machte, waren die Ergebnisse der Kontrollpflanzen unterschiedlich. Einige pTA7002-Pflanzen zeigten eine erhöhte Resistenz, andere hingegen eine erhöhte Suszeptibilität. So waren diese Ergebnisse nicht schlüssig und die Versuche mussten in Überexpressionslinien wiederholt werden. Die Verwendung des Dexamethason-induzierbare GVG-Expressionssystems zeigte bereits in der Vergangenheit unerwünschte Nebeneffekte (Aoyama und Chua, 1997). Oft wurden durch Dexamethasonbehandlung Wachstumsdefekte, aber auch die Induktion von Abwehrgenen, wie PDF1.2 und PR-5, beobachtet (Amirsadeghi et al., 2007; Andersen et al., 2003; Kang et al., 1999). Dexamethason ist ein Steroid und dadurch wahrscheinlich der Auslöser der beobachteten Nebeneffekte.

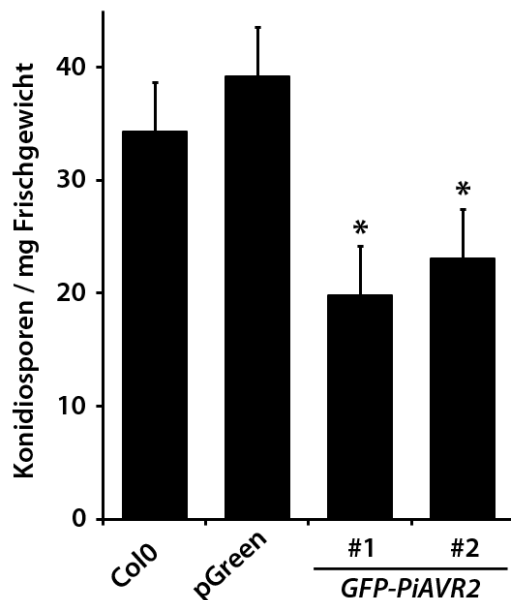


Abbildung 41: GFP-PiAVR2-Linien sind resistenter gegen-über *H. arabidopsidis*

Die verschiedenen Linien wurden im Alter von sieben Tagen mit *Hyaloperonospora arabidopsidis Noco2* infiziert. (s. Kapitel 2.8.1.2). Nach einer Woche wurde die Konidienmenge pro mg Frisch-gewicht bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standard-abweichungen von mindestens 100 Keimlingen.

* signifikant verschieden von den Kontroll-Linien *Col-0* und *pGreen*. $p < 0,01$

3.13 *GFP-PiAVR2*-Linien sind susceptibler gegenüber *P. parasitica*

Die Überexpression von GFP-PiAVR2 führt in *Arabidopsis* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem obligat biotrophen Oomyceten *H. arabidopsidis* (s. Kapitel 3.12). Daher sollte im Folgenden untersucht werden, ob PiAVR2 hemibiotrophen Oomyceten einen Vorteil bei der Kolonisation von *Arabidopsis* verschafft. Da *P. infestans* *Arabidopsis* nicht befällt, wurde stattdessen *Phytophthora parasitica* verwendet. *P. parasitica* ist ein hemibiotropher Oomycet, der im Gegensatz zu *P. infestans* ein sehr breites Wirtsspektrum hat (Erwin und Ribeiro, 1996). Diese Untersuchung wurde freundlicherweise von Agnès Attard (INRA, Sophia-Antipolis, Frankreich), wie in (Attard et al., 2010) beschrieben, durchgeführt.

Um die natürliche Infektionssituation nachzubilden, wurden die ersten *P. parasitica* Infektionsversuche mit den Dexamethason-induzierbaren *GFP-PiAVR2*-Linien durchgeführt. Die Pflanzen wurden sechs Wochen auf MS-Medium angezogen und dann ihre Wurzeln mit einer Sporensuspension von *Phytophthora parasitica* behandelt. Die Induktion der GFP-PiAVR2 Expression durch Dexamethason erhöhte den Befall durch *P. parasitica* im Vergleich zu den unbehandelten (-Dex) Pflanzen. Jedoch zeigten auch die pTA7002 Kontrollpflanzen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *P. parasitica* infolge der Dexamethasonbehandlung (s. Abbildung 42). Die GFP-PiAVR2 Pflanzen wie auch die pTA7002 Pflanzen zeigten jedoch auch ohne Dexamethasonbehandlung eine stärkere Resistenz gegenüber *P. parasitica* als der Wildtyp (Col-0). Durch die Dexamethasonbehandlung zeigten alle Pflanzen eine ähnlich starke Suszeptibilität. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei dem beobachteten Effekt um einen pleiotropen Nebeneffekt des Dexamethasonsystems handelt.

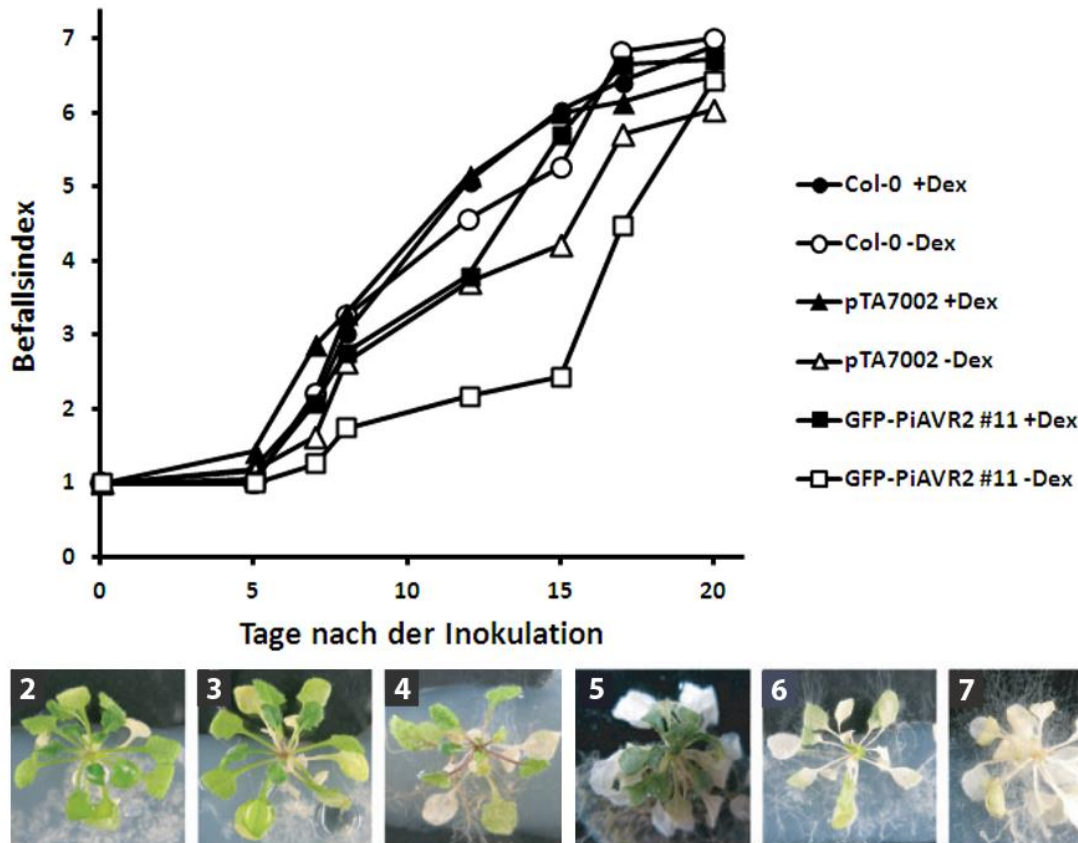


Abbildung 42: Dex-induzierbare GFP-PiAVR2-Pflanzen sind sensitiver auf *P. parasitica*

Sechs Wochen alte pDex::GFP-PiAVR2-Pflanzen sowie je eine Col-0 und pTA7002-Linie wurden mit 20 mM Dexamethason oder Wasser besprüht und 24 h später wurden die Wurzeln mit jeweils 1000 Zoosporen von *Phytophthora parasitica* Stamm 310 inokuliert und der Befallsindex (1-7) über die Zeit bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler von jeweils 18-24 Pflanzen. Der Befallsindex steht für folgende Krankheitssymptome: (1) keine Symptome sichtbar. (2) ein bis zwei Blätter sind befallen. (3) drei bis vier Blätter sind befallen. (4) nur ein bis zwei alte Blätter sind noch gesund. (5) erstes Stadium der Rosette ist komplett befallen und nur die jungen Blätter sind noch gesund. (6) zwei bis drei der jungen Blätter sind noch gesund. (7) Die Pflanze ist tot. Die Fotos sind aus Attard et. al 2010 entnommen.

Daher wurde im Folgenden der *P. parasitica* Infektionsversuch mit den 35S::GFP-PiAVR2-Linien durchgeführt. Als Kontrolle wurden Col-0 Pflanzen und leere pGreen_0229 Pflanzen verwendet. Die zwei GFP-PiAVR2-Linien sind signifikant sensitiver auf *P. parasitica* als Col-0 und pGreen_0229 (Abbildung 43). Die Expression von GFP-PiAVR2 erhöht also die Suszeptibilität der Wirtspflanze gegenüber dem hemibiotrophen Oomyceten.

Ähnlich zu den Mutanten mit einem unkontrollierten Zelltod (runaway cell death = RCD), wie *rin4*, *mpk4*, *mkk1/mkk2*, *mek1* und *bir1-1* (Gao et al., 2009; Ichimura et al., 2006; Mackey et al., 2002; Petersen et al., 2000; Qiu et al., 2008), zeigen auch die GFP-PiAVR2-Pflanzen eine erhöhte Basalexpression von Abwehrgenen, was letztendlich wahrscheinlich auch zum Zelltod führt. Diese erhöhte Anfälligkeit für Zelltodreaktionen ist wahrscheinlich der Grund für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einem hemibiotrophen Oomyceten, insbesondere während des Überganges zur nekrotrophischen Phase.

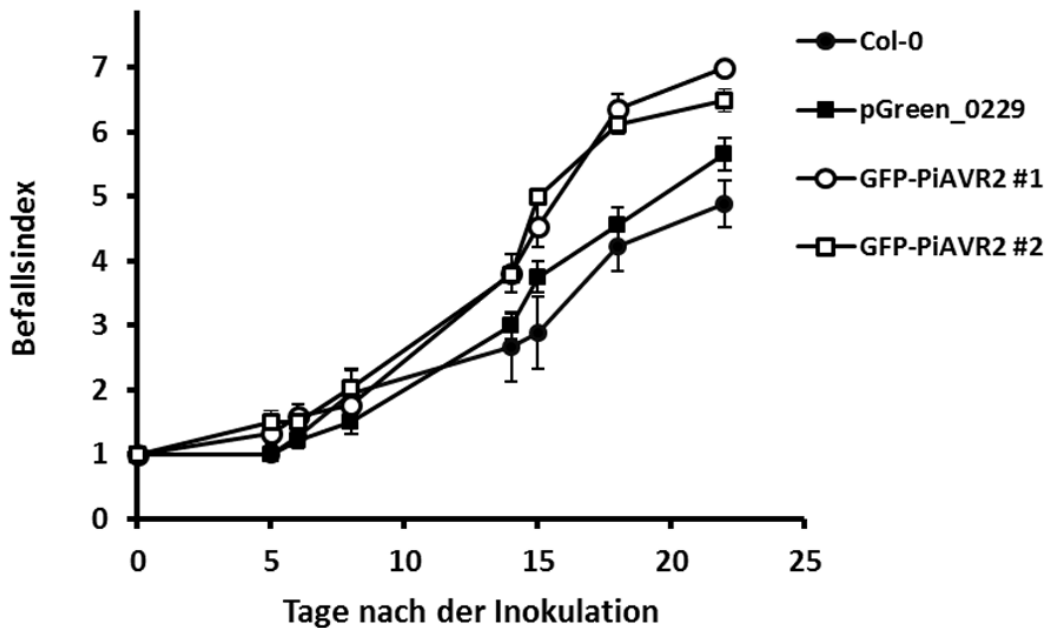


Abbildung 43: GFP-PiAVR2-Pflanzen sind sensitiver auf *P. parasitica*

Die Wurzeln von sechs Wochen alten Mutanten und Kontrollpflanzen wurden mit jeweils 1000 Zoosporen von *Phytophthora parasitica* Stamm 310 inokuliert und der Befallsindex (1-7) über die Zeit bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardfehler von jeweils 18-24 Pflanzen. Der Befallsindex steht für folgende Krankheitssymptome: (1) keine Symptome sichtbar. (2) ein bis zwei Blätter sind befallen. (3) drei bis vier Blätter sind befallen. (4) nur ein bis zwei alte Blätter sind noch gesund. (5) erstes Stadium der Rosette ist komplett befallen und nur die jungen Blätter sind noch gesund. (6) zwei bis drei der jungen Blätter sind noch gesund. (7)

3.14 Transkriptomanalyse der GFP-PiAVR2-Linien

Viele der beobachteten Effekte der Überexpression von GFP-PiAVR2 in *Arabidopsis* ähneln einer BR-defizienten Mutante. Um genaueren Einblick in die Wirkung von PiAVR2 auf *Arabidopsis* zu erlangen, wurden Transkriptom-Analysen mit einer 35S::*GFP-PiAVR2*-Linie und Col-0 durchgeführt. In drei aufeinanderfolgenden Wochen wurde aus neun, im Dauerlicht kultivierten, zwei Wochen alten Pflanzen RNA extrahiert und an das National *Arabidopsis* Stock Centre in Norwich zur Analyse gesandt. Mittels GeneChip 1 ara Mikroarrays wurden das Transkriptom untersucht und die Ergebnisse mit freundlicher Hilfe von Joachim Killian und Marek Malec mittels Gene Spring Analysis ausgewertet. Aufgrund der verwendeten biologischen Replikate (statt der häufig verwendeten technischen Replikate) waren die Ergebnisse der drei verschiedenen Wochen zwar tendenziell ähnlich, jedoch in ihrer Amplitude recht unterschiedlich. Wie in Abbildung 44 C im Venn-Diagramm zu sehen ist, überschneiden sich in allen drei Experimenten nur 241 unterschiedlich regulierte Gene. Diese geringe Zahl deutet auf eine hohe biologische Varianz in den verschiedenen Experimenten (in drei aufeinander folgenden Wochen) oder verschiedene Qualität der untersuchten RNA hin. Daher wurde die Qualität der RNAs mittels qRT-PCR untersucht. Die relative Quantifikation des endogenen Kontrollgens Aktin zeigte eine ähnliches Expressionsniveau in allen Proben (Daten nicht gezeigt). Das lässt auf eine gleichmäßige RNA-Qualität schließen. Daher ist die Varianz der Expressionsniveaus wahrscheinlich in den Pflanzen selbst zu suchen.

In Abbildung 44 sind die, in der Überexpressionsmutante mindestens zweifach heraufregulierten (s. Abbildung 44 A) und herunterregulierten (s. Abbildung 44 B), Gene in verschiedene genontologische Kategorien eingeordnet. Während Abszinsäure-regulierte Gene in beiden Kategorien auftauchen, zeigt sich in den GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen eine Induktion der Salizylsäure- und Jasmonsäure-regulierten Gene und eine Repression der Brassinosteroid- und Auxin-regulierten Gene. Damit spiegelt die Transkriptomanalyse die Ergebnisse der Hormonmessung in den zwei Wochen alten Pflanzen wider. In den Auxin-regulierten Genen finden sich viele Vertreter der *SMALL-AUXIN-UP-REGULATED*-Familie, darunter *SAUR-19*, *SAUR-20*, *SAUR-24* und das von Auxin und BR antagonistisch regulierte *SAUR-68*. Die zuvor mittels qRT-PCR untersuchten Gene *SAUR-AC* und *SAUR-65* wurden in dieser Untersuchung nicht identifiziert. Unter den herunter-regulierten Genen finden sich des Weiteren Abwehrgene, wie *MILDEW RESISTANCE LOUS O 15 (MLO15)* und *PLANT DEFENSIN 2.1 (PDF2.1)*. In den hochregulierten Genen wurden die *PATHOGENESIS RELATED (PR)* Gene *PR1*, *PR2* und *PR5* identifiziert. Damit bestätigt dieses Ergebniss die zuvor durchgeführte Genexpressionsanalyse in GFP-PiAVR2-Pflanzen. Aufgrund des starken Phänotypes sowie der erhöhten Abwehr und Zelltodreaktionen von PiAVR2-Langtagspflanzen wurde dieses Experiment nach dieser Arbeit von Marek Malec mit Kurztagspflanzen wiederholt. Die Ergebnisse dieser neuen Analyse lagen zum Zeitpunkt der Zusammenschrift dieser Arbeit nicht vor und wurden daher nicht diskutiert. Diese neue Transkriptomanalyse soll genutzt werden, um weitere durch AVR2 beeinflusste Gene zu identifizieren und damit ein detaillierteres Bild der Wirkung dieses Effektors zu ermöglichen.¹

Tabelle 10: Ausgewählte Gene, deren Expression in PiAVR2-GFP-Pflanzen reprimiert war.

Gen (AGI)	Beschreibung	Bezeichnung/ Genname	-fache Repression	Standardfehler	
AT5G18030		SAUR-like	4,0	0,36	
At3g28345		ABCB15	3,1	0,16	
AT5G18080	Auxin-regulierte Gene	SAUR24	3,1	0,56	
At5g18010		SAUR19	3,1	0,73	
At5g50760		SAUR-like	2,9	0,51	
At1g29510		SAUR68	2,9	0,49	
At5g18020		SAUR20	2,6	0,39	
At5g36910			THI2.2	4,4	0,97
At2g44110	Verteidigung	MLO15	2,8	0,13	
At2g02120		PDF2.1	2,7	0,35	
AT3G55230				2,3	0,22
AT3G55230				2,3	0,22
At4g23680				2,2	0,12
At5g06800	Transkriptionsfaktor	myb-like HTH TF	3,1	0,43	
At1g02340		HFR1	2,9	0,13	
At4g11880		AGL14	2,8	0,35	
At3g25790		myb-like TF	2,3	0,05	

¹Ergebnisse der Arbeit von Marek Malec nicht veröffentlicht.

Ergebnisse

Tabelle 11: Ausgewählte Gene, deren Expression in PiAVR2-GFP-Pflanzen induziert war.

Gen (AGI)	Beschreibung	Bezeichnung/Genname	-fache Induktion	Standardfehler
At2g14610		PR1	16,2	5,87
AT2G32680		ATRLP23	6,9	2,41
At3g57240		BG3	6,6	1,49
At4g04490		CRK36	6,6	1,62
AT1G57630			6,1	2,79
At2g04450		ATNUDT6	5,6	0,51
At1g75040		PR-5	4,8	1,32
At4g35180		LHT7	4,4	1,37
At4g11890		ARCK1	4,2	0,68
At1g33960	negative Regulation der Abwehr	AIG1	4,0	0,78
AT3G48640			3,7	0,63
At5g52760			3,7	0,94
At1g15520		ABCG40	3,6	1,48
At3g47480			3,6	1,18
At4g14365		XBAT34	3,4	0,61
At1g73805		SARD1	2,6	0,05
At5g24530		DMR6	2,6	0,51
At1g21250		WAK1	2,6	0,32
At1g08050			2,5	0,37
At1g74710		ATICS1	2,4	0,09
AT3G25010		ATRLP41	9,4	3,13
At3g24900		ATRLP39	8,2	1,96
AT5G27060		ATRLP53	6,3	2,22
AT4g12490			5,9	1,87
AT3G23120		ATRLP38	5,9	1,77
At5g26170		WRK50	5,7	1,12
At5g10760			5,2	1,21
At3g45860		CRK4	5,0	1,08
At4g23310		CRK23	4,8	1,98
At5g46050	Abwehr	ATPTR3	4,1	1,06
At2g13810		ADL1	3,8	0,59
At3g11010		ATRLP34	3,3	0,72
At2g31865		PARG2	3,2	0,74
At1g35710			3,1	0,55
At3g23110		ATRLP37	3,0	0,85
At4g23130		CRK5	3,0	0,75
At1g19250		FMO1	2,6	0,38
At4g23280		CRK20	2,5	0,26
AT4G12480		EARLI1	2,3	0,11
At2g42360	oxidativer Burst		5,4	1,73
At2g27660			2,9	0,56

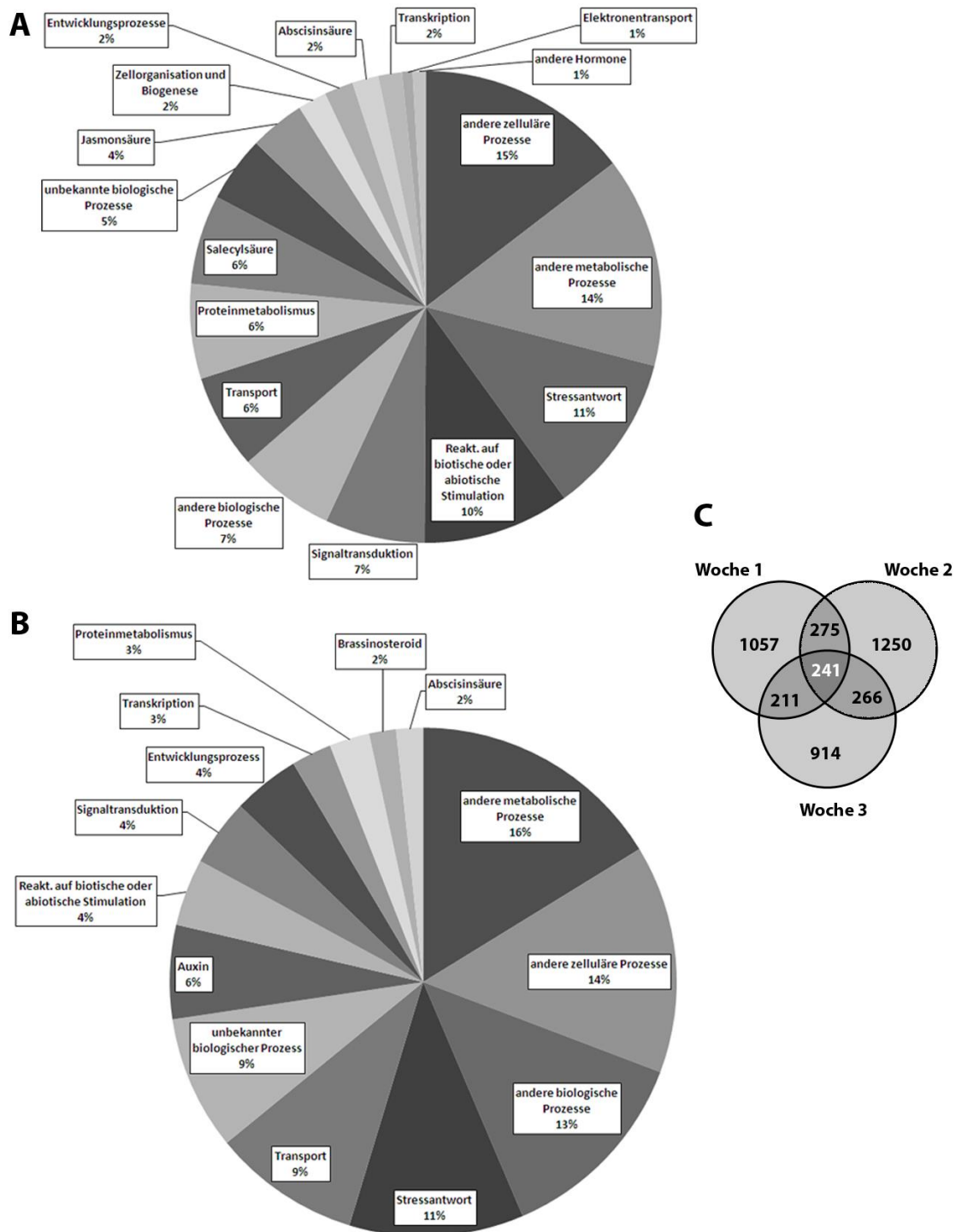


Abbildung 44: Transkriptom-Analyse der GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien

Das Transkriptom von 35S::*GFP-PiAVR2-A.thaliana* Pflanzen wurde durch Mikroarrayanalyse relativ zu Col-0 Pflanzen untersucht. Es wurden je 9 Pflanzen in drei aufeinander folgenden Wochen angezogen, gepoolt und diese biologischen Replikate statistisch ausgewertet. Es wurden nur Gene, deren Expression mindestens zweifach induziert waren, in die Auswertung einbezogen. **A:** hochregulierte Gene; **B:** herabregulierte Gene; **C:** Venn-Diagramm der unterschiedlich regulierten Gene in den verschiedenen Wochen.

4 Diskussion

P. infestans löst die verheerende Kraut- und Knollenfäule in Solanaceae, wie Kartoffel und Tomate, aus. Der hemibiotrophe Oomyzete *P. infestans* verfügt über ein sehr großes Reservoir an RXLR-Effektoren, um das Immunsystem seiner Wirtspflanzen zu schwächen und erfolgreich biotroph und später nekrotroph von ihnen zu leben. Ein RXLR-Effektor, der bedeutend für die Pathogenität von *P. infestans* ist, heißt PiAVR2.

4.1 PiAVR2 und PiAVR2-Like interagieren mit BSL1, BSL2 und BSL3 (und nicht mit BSU1) im Cytoplasma

Um den Wirkmechanismus des RXLR-Effektors PiAVR2 aus *P. infestans* zu erforschen und mögliche Zielproteine zu identifizieren, wurde in dieser Arbeit PiAVR2 in der Modellpflanze *Arabidopsis* untersucht. *Arabidopsis* gehört zur Familie der Brassicaceae aus der Ordnung der Brassicales in der Gruppe der Rosiden. Die Familie der Solanaceae, die Wirtspflanzen für *P. infestans* sind, gehören hingegen zur Ordnung der Solanales in der Gruppe der Asteriden (*The Angiosperm Phylogeny, 2009*). Zahlreiche Signalwege sind evolutionär bereits so früh entstanden, dass trotz des großen phylogenetischen Abstandes *Arabidopsis* als Modellpflanze für die Grundlagenforschung unterschiedlicher Interaktionen dienen kann.

Allerdings müssen nach Untersuchungen in Modellpflanzen immer Untersuchungen in der jeweiligen Wirtspflanze erfolgen, die sich aufgrund der Vorarbeiten zielgerichteter planen lassen. Diese Arbeit am Modell *Arabidopsis* diente als Grundlage für die weiterführenden Untersuchungen der Interaktionen von PiAVR2 in den Solanaceae. Diese Folgeuntersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe um Paul Birch (SCRI, Dundee) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass PiAVR2 und mit drei *Arabidopsis* Kelchphosphatasen interagiert. Die BSU1-Familie aus *A. thaliana* umfasst folgende vier Kelch-Phosphatasen: BSU1, BSU1-LIKE1, BSL2 und BSL3. *In vivo* Interaktionsstudien zeigten, dass PiAVR2 stark mit BSL2 und BSL3 interagiert und schwach mit BSL1. Mit BSU1, der namensgebenden Kelchphosphatase der Familie, konnte keinerlei Interaktion nachgewiesen werden.

Eine Erklärung hierfür könnten die Sequenzunterschiede sein. Sowohl BSU1 und BSL1 als auch BSL2 und BSL3 treten jeweils paarweise als chromosomale Wiederholungen auf. Dabei haben die Proteinsequenzen von BSL2 und BSL3 untereinander eine Ähnlichkeit von 98%. BSL1 weist eine Ähnlichkeit von über 60% zu BSL2 und BSL3 auf. Jedoch zeigt BSU1 in *Arabidopsis* nur 53% Ähnlichkeit zu BSL1 und sogar nur 43% Ähnlichkeit zu BSL2 und BSL3. Vielleicht wird BSU1 aufgrund seiner abweichenden Sequenz nicht von PiAVR2 erkannt oder besitzt eine veränderte Bindedomäne, so dass keine Interaktion mit PiAVR2 etabliert werden kann.

Diskussion

Eine andere mögliche Erklärung sind die Expressionsmuster der verschiedenen Kelchphosphatasen. Mit Promotor::GUS-Fusionen konnten *Maselli et al. (2014)* für BSL2 und BSL3 identische Expressionsmuster zeigen. Deren Expression war stark in Pollen, jedoch schwach im vegetativen Gewebe. Die BSL1-Expression war im Vergleich dazu viel deutlicher in den vegetativen Geweben, jedoch gar nicht in Pollen. Für BSU1 konnte keine konsistente Expression gezeigt werden. Daher wäre es möglich, dass aufgrund der kaum nachweisbaren Aktivität des BSU1-Promotors (*Maselli et al., 2014*) und der daraus resultierenden geringen Expression von BSU1 in *Arabidopsis* keine Interaktion mit PiAVR2 in IP-Experimenten gezeigt werden konnte. Daher wurden die nachfolgenden Co-IP-Experimente in dieser Arbeit mit Konstrukten unter konstitutiv-aktiven Promotoren (pUbi10::BSLs-myc und p35S::PiAVR2-HA) durchgeführt. Da auch in den Co-IPs keine Interaktion von PiAVR2 mit BSU1 gezeigt werden konnte, liegt die Bindungsspezifität von PiAVR2 wahrscheinlich in den Sequenzunterschieden der Kelchphosphatasen.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass auch PiAVR2-like mit BSL1-3 und nicht mit BSU1 interagiert. PiAVR2-like ist ein Homolog zu PiAVR2, welches nicht vom Solanaceen-Resistenzprotein R2 erkannt wird und somit der R2-induzierten hypersensiblen Reaktion (HR) entkommt (*Gilroy et al., 2011a*). Die Interaktion der drei Kelchphosphatasen mit PiAVR2-like ist schwächer als die Interaktion mit PiAVR2, jedoch deutlich nachweisbar. Es wird von R2 also wahrscheinlich nicht die Bindung von PiAVR2 (bzw. PiAVR2-like) an die BSLs erkannt, sondern der ausgelöste Effekt. Oder bei der Bindung von PiAVR2-like an die BSLs kommt es zu einer veränderten Konformation im Vergleich zum PiAVR2-BSL-Komplex und dadurch wird der Proteinkomplex nicht von R2 erkannt.

Im Genom verschiedener Solanaceae, wie Tomate, Kartoffel und Tabak, wurden bis zum Abschluss der Laborarbeit diverse orthologe Gene der Kelchphosphatasen BSL1, BSL2 und BSL3 identifiziert. In den Solanaceae-Arten wurden bisher folgende Homologe der BSU1-Familie identifiziert: Kartoffel (*Solanum tuberosum*) StBSL1 (JQ950742) und StBSL2 (JQ950743); Tomate (*Solanum lycopersicum*) SIBSL1(AEW69819) und SIBSL2 (AEW69826); Tabak (*Nicotiana benthamiana*) NbBSL1 (JQ950744) und NbBSL2 (JQ969018). Allerdings konnte in keinem Fall ein Ortholog zu BSU1 gefunden werden. In den Expressed Sequence Tags (ESTs) von Tomate und Kartoffel wurden des Weiteren Orthologe von BSL3 identifiziert (Eleanor Gilroy, persönliche Mitteilung).

Abbildung 45 zeigt den phylogenetischen Stammbaum aller bisher bekannten Kelchphosphatasen anhand eines Vergleiches ihrer Phosphatasedomänen. Während die Phosphatasedomänen aller BSL1-Proteine eng zusammen gruppieren und auch alle BSL2-Proteine mit AtBSL3 (*A. thaliana* BSL3) eine Gruppe bilden, ist die Phosphatasedomäne von AtBSU1 weit entfernt. In einer neueren phylogenetischen Untersuchung konnten (*Maselli et al., 2014*) zeigen, dass BSU1-artige Gene ausschließlich in Brassicaceen vorkommen, wohingegen BSL1-3 in allen Landpflanzen stark konserviert sind.

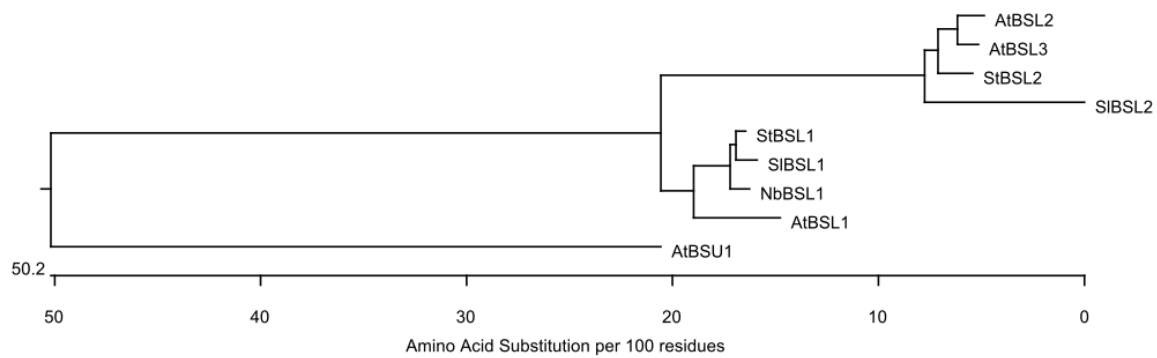


Abbildung 45: Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft der BSU1-Familie aus *Arabidopsis* und Solanaceae-Arten

Phylogenetischer Stammbaum aus einem Alignment der Phosphatasedomänen aller bekannter Proteine der BSU1-Familie von At= *Arabidopsis thaliana*; St = *Solanum tuberosum*, Kartoffel; Sl = *Solanum lycopersicum*, Tomate; Nb = *Nicotiana benthamiana*, Tabak. BSL1 Sequenzen von 522 bis 869 AS; AtBSL2: 658 bis 1005 AS; AtBSL3: 647 bis 994; AtBSU1: 448 bis 681; StBSL2: 640 bis 986 AS. Die Sequenzen wurden mittels eines ClustalV-Algorithmus mit MegAlign (DNASar Version 10.0.1) analysiert.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs in *Arabidopsis* wurden in Tabak Co-Immunopräzipitationen mit BSL1-Proteinen aus Solanaceae durchgeführt und die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1 im Wirt bestätigt (Saunders *et al.*, 2012). Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle *Solanum tuberosum* BSL-Proteine (BSL1, BSL2 und BSL3) in Co-IP- und Yeast-Hybrid-Experimenten mit PiAVR2 interagieren (Turnbull *et al.*, 2019).

Brassinosteroid hat einen positiven Effekt auf die Immunität verschiedener Pflanzen gegenüber pilzlichen, bakteriellen und oomyzischen Pathogenen (s. Einleitung). Eine Repression des BR-Signalweges, z.B. durch eine Inhibition der positiven Regulatoren BSL1, BSL2 und BSL3, wäre für Pathogene (wie *P. infestans*) also von Vorteil. Besitzt die Pflanze jedoch neben, diesen drei Kelchphosphatasen, noch BSU1, eine Kelchphosphatase mit einer deutlich divergenten Sequenz, aber mit der höchsten Priorität im BR-Signalweg, so ist eine Beeinflussung von BSL1, BSL2 und BSL3 nur noch von untergeordneter Bedeutung. Aufgrund der deutlich geringeren Sequenzähnlichkeit von BSU1 mit den anderen Kelchphosphatasen ist es verständlich, dass PiAVR2 als Effektor eines Solanaceae-Pathogens in *Arabidopsis* nur mit den Orthologen seiner Zielproteine interagiert und es keine (bekannte) evolutionäre Anpassung von PiAVR2 an BSU1 gegeben hat. Es ist jedoch unwahrscheinlich, dass ein mutiertes PiAVR2, welches auch mit BSU1 interagieren könnte, bereits ausreichen würde, damit *P. infestans* auch auf *Arabidopsis* eine erfolgreiche Infektion etablieren könnte. Für zukünftige Arbeiten könnte es interessant sein, Experimente mit *bsu1*-Knockout *Arabidopsis*-Pflanzen durchzuführen. So könnte man den Effekt von PiAVR2 auf die Immunantwort und den Brassinosteroidsignalweg in *Arabidopsis* besser charakterisieren.

PiAVR2 wurde in *Arabidopsis* in GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen in der Zellperipherie sowie im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert und dies konnte mittels transienter Expression von PiAVR2-RFP in *N. benthamiana* bestätigt werden. Gleiche Beobachtungen wurden auch von *Saunders et al. (2012)* gemacht. Während der Infektion mit *P. infestans* verändert sich die Lokalisation von GFP-PiAVR2 in *N. benthamiana* deutlich. GFP-PiAVR2 akkumuliert um das Haustorium (perihauistorielle Lokalisation). Dadurch wird deutlich, dass PiAVR2 an die Infektionsstelle rekrutiert wird und wahrscheinlich an der Etablierung der Infektion beteiligt ist (*Saunders et al., 2012*). Die Kelchphosphatasen der BSU1-Familie konnten in *N. benthamiana* in der Zellperipherie und im Cytoplasma visualisiert werden und bis auf BSL1 wurden alle anderen Kelchphosphatasen auch im Zellkern visualisiert. Die überlappende Lokalisation von PiAVR2 mit den Proteinen der BSU1-Familie unterstützt ihre potenzielle Interaktion im Cytoplasma. Zum gleichen Ergebniss kamen auch *Saunders et al. (2012)*. Split-YFP-Experimente von *Saunders et al. (2012)* zeigten, dass PiAVR2 (N/K31) und PiAVR2-like im Cytoplasma mit BSL1 interagieren. Auch in *Arabidopsis* findet die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1, BSL2 und BSL3 wahrscheinlich im Cytoplasma statt, da FRET-FLIM-Messungen *in vivo* Interaktionen dieser drei Proteinpaare zeigte. Da BSU1 auch im Cytoplasma lokalisiert, jedoch keine Bindung mit PiAVR2 gezeigt werden konnte (weder mittels Co-IP, noch FRET-FLIM), würde dies bedeuten, dass es eine Bindungsspezifität von PiAVR2 für drei der vier Kelchphosphatasen gibt.

4.2 Die Rolle von PiAVR2 in Solanaceae-Arten

Saunders et al. (2012) konnten zeigen, dass der *P. infestans* RXLR-Effektor PiAVR2 *in vitro* und *in vivo* mit den Tabak-, Tomato- und Kartoffel-Orthologen der *Arabidopsis* BSU1-LIKE 1 (BSL1) -Phosphatase interagiert. Weitere Untersuchungen zeigten, dass alle *Solanum tuberosum* BSL-Proteine (BSL1, BSL2 und BSL3) in Co-IP- und Yeast-Hybrid-Experimenten mit PiAVR2 interagieren (*Turnbull et al., 2019*). Dabei zeigten *Turnbull et al. (2019)*, dass eine 16-Aminosäuren-Domäne im C-Terminus von PiAVR2 essentiell für die Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs ist. Ohne diese Domäne verliert PiAVR2 seine Virulenz und wird nicht mehr von R2 erkannt. Die Experimente von (*Turnbull et al., 2019*) zeigen weiterhin, dass die drei BSLs unterschiedliche Funktionen haben und einer komplexen gegenseitigen Regulation, sowohl auf Gen- wie auch auf Proteinebene, unterliegen. Virus-induced-Gene-Silencing (VIGS) NbBSL1 Pflanzen zeigen einen Wildtyp-Phänotyp, wohingegen NbBSL2/3-VIGS Pflanzen mit ihrem starken Zwergenwuchs, verkürzten Blattstielen und eingedrehten Blättern an AtBRI1-Knockout-Pflanzen erinnern (*Turnbull et al., 2019*). In NbBSL2/3-VIGS-Pflanzen, in denen die Gene von BSL2 und BSL3 stillgelegt wurden, konnten *Turnbull et al. (2019)* nicht nur kein StBSL2 und StBSL3 Protein nachweisen, sondern auch kein StBSL1. Das bedeutet BSL2 oder BSL3 oder beide zusammen haben einen stabilisierenden Effekt auf BSL1. Damit sind die NbBSL2/3-VIGS-Pflanzen auf Proteinebene BSL-Nullmutanten. Diese Pflanzen zeigen eine verstärkte, durch INF1 ausgelöste Zelltod-Reaktion (*Turnbull et al., 2019*).

Diese verstärkte Reaktion auf ein PAMP könnte bedeuten, dass die negative Regulation der PTI in diesen Pflanzen reduziert oder entfernt wurde. In diesen BSL-Nullmutanten wurde des Weiteren eine stärkere Infektion von *P. infestans* beobachtet (Turnbull *et al.*, 2019), wohingegen nur die Stilllegung des BSL1-Genes (NbBSL1-VIGS) keinen Einfluss auf die *P. infestans* Infektion zeigte (Saunders *et al.*, 2012). Werden die BSLs in Tabak überexprimiert, induzieren alle drei BSLs eine verstärkte Virulenz von *P. infestans* (Turnbull *et al.*, 2019). Diese Ergebnisse zeigen, dass die BSLs Suszeptibilitätsfaktoren in Solanaceae sind und von *P. infestans* benötigt werden, um seine volle Virulenz zu entfalten.

Die Überexpression der Gene der drei Mitglieder der BSL-Familie zeigte weitere Unterschiede in der regulatorischen Wirkung dieser Proteine. Die Überexpression von StBSL1 führte zu einer starken Suppression des INF1-induzierten Zelltodes, während die Überexpression von StBSL3 einen moderaten und die Überexpression von StBSL2 keinen Effekt zeigte.

Turnbull *et al.* (2017) konnten bei den GFP-PiAVR2-überexprimierenden Kartoffelpflanzen eine Hochregulierung der StCHL1-Genexpression zeigen. Dies ist ein basischer Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktor mit einer hohen Sequenzhomologie zu den *Arabidopsis* bHLH-Transkriptionsfaktoren AtCIB1 und AtHBI1. Diese *Arabidopsis* Transkriptionsfaktoren spielen eine Rolle in der BR-Antwort. AtHBI1 fungiert auch als Regulator im Crosstalk zwischen PTI- und BR-assoziiertem Wachstum und ist dabei wahrscheinlich redundant zu CIB1 und BEE2 (Bai *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2014; Malinovsky *et al.*, 2014). Microarray-Analysen von GFP-PiAVR2-überexprimierenden *Arabidopsis* zeigten jedoch keine veränderte Regulation von AtCIB1, AtHBI1 und AtBEE2 im Vergleich zum Wildtyp. Somit besteht hier eine klare Abweichung der Regulation zwischen der Modellpflanze *Arabidopsis* und der Wirtspflanze Kartoffel. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, Interaktionsstudien der Kelchphosphatasen und der bHLH-Transkriptionsfaktoren AtCIB1 und AtHBI1, z.B. mittels Co-IP, durchzuführen.

Nicht nur die BSLs in den Solanaceae haben unterschiedliche Funktionen und spezifische Regulationen. Maselli *et al.* (2014) zeigten auch in *Arabidopsis*, dass die BSU1-artigen Kinasen (BSL1-3) zwar alle mit Proteinen des BR-Signalweges interagieren, jedoch zum Teil leicht abweichende, zum Teil komplett gegensätzliche Eigenschaften aufweisen.

Neben PiAVR2 konnten Saunders *et al.* (2012) auch noch für fünf weitere Mitglieder der PiAVR2/ PEXRD11-Familie eine Interaktion mit SIBSL1 zeigen. In resistenten Solanaceae wird PiAVR2 von dem Resistenz-Protein R2 erkannt und dadurch eine Effektor-induzierte Immunität ausgelöst, die zu einer HR führt. Interessanterweise interagieren nur die PiAVR2-Homologe mit SIBSL1, die vom *Solanum demissum* Resistenzprotein R2 erkannt werden und eine HR auslösen (Champouret, 2010). BSL1 scheint also, entsprechend dem Guard Model, von R2 überwacht zu werden. Saunders *et al.* (2012) konnten des Weiteren zeigen, dass eine Gen-Stilllegung (Silencing) von BSL1 in *N. bethamiana* die R2-vermittelte Resistenz gegenüber *P. infestans* beeinträchtigt, aber die kompatible Interaktion in Abwesenheit von R2 nicht beeinflusst.

PiAVR2, StBSL1 und R2 scheinen einen ternären Komplex zu bilden, da eine BSL1-R2-Interaktion nur in Anwesenheit von PiAVR2 gezeigt werden konnte. Die Bildung dieses ternären Komplexes scheint der Auslöser der HR zu sein. Interessanterweise interagiert auch PiAVR2-Like, die virulente Form von PiAVR2, mit StBSL1. Diese Interaktion führt jedoch nicht zu einer BSL1-R2-Interaktion. PiAVR2-Like entkommt dadurch der R2-vermittelten Resistenz. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den exakten Wirkmechanismus zu klären. *Saunders et al. (2012)* stellen die These auf, dass PiAVR2 biochemische oder konformatorische Änderungen an BSL1 bewirkt, wodurch die R2-Erkennung aktiviert wird. Die R2-vermittelte Resistenz von Solanaceae gegen avirulente, PiAVR2-exprimierende *P. infestans* Stämme entsteht also wahrscheinlich durch eine indirekte Erkennung des AVR-Proteins PiAVR2. Es wurden verschiedene andere indirekte Erkennungen diverser Effektoren gezeigt. Die bekannteste ist für den filamentösen Pflanzenpathogen Pilz *Cladosporium fulvum* beschrieben. Der apoplastische *C. fulvum* Effektor Avr2 inhibiert zwei Tomaten-Cystein-Proteasen, um die Abwehr der Tomate zu schwächen. Das Tomaten-Resistenzprotein Cf-2 erkennt diese inhibitorische Wirkung von Avr2 und induziert eine HR (*Rooney et al., 2005; Shabab et al., 2008*).

In dieser Arbeit wurde zwar ein Zelltod bei PiAVR2-überexprimierenden *Arabidopsis*-Pflanzen beobachtet, jedoch nur bei älteren Pflanzen, die im Dauerlicht kultiviert wurden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1, 2 und 3 in *Arabidopsis* nicht von einem R2 Resistenzprotein überwacht wird. Man könnte in zukünftigen Untersuchungen R2 induzierbar in *Arabidopsis* exprimieren und diese Pflanzen mit PiAVR2 Pflanzen kreuzen. Wenn es in diesen Pflanzen zu einer HR kommt, wäre dies ein Hinweis, dass die *Arabidopsis* bHLH-Transkriptionsfaktoren AtCIB1 und AtHBI1 mit PiAVR2 und den BSLs auch einen ternären Komplex bilden, der eine HR auslösen kann.

4.3 Wie beeinflusst PiAVR2 BSL1, BSL2 und BSL3?

Zahlreiche Untersuchungen zum Brassinosteroid-Signalweg wurde in *Arabidopsis* durchgeführt und dabei wurde BSU1 zum Modell für die anderen BSLs. Viele heute im BR-Signalweg dargestellte Funktionen der Kelchphosphatasen wurden mittels Überexpression oder Funktionsverlust von BSU1 erforscht. Die vier Kelchphosphatasen der BSU1-Familie galten lange als positive Regulatoren des Brassinosteroidweges und es wurde angenommen, dass BSL1-3 in ihrer Funktion mit BSU1 überlappen. Neueste Untersuchungen von (*Maselli et al., 2014*) zeigen jedoch, dass die vier Mitglieder der Familie möglicherweise unterschiedliche Funktionen haben. BSL1 wie auch BSL2/3 gehören phylogenetisch zu zwei sehr alten Kladen und sind in allen Landpflanzen stark konserviert. BSU1-artige Gene hingegen sind ausschließlich auf die Familie der Brassicaceae beschränkt und zeigen selbst bei sehr nah verwandten Arten eine ungewöhnlich starke Divergenz der Sequenzen.

Die Ergebnisse von *Maselli et al. (2014)* zeigen, dass das Modell des BR-Signalweges nur in Brassicaceen gültig ist und die anderen BSU1-artigen Kinasen (BSL1-3) zwar alle mit Proteinen des BR-Signalweges interagieren, jedoch zum Teil leicht abweichende, zum Teil komplett gegensätzliche Eigenschaften aufweisen. Zum Beispiel zeigten *Maselli et al. (2014)*, dass BSL2 und BSL3 mit der BRI1 SIGNALLING KINASE 1 (BSK1) und BSK 3 interagieren. BSL1 interagiert mit BSK3 und nur schwach mit BSK1, und BSU1 interagiert mit keiner BSK im Yeast-two-Hybrid-Experiment.

BSU1 dephosphoryliert das konservierte Tyrosin 200 von BIN2, wodurch BIN2 destabilisiert wird (*Kim et al., 2009*). *Maselli et al. (2014)* zeigten, dass BR-aktiviertes BSU1, jedoch nicht BSL1-3, signifikant die Stabilität von koexprimiertem BIN2 verringert. Vermutlich kommt es in PiAVR2-Pflanzen nicht zur Dephosphorylierung des Tyrosin 200 von BIN2. Dies wäre konsistent mit der Beobachtung, dass die Expression von PiAVR2 keinen Einfluss auf die BIN2-abhängigen Antworten wie zum Beispiel BZR1/BZR2-induzierte Genexpression hat. Zukünftige Experimente könnten klären, ob PiAVR2 in verschiedenen Entwicklungsstadien der Pflanze unterschiedliche Wirkungen zeigt sowie ob und wie BIN2 in PiAVR2-Pflanzen modifiziert ist.

Ein gut etablierter Nachweis für die Beeinflussung des BR-Signalweges ist die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors BZR2 durch BIN2. In *GFP-PiAVR2*-Keimlingen, wie auch in WT-Keimlingen, konnte phosphoryliertes und unphosphoryliertes BZR2 nachgewiesen werden und nach zwei Stunden BL-Behandlung waren fast alle BZR2-Proteine dephosphoryliert und damit aktiviert. *Maselli et al. (2014)* untersuchten die Phosphorylierung von BZR2 in den *bsl1*, *bsl2*, *bsl3* und *bsl2 bsl3* Funktionsverlust-Mutanten. Der Phosphorylierungsstatus von BZR2 ist in der *bsl1* Mutante identisch zum Wildtyp. Hingegen führt der Funktionsverlust von *bsl2*, *bsl3* und *bsl2 bsl3* zu einer Abnahme der vollständig phosphorylierten Form von BZR2. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme von BZR2-Formen zwischen der vollständig phosphorylierten und dephosphorylierten Form. *Maselli et al. (2014)* vermuten, dass es ein feiner abgestuftes System der Phosphorylierung gibt als das bisher postulierte AN/AUS-Prinzip mit entweder vollständiger Phosphorylierung oder vollständiger Dephosphorylierung von BZR2. Da BZR2 diverse Phosphorylierungsstellen hat, wäre eine solche schrittweise Phosphorylierung oder Phosphorylierung der verschiedenen Stellen durch unterschiedliche Kelchphosphatasen möglich. Bei der Behandlung mit Brassinolid oder Brassinazol verhalten sich die Funktionsverlustmutanten wie der Wildtyp oder BR-defiziente Mutanten (z.B. *de-etiolated 2*).

Damit zeigen die *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien das gleiche Verhalten wie die *bsl1*, jedoch nicht wie die *bsl2* und *bsl3* Funktionsverlust-Mutanten. Sollte es also durch die Interaktion von PiAVR2 zu einer verringerten Aktivität von BSL2 und 3 kommen, so ist dieser Einfluss nicht so stark wie bei den Funktionsverlust-Mutanten. Oder in den *bsl2* und *bsl3* Funktionsverlust-Mutanten kommt es zusätzlich zu einer Destabilisierung von BSL1, ähnlich wie es in Tabak gezeigt werden konnte. Damit wären die Funktionsverlustmutanten auch BSL-Nullmutanten und wären mit den *GFP-PiAVR2* Pflanzen nicht vergleichbar.

Diskussion

Interessanterweise konnte in GFP-PiAVR2-exprimierenden Protoplasten eine dauerhafte De-Phosphorylierung und damit Aktivierung von BZR2 gezeigt werden (mit und ohne BL Behandlung). Protoplasten werden aus 4,5 Wochen alten Col-0-Pflanzen gewonnen, wohingegen die oben beschriebenen Experimente mit zwei Wochen alten Überexpressionspflanzen durchgeführt wurden. Es wäre daher möglich, dass es sich um einen Alterseffekt handelt. Wahrscheinlicher ist allerdings eine negative Rückkopplungsreaktion in den GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen, um die Daueraktivierung des BR-Signalweges zu unterbinden. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, den BZR2-Phosphorylierungsstatus in sehr jungen GFP-PiAVR2-Pflanzen zu überprüfen. Da die Überexpressionspflanzen einen BR-Phänotyp haben, ist anzunehmen, dass die negative Rückkopplung erst nach einigen Tagen in der Entwicklung ausgelöst wird.

Da kein BZR1-Antikörper zur Zeit der Durchführung erhältlich war, kann zu diesem Zeitpunkt keine Aussage zum Phosphorylierungsstatus von BZR1 in den GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien getroffen werden.

Wenn BSU1 allerdings ausreichend ist, um die Funktionlität des BR-Weges aufrecht zu erhalten, warum zeigen die GFP-PiAVR2-Pflanzen dann einen zumeist BR-defizienten Phänotyp und De-Etiolierung der Dunkelkeimlinge? Handelt es sich dabei um pleiotrope Nebeneffekte durch die Beeinflussung anderer Signalwege? Oder gibt es neben den vier Kelchphosphatasen noch andere Proteine, die BIN2 deaktivieren können? Möglicherweise werden die beobachteten Effekte nicht von BZR2 ausgelöst. Neben BZR1 und BZR2 existieren noch vier BZR1/BZR2-Homologe, genannt BEH1-4, die bisher wenig erforscht sind (*Wang et al., 2002*). BEH1-4 werden genauso phosphoryliert wie BZR1 und BZR2 (*Yin et al., 2005*). Des Weiteren interagiert neben BZR1 und BZR2 auch BEH2 in Yeast-2-Hybrid-Experimenten mit einer GSK3-Kinase (*Rozhon et al., 2010*). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde bisher angenommen, dass alle Homologe überlappende Funktionen haben. *Lachowiec et al. (2018)* zeigten inzwischen, dass BEH4, das phylogenetisch älteste Homolog von BZR1/ BZR2 für die Robustheit in der Entwicklung am wichtigsten ist und die Regulation des Crosstalks der Homologe über BEH4 integriert wird. Vielleicht wird durch die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1, BSL2 und BSL3 also nicht die Dephosphorylierung von BZR2 beeinträchtigt, sondern die Dephosphorylierung eines seiner homologen Transkriptionsfaktoren. Da alle Proteine des BR-Signalweges (von BRI1 bis zu BZR1/2) über diverse Homologe verfügen, deren Aktivität, Bindungsaffinität sowie das räumliche und zeitliche Expressionsspektrum bisher kaum erforscht wurden, ist es schwierig genaue Schlüsse über die Beeinflussung von PiAVR2 auf den BR-Signalweg zu ziehen und soll an dieser Stelle auch nicht weiter vertieft werden.

Werden BZR1 und BZR2 dephosphoryliert und somit aktiviert, sind sie als Transkriptionsfaktoren für die Induktion und Repression von BR-responsiven Genen verantwortlich. Der BR-Signalweg kontrolliert die Genexpression einer großen Vielfalt von Genen, wobei das Ausmaß der Variation bei den meisten Genen jedoch sehr klein ist, im Durchschnitt nur zwei- bis maximal dreifache Unterschiede (*Goda et al., 2002*).

Maselli et al. (2014) zeigten in *bsl2 bsl3* Funktionsverlust-Mutanten für typische BR-regulierte Gene das gleiche Expressionsmuster wie im Wildtyp. Die *bsl 2 bsl3* Funktionsverlustmutante scheint also auf auf Genexpressionsebene nicht BR-insensitiv oder BR-defizient zu sein (*Maselli et al., 2014*). Wenn sich diese Daten bestätigen lassen und wenn PiAVR2 eine negative regulatorische Wirkung auf BSL2 und 3 (und eventuell auch auf BSL1) hat, wäre dies möglicherweise kaum oder nicht in den Expressionsniveaus der BR-regulierten Gene sichtbar.

Dies hat sich in den qRT-PCR-Experimenten in dieser Arbeit bestätigt. In GFP-PiAVR2-Überexpressionlinien konnte eine geringe Repression der BR-induzierten Gene SAUR-AC1 und SAUR-65 durch PiAVR2 beobachtet werden. Allerdings sind die Transkriptlevel nur 1,5- bzw. 1,8-fach reduziert, so dass ein zufälliger Effekt nicht ausgeschlossen werden kann. Da dieser Effekt jedoch mehrfach in *GFP-PiAVR2*-Pflanzen und in Dex-induzierbaren *GFP-PiAVR2*-Pflanzen beobachtet werden konnte, handelt es sich wahrscheinlich um einen schwachen, aber nachweisbaren reprimierenden Effekt von PiAVR2 auf BR-Signalweg. Da jedoch keine Beeinflussung des Phosphorylierungsstatus von BZR2 gezeigt werden konnte, kann nicht bestimmt werden, ob dieser Effekt durch die Beeinflussung von drei der vier Kelchphosphatasen ausgelöst wurde. Möglicherweise kommt es durch die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1-3 (indirekt) zur Regulierung anderer Transkriptionsfaktoren (wie BZR1 oder Homologe), die BR-responsive Gene steuern.

Der BR-Signalweg induziert seine eigene Rückkopplungs-Regulation durch die Repression von BR-Synthesegenen, wie CPD1 und DWF4. Diese Repression wird durch die Bindung von BZR1 an BR-RESPONSIVE ELEMENTS (BREE) in BR-Synthesegenen reguliert (*He et al., 2005; He et al., 2002*), und BZR2 scheint eine ähnliche Funktion zu haben (*Vert und Chory, 2006; Yin et al., 2005*). Jedoch ist auch hier der Effekt äußerst gering. In der BR-defizienten *det2*-Mutante (Deletion eines BR-Synthesegens) ist das DWF4-Transkriptlevel nur 1,8-fach und das CPD1-Transkriptlevel nur 1,6-fach induziert (*efp-browser*, Daten von Goda 2003). Daher ist es verständlich, dass in den *GFP-PiAVR2*-Linien, in denen nur ein schwacher Effekt auf die Expression von BR-induzierten Genen gesehen wurde, kein Effekt auf eine Rückkopplungsreaktion der BR-Synthesegene beobachtet werden konnte. Da in zwei Wochen alten Pflanzen auf Proteinregulationsebene (Phosphorylierung des Transkriptionsfaktor BZR2) und auf Genexpressionsebene kein oder kaum ein Unterschied zwischen PiAVR2-überexprimierenden *Arabidopsis*-Linien und dem WT gefunden wurde, stellt sich die Frage, wie der BR-ähnliche Phänotyp zustande kommt. Eine Messung des Brassinosteroidgehaltes könnte hierbei eine Antwort liefern. Am wahrscheinlichsten ist eine negative Rückkopplungsreaktion, die nach wenigen Tagen (wenn die Effekte durch die dauerhafte Überexpression von PiAVR2 zu stark werden) initiiert wird.

Doch wie beeinflusst PiAVR2 die drei Proteine der Kelchphosphatasen? Kommt es durch die Interaktion mit PiAVR2 zu einer Repression der Aktivität der Kelchphosphatasen, blockiert oder modifiziert PiAVR2 die BIN2-Bindestelle der Phosphatasen oder kommt es zu einer Degradation der Kelchphosphatasen durch PiAVR2?

Diskussion

Die Untersuchungen der BR-regulierten molekularen Antworten (Expression BR-regulierter Gene und Phosphorylierung von BZR2) zeigen, dass PiAVR2 nicht den kanonischen Brassinosteroidweg inhibiert. Der Stomata-Phänotyp, der durch die Expression von PiAVR2 ausgelöst wird, deutet auf eine Inhibition der BSLs hin. Da PiAVR2 nur mit den BSLs und nicht mit BSU1 interagiert, legt dies nahe, dass BSU1 keine Rolle in der Stomatogenese spielt. Neben BIN2 gibt es noch weitere GSK3-like-Kinasen, die womöglich mit den BSLs interagieren (*Kim et al., 2012; Zhu et al., 2017*).

Sollte die Interaktion von PiAVR2 mit BSL1, BSL2 und BSL3 zu einer Degradation der Kelchphosphatasen führen, so war es in den Co-IP-Experimenten nicht möglich diese zu detektieren. Durch die extreme *de novo* Synthese der Kelchphosphatasen unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors wurde ein möglicher Abbau verschleiert. Um die Hypothese der Degradation zu verifizieren, wäre die Bestimmung des endogenen BSL-Levels mit einem BSL-spezifischen Antikörper nötig. Um eine mögliche Repression der Aktivität der Kelchphosphatasen durch PiAVR2 nachzuweisen, wäre ein Phosphatase-Aktivitätsassay notwendig. Dieser ist in der weiterführenden Arbeit von Marek Malec geplant.

Warum interagiert PiAVR2 gerade mit den Kelchphosphatasen? Kommt diesen Phosphatasen, neben der positiven Regulation des BR-Signalweges, noch eine weitere Bedeutung zu? Beeinflussen diese Kelchphosphatasen auch BEH1-4, die Homologe von BZR1 und BZR2? Wenn ja, haben diese Transkriptionsfaktoren eine essenzielle Bedeutung für die Immunität? Wenn ja, warum werden sie dann nicht auch von anderen Effektoren ins Visier genommen?

Die Kelchphosphatasen der Solanaceae könnten auch das Ziel bakterieller Effektoren sein. Die Tomatenkelchphosphatasen SIBSL1 und SIBSL2 sind in PubMed als HOP-INTERACTING PROTEIN THI129 und HOP-INTERACTING PROTEIN THI140 hinterlegt. Sie wurden von *Cunnac, S., Nguyen, H., Martin, G.B. und Collmer, A.* im Jahre 2009 bei einem Hefe-2-Hybrid-Versuch als Interaktoren eines Typ III-Effektors von *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (Hop) identifiziert. Diese Daten wurden aber weder publiziert, noch mit anderen Versuchen verifiziert und so bleibt diese Hypothese rein spekulativ.

Um mehr über die Wirkungsweise von PiAVR2 in *Arabidopsis* zu erfahren, wäre es hilfreich, wenn mehr Homologe von bekannten Proteinen des BR-Signalweges sowie neue Komponenten (wie Kinasen, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren) charakterisiert wären, damit Phänotyp und entwicklungspezifische Besonderheiten bei Licht und Dunkelkeimung verglichen werden könnten. Des Weiteren wäre es interessant den Phosphorylierungsstatus aller BZR2 Homologe in GFP-PiAVR2-Pflanzen zu untersuchen (überexprimiert oder induzierbar). Dadurch ließe sich eventuell auch das Genexpressionsmuster erklären.

Allerdings ist eine weitere Untersuchung der Wirkung von PiAVR2 in der Modellpflanze *Arabidopsis* eventuell nicht weiter zielführend. In Brassicaceae existiert neben BSL1-3 auch BSU1 und eventuell wird dadurch der BR-Signalweg in Brassicaceae anders reguliert als in Solanaceae.

Dadurch kann auch die Wirksamkeit von PiAVR2 als Effektor beeinflusst sein. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Modellpflanze *Arabidopsis* nicht geeignet ist, um die Virulenzfunktion von PiAVR2 zu untersuchen. Die Expression von PiAVR2 in *Arabidopsis* ist jedoch interessant, um die Funktion der BSLs auf Pflanzenwachstum und -entwicklung zu untersuchen.

Doch wie beeinflusst der Effektor PiAVR2 den BR-Signalweg in Solanaceae in denen kein BSU vorhanden ist und BSL1-3 die einzigen (bisher identifizierten) Kelchphosphatasen sind? Mit Microarray und qRT-PCR-Analysen konnten *Turnbull et al. (2017)* zeigen, dass typische BR-responsive Gene in PiAVR2-Überexpressions-Kartoffelpflanzen ähnlich reguliert waren wie in Brassinolid-behandelten Wildtyp-Pflanzen. Das deutet eher auf eine verstärkte Aktivierung des BR-Signalweges in Solanaceae durch PiAVR2 (im Gegensatz zu der Reprimierung der SAUR-Gene in GFP-PiAVR2-exprimierenden *Arabidopsis*). Also hat PiAVR2 entweder eine unterschiedliche Wirkung in Solanaceae oder einen anders regulierten BR-Signalweg (zum Beispiel aufgrund des fehlenden BSU1) und dadurch kommt es zu einer anderen Wirkung von PiAVR2.

4.4 Einfluss von PiAVR2 auf den Brassinosteroid-Signalweg und die Brassinosteroid-abhängige Stomatabildung

Pathogene bilden Effektoren, um sich einen Vorteil beim Befall ihres Wirtes zu verschaffen, indem sie zumeist das pflanzliche Immunsystem ihres Wirtes beeinflussen.

PiAVR2 hingegen interagiert mit Regulatoren des BR-Signalweges, der bekanntlich eher Pflanzenwachstum und -entwicklung steuert. Brassinosteroid ist kein spezifisches Abwehrhormon, wie Salicylsäure oder Jasmonsäure. Allerdings wird BR seit Jahren erfolgreich in der Feldforschung sowohl zur Ertragssteigerung als auch zur Steigerung der Stresstoleranz und der Immunabwehr eingesetzt (*Divi und Krishna, 2009; Divi et al., 2010; Vriet et al., 2012; Xia et al., 2009; Xia et al., 2011*). Eine exogene BR-Behandlung von Kartoffeln kann eine *P. infestans*-Infektion um bis zu 40 % verringern und sogar effektiver sein als eine Fungizid-Behandlung (*Khripach et al., 1996; Savel'eva et al., 1999*). Der Wirkungsmechanismus ist bisher weitgehend unklar.

Der Wachstums- und Entwicklungsphänotyp der *GFP-PiAVR2*-Linien deutet auf ein Ungleichgewicht im Brassinosteroid-Signalweg. Viele phänotypische Merkmale der Überexpressionspflanzen (zwergenwüchsig mit epinastischen Blättern, verkürzten Blattstielen und kurzen, dicken Schoten) ähneln den BR-insensitiven und/oder BR-defizienten Mutanten.

Die auswärts gekrümmten Blätter erinnern jedoch mehr an Mutanten mit einem verstärkt aktivierten Brassinosteroid-Weg. Wird PiAVR2 in Kartoffeln überexprimiert, kommt es zu phänotypischen Merkmalen, wie sie für Mutanten mit überaktivem BR-Signalweg typisch sind, mit epinastisch gewölbten Blättern und einem Symetrieverlust (*Turnbull et al., 2017*). Die PiAVR2-Überexpressionskartoffelpflanzen zeigen des Weiteren eine verringerte Anzahl von Stomata. Dies wurde auch bei der Überexpression verschiedener BSLs in *Arabidopsis* beobachtet (*Kim et al., 2012*).

Diskussion

PiAVR2-überexprimierende *Arabidopsis*-Pflanzen hingegen zeigen eine Akkumulation von Stomata, wie sie für BR-insensitive und BR-defiziente Mutanten typisch ist. Der Stomata-Phänotyp lässt sich teilweise mit exogenem BL revertieren, was auf einen BR-defizienten (und nicht BR-insensitiven) Phänotyp der *GFP-PiAVR2*-Pflanzen hindeutet. Besonders auffallend ist, dass nur die Quadrupel-Deletionsmutante *bsu-q*, in der alle vier Kelchphosphatasen deletiert sind, ähnlich exzessiv Stomata akkumuliert wie die *GFP-PiAVR2*-Pflanzen (Kim *et al.*, 2012).

Die *GFP-PiAVR2*-Überexpressionslinien zeigen bei Keimung im Dunkeln eine leichte De-Etiolierung, die durch Zugabe von Brassinazol verstärkt werden kann. Diese Photomorphogenese wurde bisher bei Brassinosteroid-defizienten Mutanten beobachtet. Wenn die *GFP-PiAVR2*-Überexpression zu einer Inhibierung oder Deaktivierung der BSLs führt, so wäre zu erwarten, dass der Phänotyp der Überexpressionslinien dem der *bsl2 bsl3* Funktionsverlustmutanten ähnelt. Allerdings zeigen dunkelgekeimte *bsl2 bsl3* Funktionsverlustmutanten die gleiche Verlängerung der Hypokotyle wie der Wildtyp (Maselli *et al.*, 2014). Das würde bedeuten, dass eventuell nur BSL1 eine Rolle bei der Ausprägung der Photomorphogenese spielt, da in den *bsl2 bsl3* Funktionsverlustmutanten BSL1 noch seine normale Aktivität hat, wohingegen in den PiAVR2-Überexpressionslinien alle drei BSLs inhibiert werden.

BR-insensitive und BR-defiziente Mutanten weisen gewöhnlich verkürzte Wurzeln auf. Konsistent damit sind die Wurzeln von *bsl2 bsl3* Funktionsmutanten signifikant kürzer als die Wurzeln des Wildtyps (Maselli *et al.*, 2014). Die *GFP-PiAVR2*-Pflanzen weisen jedoch verlängerte Wurzeln auf. Die Differenzierung und das Wachstum von Wurzeln werden durch einen komplexen Crosstalk von Auxin, Gibberellin und Brassinosteroid geregelt. Dabei agieren diese Hormone nicht hierarchisch, sondern eng miteinander verflochten, so dass ein Ungleichgewicht in einem dieser Hormonlevel in verschiedenen Entwicklungsstufen zu unterschiedlichen Ergebnissen führt (Depuydt und Hardtke, 2011). Aufgrund der widersprüchlichen Ausprägungen des Phänotyps, verlängerte Wurzeln der *GFP-PiAVR2*-Linien sowie leichte De-Etiolierung im Dunkeln, können von diesem ausgehend keinerlei Schlüsse auf die Art des Hormonungleichgewichts gezogen werden. Die PiAVR2-exprimierenden Pflanzen weisen eine sehr starke Anhäufung von Stomata auf. Dies deutet darauf hin, dass PiAVR2 ein negativer Regulator der BR-abhängigen Stomatabildung ist.

Für die Entwicklung von Stomata aus undifferenzierten Protodermzellen sind die drei homologen bHLH Transkriptionsfaktoren SPCH, MUTE und FAMA essenziell (MacAlister *et al.*, 2007; Meng *et al.*, 2015; Pillitteri *et al.*, 2007). SPCH fördert die Ausdifferenzierung von Protodermzellen in Meristemoid Mutterzellen (Meristemoid Mother Cells MMCs) und deren subsequente asymmetrische Teilung in eine Tochterzelle und ein Meristemoid (Lampard *et al.*, 2008; Lau *et al.*, 2014; MacAlister *et al.*, 2007). Der Transkriptionsfaktor MUTE reguliert die Entwicklung des Meristemoids in eine Guard Mother Cell (GMC) 15. Der finale Schritt in der Stomataentwicklung, die symmetrische Teilung der GMC in zwei Guard Zellen, wird von FAMA reguliert (Lee *et al.*, 2014a; Lee *et al.*, 2014b; Matos *et al.*, 2014; Ohashi-Ito und Bergmann, 2006).

Kim et al. (2012) konnten zeigen, dass Brassinosteroid die Stomataentwicklung negativ reguliert. Durch Brassinosteroid wird die BIN2-vermittelte Phosphorylierung und dadurch Inhibierung der MAP Kinase Kinase (MAPKKK) YDA verhindert. Bei geringem Brassinosteroidgehalt ist BIN2 aktiv und phosphoryliert und damit inaktiviert YDA. Durch die somit verringerte Aktivität der MAPKKK YDA werden die nachgeschalteten Kinasen MKK4/5/7/9 und deren nachgeschalteten Kinasen MPK3/6 nicht mehr so stark phosphoryliert. Dadurch wird SPCH nicht mehr reprimiert und kann beginnen die Stomatabildung zu initiieren (*Kim et al., 2012*). Wird der Brassinosteroid-Signalweg von BRI1 bis BSU1 aktiviert, führt dies zur Inaktivierung von BIN2. Dadurch bleibt die MAPK-Signalkaskade von YDA aktiv und die Stomatabildung wird verhindert.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Brassinosteroid die Stomatabildung negativ beeinflusst. Interessanterweise wurde fast gleichzeitig eine andere Arbeit vorgelegt, die den Schluss nahelegt, dass Brassinosteroid die Stomatagenese positiv beeinflusst. *Gudesblat et al. (2012)* zeigten, dass die Funktionsverlustmutante des BR-Synthesegens CPD1 eine reduzierte Stomataentwicklung in den Hypokotylen hat. Es konnte *in vivo* gezeigt werden, dass BIN2 SPCH direkt phosphoryliert und dadurch instabilisiert. Diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse könnten aufgrund der unterschiedlichen Gewebe zustände kommen, in denen die Untersuchungen gemacht wurden oder sie reflektieren die komplex vernetzten, regulatorischen Beziehungen zwischen Brassinosteroid und der Stomatogenese (*Lau et al., 2014*).

Sowohl die *bsu-q* Mutante (*Kim et al., 2012*) wie auch GFP-PiAVR2 Überexpressionslinien weisen ein starkes Stomata-Clustering auf. Das dominante *bin2-1* und BIN2 überexprimierende Pflanzen zeigen eine Anhäufung von Stomata (*Kim et al., 2012*), jedoch deutlich geringer ausgeprägt als in der *bsu-q* und den PiAVR2-Überexpressionslinien. Auch *bri1* Mutanten sowie die *cpd1* Mutanten haben nur einen milden Stomatapärchen-Phänotyp. *Han und Torii (2016)* werfen aufgrund dieser starken phänotypischen Unterschiede die Frage auf, ob alle Kelchphosphatasen der BSU1 Familie tatsächlich über den BRI1 Rezeptor gesteuert werden oder einige eventuell im Signalweg von ERECTA (ER)/ TOO MANY MOUTHS (TMM) reguliert werden. Wenn dies der Fall ist, dann könnte dies ein Grund sein warum PiAVR2 nur mit drei von vier Kelchphosphatasen interagiert. Eventuell zielt der *Phytophthora infestans* Effektor auf die Stomataentwicklung. Es wurden bereits andere Effektoren charakterisiert, die die Stomataentwicklung beeinflussen. *Meng et al. (2015)* konnten zeigen, dass es durch die induzierte Expression der *Pseudomonas syringae* Effektoren AvrPto und AvrPtoB in *Arabidopsis* zu schweren ektopischen Stomata Differenzierungen kommt. Es ist bekannt, dass diese Effektoren auf BAK1 und andere Rezeptorkinasen der SERK1 Familie abzielen (*Shan et al., 2008*).

Der *Pseudomonas syringae* Effektor HopAI1 inhibiert MPK3/6 (*Zhang et al., 2007*). *Arabidopsis*-Pflanzen in denen HopAI1 transient exprimiert wird, zeigen einen deutlichen Stomatacluster-Phänotyp (*Kim et al., 2012*). Da *P. syringae* durch Stomataöffnungen in seinen Wirt eindringt (*Melotto et al., 2006*) könnte man vermuten, dass *P. syringae* mittels AvrPto, AvrPtoB und HopAI1 die Anzahl möglicher Eintrittsöffnungen erhöhen will.

Wahrscheinlicher handelt es sich jedoch um einen Nebeneffekt der Überexpression. Diese Effektoren interagieren mit BAK1/ SERKs bzw. MPK3/6, die jeweils eine wichtige Rolle in der PTI spielen. Für eine erfolgreiche Infektion durch ein Pathogen erscheint es sinnvoller die direkte Erkennung durch das Wirts-Immunsystem zu verhindern, in dem die PAMP induzierte Immunität unterdrückt wird, anstatt auf eine zeitaufwendigere Stomataneubildung zu setzen. Auch der beobachtete Stomataphänotyp in PiAVR2-Pflanzen ist wahrscheinlich ein pleiotroper Nebeneffekt und nicht der beabsichtigte Effekt.

Es wäre interessant zu untersuchen, welchen Effekt PiAVR2 auf die bHLH Transkriptionsfaktoren hat, die die Stomatabildung regulieren. Dabei wären direkte und indirekte Effekte auf Genexpressionsregulation sowie posttranslationale Modifikationen denkbar. So könnten die PiAVR2-exprimierenden Pflanzen verwendet werden, um die bHLH Transkriptionsfaktoren und deren Zusammenspiel besser zu charakterisieren.

4.5 Der BR-Signalweg beeinflusst viele andere Signalwege

BR hat einen Effekt auf verschiedene andere Hormone und es konnte gezeigt werden, dass BR-regulierte Gene auch durch Licht oder Auxin beeinflusst werden (*Goda et al., 2004; Song et al., 2009b*). Allerdings waren die genauen Mechanismen lange unbekannt. Durch Vergleiche aller bisher durchgeführten Microarrayanalysen konnte gezeigt werden, dass BR andere Hormon-Signalwege auf mehrere verschiedene Arten beeinflusst. *Sun et al. (2010)* zeigten, dass BR durch BZR1 die Transkription vieler Biosynthesegene der Hormone Auxin, Gibberellinsäure, Jasmonsäure und Ethylen reguliert. Durch diese direkte Regulation von Signalkomponenten anderer Hormonwege beeinflusst BR die Sensitivität der Pflanze auf andere hormonelle Signale. Und vergleicht man die BR-regulierten Gene mit den Genen, die durch andere Hormonwege reguliert werden, findet man eine signifikante Anzahl koregulierter Gene (*Nemhauser et al., 2006; Sun et al., 2010*).

BZR1/BZR2 binden beispielsweise an verschiedene Promotoren von Gibberellin-regulierten Genen und kontrollieren deren Expression in *Arabidopsis* und Reis. In *Arabidopsis* binden BZR1/BZR2 an das Non-E-Box-Motiv der *GA 20 Oxidase 1 (GA20ox1)*, einem GA-Biosynthesegen, und kontrollieren BR-abhängig dessen Expression (*Unterholzner et al., 2015*).

Die deetiolierten Phänotypen von BR-Mutanten deuteten bereits früh auf eine essentielle Rolle von BR in der Photomorphogenese hin (*Li et al., 1996; Szekeres et al., 1996*). BR reprimiert die Expression von Licht-induzierten Genen und die Entwicklung von Chloroplasten durch ein BZR1-reguliertes transkriptionelles Netzwerk (*Luo et al., 2010; Sun et al., 2010*). Die große Anzahl von Licht-induzierten Genen, die in BR-defizienten und BR-insensitiven Mutanten hochreguliert ist, führte zur Vermutung, dass BR und Licht viele Transkriptionsfaktoren antagonistisch ko-regulieren (*Chory et al., 1991; Li et al., 1996; Song et al., 2009b; Szekeres et al., 1996*). Neuere Untersuchungen konnten dies bestätigen. So konnten mittels Vergleichs von ChIP-Studien 1170 Gene identifiziert werden, die von BZR1 und ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), einem positivem Regulator der Keimling-Photomorphogenese, ko-reguliert werden (*Li und He, 2016*).

Es stellt sich daher die Frage, ob die Interaktion von PiAVR2 mit den Kelchphosphatasen BSL1, BSL2 und BSL3 der Beeinflussung, z.B. durch Hemmung, des BR-Signalweges dient oder ob damit indirekt andere Signalwege beeinflusst werden sollen.

4.6 Die Überexpression von PiAVR2 führt zu einem Hormonungleichgewicht

Die Messung der endogenen Hormonniveaus in *A. thaliana* WT-Pflanzen und GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen führte zu folgenden Erkenntnissen: In den Überexpressionspflanzen sind verschiedene Hormonniveaus stark verändert. Leider war es trotz intensiver Bemühungen von Mark Stahl (ZMBP) nicht möglich, das endogene BR-Level zu bestimmen. Interessanterweise waren die Hormonniveaus oftmals in Keimlingen der GFP-PiAVR2-Pflanzen stark alterniert, wohingegen die Hormonniveaus der fünf Wochen alten erwachsenen GFP-PiAVR2-Pflanzen kaum bis keine Unterschiede zu WT-Pflanzen aufwiesen. Diese Unterschiede wurden beim Gehalt von Salicylsäure, Indol-3-Essigsäure und Jasmonsäure gemessen. Die Expression von GFP-PiAVR2 hatte in keinem Entwicklungsstadium einen Einfluss auf die Synthese von Abszissinsäure.

Warum bewirkt die Überexpression von PiAVR2 ein Hormonungleichgewicht in *Arabidopsis*-Keimlingen, jedoch nicht in erwachsenen Pflanzen? Möglicherweise handelt es sich hierbei um pleiotrope Effekte durch die Überexpression von PiAVR2. Dadurch kann es zu Interaktionen mit weiteren Proteinen kommen, mit denen unter natürlichen Bedingungen keine Interaktion stattfinden würde. Oder die unterschiedlichen Hormonlevel sind durch die unterschiedlichen Expressionsmuster der BSLs in verschiedenen Entwicklungsstadien bedingt. Die Geneexpressionsdaten von <http://bar.utoronto.ca/efp2/Arabidopsis/> zeigen, dass die Expression von BSL1 in erwachsenen *Arabidopsis*-Pflanzen um das 1,4-fache geringer ist als in Keimlingen. Die Expression von BSL2/ BSL3 halbiert sich während der Entwicklung zur erwachsenen Pflanze.

Um ein realistisches Bild der endogenen Hormonniveaus während einer *P. infestans*-Infektion zu bekommen, wäre eine kurze induzierte Expression von PiAVR2 notwendig. Weil das verwendete Dexamethason-induzierbare System zu viele pleiotrope Nebeneffekte zeigte, konnten mit diesen Pflanzen keine zuverlässigen Messungen der Hormonniveaus durchgeführt werden.

Da in GFP-PiAVR2-Pflanzen die Ausbildung eines BR-defizienten Phänotypes beobachtet wurde, ist zu vermuten, dass auch der BR-Gehalt – wenn überhaupt – erst in älteren Pflanzen durch eine Feedback-Regulation wieder normalisiert wird.

4.7 Der BR-Signalweg beeinflusst die PTI

Durch intensive Studien wurden erste Einblicke in den Einfluss von BR und des BR-Signalweges auf die PTI ermöglicht. Dabei lag das Hauptaugenmerk einige Jahre auf der essentiellen Rolle von BRI1 und BAK1 (*Chinchilla et al., 2009; Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007; Wang, 2012*).

Diskussion

Ähnlich der BR-induzierten BRI1-Signalweiterleitung, kommt es bei der Bindung von flg22 an den FLS2-Rezeptor zur Assoziation und Transphosphorylierung mit BAK1, da BAK1 als Co-Rezeptor für mehrere Rezeptoren fungiert (*Chinchilla et al., 2007*). Welche Wirkung hat es, wenn sich der BRI1-Rezeptor und der FLS2-Rezeptor ihren Co-Rezeptor BAK1 teilen? Wirken beide Signalwege antagonistisch, da sie sich in Konkurrenz um BAK1 befinden, oder fördern sie einander durch die vermehrte Bereitstellung von aktiviertem BAK1 (*Chinchilla et al., 2009*)? Im Jahre 2012 haben zwei verschiedene Untersuchungen gegenläufige Antworten auf diese Frage geliefert. *Albrecht et al. (2012)* führten biochemische und physiologische Untersuchungen an Wildtyp-Pflanzen durch, die den Schluss nahe legen, dass es bei der Aktivierung beider Signalwege zu einer unidirektionalen Repression der PTI durch BR kommt. Interessanterweise war diese Repression nicht wie erwartet von BAK1-abhängig. Durch die Behandlung mit BR konnte kaum BAK1 aus BAK1-FLS2-Komplexen gelöst werden. Des Weiteren reprimierte die BR-Behandlung auch Chitin-induzierte PTI-Signale, obwohl diese BAK1-unabhängig sind (*Albrecht et al., 2012*). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass BR die PTI nicht durch die Konkurrenz um BAK1, sondern durch einen anderen, bisher unbekanntem Mechanismus reprimiert.

Die Untersuchungen von *Belkhadir et al. (2012)* hingegen kommen zu dem Schluss, dass BR BAK1-abhängig auf die PTI wirkt. Sowohl die Erhöhung als auch die Reduktion des endogenen BR-Levels führte zu einer Repression der flg22-induzierten Immunreaktionen, die aber auch hier nur unidirektional von BR auf die flg22-Antworten wirkte und nicht umgekehrt. Die Überexpression von BRI1 führte zu einer starken Reduktion der BAK1-abhängigen PTI-Antworten auf flg22 und anderen PAMPs (elf18 und Peptidoglykan), hatte jedoch keinen Einfluss auf die BAK1-unabhängigen PTI-Antwort nach Chitin-Behandlung. Durch die Überexpression von BRI1 und BAK1 konnten wieder normale PTI-Antworten gemessen werden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der BRI1-Rezeptor BAK1 vom FLS2-Rezeptor abzieht. *Belkhadir et al. (2012)* zeigten weiterhin, dass eine Überzahl an BRI1-Rezeptoren und nicht eine übermäßige Aktivierung die unidirektionale Konkurrenz um BAK1 auslöst.

Beide Untersuchungen zeigten, dass BR unidirektional die PTI beeinflusst, nur bleibt die Diskrepanz, ob diese Beeinflussung positiv oder negativ ist und ob sie BAK1-abhängig oder -unabhängig ist (*Albrecht et al., 2012; Belkhadir et al., 2012*). Jedoch zeigen diese Ergebnisse übereinstimmend, dass der BR-Signalweg die PTI beeinflusst.

Ein Screening nach BZR1-assoziierten Proteinen mittels Tandem-Affinity-Aufreinigung und nachfolgender Massenspektrometrie konnte rund 50 Proteine sicher identifizieren (*Wang et al., 2013*). Neben den bekannten Proteinen des BR-Signalweges, wie 14-3-3 Proteinen, BSK1, BIN2 und mehreren Untereinheiten von PP2A, wurden auch MAP KINASE KINASE 5 (MKK5) und MAP KINASE 4 (MAPK4) eindeutig identifiziert.

Beide interagieren *in vivo* und *in vitro* mit BZR1. MKK5 phosphoryliert BZR1, was darauf schließen lässt, dass der MAP-Kinase-Weg an der posttranslationalen Modifikation des BZR1 beteiligt ist (Wang *et al.*, 2013). Dies könnte erklären, warum ein RXLR-Effektor, wie PiAVR2, in den BR-Signalweg eingreift, um einen Vorteil bei der Besiedlung seines Wirtes zu erlangen.

Turnbull *et al.* (2017) konnten zeigen, dass der Effektor PiAVR2 den INF1-ausgelösten Zelltod und fördert die Blattinfektion von *P. infestans* supprimiert. Des Weiteren zeigten sie, dass auch der bHLH-Transkriptionsfaktor StCHL1 ein negativer Regulator der Immunantwort in Tabak und Kartoffel ist, da dieser den INF1-ausgelösten Zelltod supprimiert und die Blattinfektion von *P. infestans* fördert. Wird die Genexpression von NbCHL1 in Tabak stillgelegt (NbCHL1-VIGS), kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Fähigkeit von PiAVR2 die INF1-ausgelöste Zelltodreaktion zu supprimieren (Turnbull *et al.*, 2017). Turnbull *et al.* (2019) haben des Weiteren untersucht, ob auch die Fähigkeit von BSL1 und BSL3, die INF1-ausgelöste Zelltodreaktion zu unterdrücken, CHL1-abhängig ist. Beide Phosphatasen konnten in NbCHL1-VIGS-Pflanzen die INF1-ausgelöste Zelltodreaktion deutlich schwächer unterdrücken. Dabei war StBSL1 noch eingeschränkt in der Lage den Zelltod zu supprimieren, wohingegen StBSL3 die Zelltodreaktion in NbCHL1-Tabak gar nicht mehr unterdrücken kann.

In allen durchgeführten Experimenten dieser Arbeit zeigte die Expression von PiAVR2 in *Arabidopsis* zwar keinen Einfluss auf die PTI, jedoch verfügt *A. thaliana* im Gegensatz zu den Solanaceen über eine vierte Kelchphosphatase, BSU1. BSU1 interagiert nicht mit PiAVR2, wahrscheinlich aufgrund ihrer geringen Homologie zu den anderen Kelchphosphatasen. So kommt es in *A. thaliana* nicht zu einer vollständigen Beeinflussung des BR-Signalweges, wie es in Solanaceen möglich ist. Daher kann in dieser Modellpflanze nicht abschließend geklärt werden, ob die Interaktion von PiAVR2 mit positiven Regulatoren des BR-Signalweges die PTI des Wirtes beeinträchtigen soll oder einem anderen Zweck dient und möglicherweise auf einen noch unbekanntem BR-induzierten Resistenzmechanismus zielt, z.B. als Aktivator von noch unbekanntem „endogenen Fungiziden“ in Pflanzen (Kutschera und Wang, 2012).

Der BR-Signalweg ist wichtig für die Antwort auf biotischen Stress. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren BZR1 und BZR2 eine wichtige Rolle beim Integrieren des BR-Signalweges und der pflanzlichen Immunantwort spielen (Lozano-Duran *et al.*, 2013). So ist die Aktivierung von BZR1 essenziell für die Inhibition der Signalweiterleitung in der pflanzlichen Immunabwehr. Zum einen induziert BZR1 die Expression von verschiedenen WRKY-Transkriptionsfaktoren, die negative Regulatoren der zeitigen Immunantwort sind. Zum anderen interagiert BZR1 direkt mit WRKY40, um BR- und Immunabwehr-Signalweiterleitung auszubalancieren. Ohne WRKY40 wäre der supprimierende Effekt von BR auf den PAMP-getriggerten Ausstoß von reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Burst; ROS) teilweise beeinträchtigt. Des Weiteren konnten Kang *et al.* (2015) zeigen, dass BZR2 das direkte Substrat der MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 6 (MPK6) ist und von dieser phosphoryliert wird.

Sowohl die Null-Mutation von BZR2 als auch eine Modifikation der MPK6-Phosphorylierungsstellen an BZR2 führt zu einer beeinträchtigten Abwehr gegenüber bakteriellen Pathogenen. Dies würde bedeuten, dass BZR2 ein positiver Regulator der pflanzlichen Immunität unterhalb des MAPK-Signalweges ist (Kang *et al.*, 2015). Kürzlich konnten Tian *et al.* (2018) zeigen, dass eine H₂O₂-induzierte Oxidation von BZR1/ BZR2 ihre transkriptionelle Aktivität durch die Interaktion mit AUXIN RESPONSE FACTOR 6 (ARF6) und PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) fördern kann. Währenddessen verstärkt das Thioredoxin Protein TRXh5 die pflanzliche Immunantwort und reprimiert das Wachstum. Die Expression von TRXh5 wird von Pathogenen gefördert und von BZR1/BZR2 reprimiert. Des Weiteren interagiert TRXh5 direkt mit BZR1/BZR2 und vermindert deren Oxidation. Dadurch wird die BZR1/BZR2-induzierte Quiescent-Center (QC) Zellteilung supprimiert (Quiescent-Center-Teil des Wurzelmeristems, wo die Stammzellbildung induziert wird).

4.8 Die Expression von PiAVR2 induziert die Camalexinbiosynthese in Keimlingen

Phytoalexine spielen eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegen Pathogene. Jedoch kommen sie nur gegen bestimmte Pathogene zu Einsatz. Camalexin, das bedeutendste Phytoalexin von *Arabidopsis*, spielt eine Rolle für die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pilzen, wie *Alternaria brassicicola* (Nafisi *et al.*, 2007) und *Botrytis cineria* (Kliebenstein *et al.*, 2005; Van Baarlen *et al.*, 2007), jedoch nicht gegenüber dem hemibiotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* (Glazebrook *et al.*, 1997; Zhou *et al.*, 1999). Camalexin vermittelt allerdings Resistenz gegenüber hemibiotrophen Oomyceten, wie *Phytophthora brassicae* (Schlaeppli *et al.*, 2010), sowie gegenüber dem hemibiotrophen Pilz *Leptosphaeria maculans* (Bohman *et al.*, 2004; Staal *et al.*, 2006). Daher sollten die GFP-PiAVR2 exprimierenden Keimlinge resistenter gegenüber hemibiotrophen Oomyceten sein als Wildtyp-Keimlinge. Daher handelt es sich bei der gemessenen 20-fachen Induktion des Camalexingehaltes in jungen GFP-PiAVR2 Pflanzen möglicherweise um einen pleiotropen Nebeneffekt der konstanten Überexpression von PiAVR2. In erwachsenen Pflanzen dieser Linien war kein Einfluss auf den Camalexingehalt zu erkennen. Gewöhnt sich eine Pflanze an die Anwesenheit eines konstant überexprimierten Effektors und reagiert nicht mehr darauf? Eine induzierbare Expression könnte hier Aufschluss geben. Aufgrund der starken Nebenwirkungen des Dexamethason-induzierbaren Systems konnten die induzierbaren GFP-PiAVR2-Pflanzen leider keine brauchbaren Daten liefern. Für zukünftige Untersuchungen sollten andere induzierbare Modelle, wie Estradiol-induzierbare Pflanzenlinien, verwendet werden.

Abhängig vom angreifenden Pathogen scheint die Camalexinsynthese durch unterschiedliche Hormonwege reguliert zu werden. Bei einer *A. brassicicola*-Infektion ist die Camalexinsynthese JA-unabhängig (Thomma *et al.*, 1999; van Wees *et al.*, 2003), bei einer *B. cineria*-Infektion hingegen JA-abhängig (Rowe *et al.*, 2010).

Verschiedene Studien zeigten, dass die Camalexinproduktion SA-unabhängig (Nawrath und Métraux, 1999; Roetschi et al., 2001) oder SA-abhängig sein kann (Denby et al., 2005). Ethylen scheint keinen direkten Einfluss auf die Camalexinbiosynthese zu haben, jedoch hat Ethylen einen indirekten Einfluss auf die Stärke der Camalexinreaktion bei einer Infektion mit *Alternaria brassicicola* (Thomma et al., 1999).

In den Keimlingen der GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen konnten zum Teil stark erhöhte Pegel der Abwehrhormone Salicylsäure, Auxin und Jasmonsäure nachgewiesen werden. Vergleicht man die Pegel von Salicylsäure und Camalexin, liegt der Schluss nahe, dass dort eine Koregulierung vorliegt. Auch die erhöhten Pegel von Auxin und Jasmonsäure könnten mit der Camalexinbiosynthese korrelieren. Jedoch müssten in diesem Fall weitere Regulationsmechanismen an der finalen Ausprägung des Camalexinpegels beteiligt sein.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass PiAVR2 eine erhöhte Immunabwehrreaktion in jungen *Arabidopsis*-Pflanzen auslöst. Welchen Vorteil könnte eine erhöhte Immunabwehr für ein Pathogen haben? Turnbull et al. (2017) konnten in *N. benthamiana* zeigen, dass PiAVR2 durch die Aktivierung von BR-abhängigen Signalwegen die Immunabwehr supprimiert. Daher könnte die erhöhte Abwehrreaktion in *Arabidopsis* lediglich ein pleiotroper Nebeneffekt der Überexpression von PiAVR2 und der dadurch ausgelösten Entwicklungsstörung sein. Camalexin wird nicht nur als Folge einer Pathogeninfektion gebildet. Auch abiotische Stressfaktoren, wie UV-B und UV-C, sowie Schwermetalle und Chemikalien, wie Paraquat, die oxidativen Stress auslösen, induzieren die Camalexinproduktion (Tierens et al., 2002; Zhao et al., 1998). Es könnte also auch zu einem kumulativen Effekt der Überexpression von PiAVR2 mit der Anzucht der Pflanzen im Dauerlicht gekommen sein.

Eine andere Möglichkeit wäre, dass es in *Arabidopsis* ein R-Gen gibt und dadurch eine ETI ausgelöst wird. Dies würde allerdings nicht erklären, wieso die Abwehrreaktionen in jungen Pflanzen stärker sind.

4.9 PiAVR2 löst einen stressinduzierbaren Zelltod-Phänotyp aus

Viele GFP-PiAVR2-Linien zeigten unter verschiedenen Bedingungen Symptome eines induzierbaren Zelltod-Phänotypes. Wurden GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien bei einer hohen Lichtintensität auf MS-Medium angezogen, zeigten die Keimblätter und zum Teil die ersten echten Blätter nach zwei Wochen einen Zelltod, der bei den Kontrollpflanzen nicht vorhanden war. Bei einer sechswöchigen Kultivierung auf Erde im Dauerlicht zeigte sich oft ein Zelltod an den Blattspitzen der Überexpressionslinien. Auch die sieben Tage alten GFP-PiAVR2-Keimlinge für die *H. arabidopsidis*-Infektionsstudie wiesen bereits eine gelbliche Färbung der Kotyledonen und Blätter auf. Diese wurden im Dauerlicht, jedoch bei normaler Lichtintensität kultiviert. Die induzierbaren GFP-PiAVR2-Linien zeigten eine Woche nach der Dexamethasonbehandlung einen Zelltod-Phänotyp der älteren Blätter bei normaler Lichtintensität im Kurztag.

Wodurch kommt der stressinduzierte Zelltod zustande? Handelt es sich um einen pleiotropen Nebeneffekt aufgrund der exzessiven Überexpression von GFP-PiAVR2?

Diskussion

Das wäre möglich, da Mutanten mit einem intermediären Phänotyp keinen Zelltod an den Blattspitzen zeigten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Zelltod durch die Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs ausgelöst wird, da auch die Blätter der BSL2/BSL3-Virus-induced-Gene-Silencing (VIGS)-Tabakpflanzen einen Berührungszelltod aufweisen (Eleanor Gilroy, persönliche Kommunikation). Lediglich diese Doppel-Knockdownmutanten (Gene silencing) zeigen einen Zelltod bei Berührung, BSL1-VIGS-Tabakpflanzen hingegen nicht. Eventuell ist dies auf den stabilisierenden Effekt von BSL2/BSL3 auf BSL1 zurückzuführen, den *Turnbull et al.* (2019) beobachtet haben. Die BSL2/BSL3-VIGS-Tabaklinien, die einen Berührungszelltod aufweisen, sind auf Proteinebene BSL-Nullmutanten. Wenn GFP-PiAVR2, wie aufgrund der bisherigen Ergebnisse vermutet, BSL1-3 inhibiert, wäre in GFP-PiAVR2 Überexpressions-Pflanzen eine ähnliche Reaktion auf Stress wie in BSL2/BSL3-VIGS-Pflanzen wahrscheinlich. Durch die Inhibition von BSL1-3 durch PiAVR2 entsteht eine Phänokopie der *Arabidopsis bsu-q*-Mutante. Auch die *bsu-q*-Mutante wird von *Kim et al.* (2012) als schwer beeinträchtigt beschrieben, allerdings ohne Zelltodphänomene.

Der immungesteuerte Zelltod in Pflanzen wird entweder über den EDS1/PAD4/SAG101-Komplex oder über NDR1 reguliert (s. Einleitung). Beide Signalkomplexe induzieren eine Akkumulation von Salicylsäure. EDS1 und PAD4 können jedoch auch bei biotischem und abiotischem Stress einen SA-unabhängigen Zelltod induzieren (*Bartsch et al.*, 2006; *Penninckx et al.*, 1996). Daher wurde in den GFP-PiAVR2-Pflanzen der Salicylsäure-Gehalt gemessen. Während der SA-Gehalt in zwei Wochen alten GFP-PiAVR2-Pflanzen 16-fach erhöht war, war in erwachsenen Pflanzen keine SA-Akkumulation zu beobachten. Dieses Ergebnis ist konsistent mit der erhöhten Genexpression von PR1, PR2 und PR5, die ebenfalls nur in Keimlingen beobachtet wurde. Dies bedeutet entweder, dass PiAVR2 nur in jungen Pflanzen eine SA-abhängige SAR auslöst oder die Akkumulation von SA und die Induktion der PR-Genexpression sind eine Reaktion auf den abiotischen Stress in Folge der Kultivierung im Dauerlicht in Kombination mit der Überexpression von PiAVR2. Letzteres wird untermauert durch spätere Untersuchungen in unserem Labor, die zeigten, dass GFP-PiAVR2-Pflanzen, die im Kurztag kultiviert wurden, keine Induktion der PR-Genexpression zeigten (Frederic Brunner, persönliche Kommunikation). Um den Zelltodphänotyp genauer zu untersuchen, könnte man die PiAVR2-Überexpressionslinien mit Mutanten kreuzen, deren ETI-Reaktionen alterniert wurden, wie zum Beispiel *dde2/ein2/pad4/sid2*-Quadrupelmutante (*Tsuda et al.*, 2009) sowie Mutanten, in denen nur einzelne Gene dieser Proteine deletiert oder herunterreguliert sind. DDE2 ist essentiell für die JA-Biosynthese (*Park et al.*, 2002), EIN2 ist verantwortlich für einen Großteil der Ethylen-Reaktionen (*Alonso et al.*, 1999) und SID2 für die SA-Biosynthese nach Pathogenbefall (*Wildermuth et al.*, 2001). PAD4 ist wichtig für die Akkumulation von Salicylsäure und hat auch eine SA-unabhängige Immunfunktion (*Glazebrook et al.*, 2003; *Jirage et al.*, 1999)

Es ist wahrscheinlich, dass die Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs in jüngeren Pflanzen einen stärkeren Effekt ausweist, da der Brassinosteroid-Signalweg essenziell für die Entwicklung der Pflanze ist.

Dass der Zelltod-Phänotyp auch in erwachsenen Pflanzen beobachtet wurde, in denen der Salicylsäuregehalt geringer ist, deutet auf einen SA-unabhängigen Zelltod hin. Das wäre allerdings nicht konsistent mit der Beobachtung, dass der Berührungszelltod von BSL3-VIGS-Tabakpflanzen verschwindet, wenn dieses Gene-Silencing in NahG-exprimierenden Tabakpflanzen durchgeführt wird (Eleanor Gilroy, persönliche Kommunikation). NahG ist ein bakterielles Gen, welches für eine Salicylat-Hydroxylase kodiert, welche Salicylsäure zu Catechol abbaut (You *et al.*, 1991). So wird die SA-Akkumulation verhindert, welche andernfalls die Induktion der PR-Gentranskription sowie die Induktion einer SAR auslösen würde (Delaney *et al.*, 1994; Gaffney *et al.*, 1993). Kreuzungen von GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien mit NahG-Pflanzen könnten eindeutig klären, ob der in *Arabidopsis* beobachtete Zelltod SA-abhängig oder -unabhängig ist.

4.10 PiAVR2 wirkt als Virulenzfaktor für hemibiotrophe Pathogene

PiAVR2 ist ein bedeutender Virulenzfaktor von *P. infestans*. In *Arabidopsis* beeinflusst PiAVR2 allerdings keine der getesteten PTI-Reaktionen. PiAVR2 beeinflusst jedoch die Immunität von *Arabidopsis* gegenüber verschiedenen Pathogenen. Wird GFP-PiAVR2 in *Arabidopsis* überexprimiert, vermittelt dieser Effektor eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber dem hemibiotrophen Oomyceten *P. parasitica* und wirkt somit als Virulenzfaktor.

Die GFP-PiAVR2-Pflanzen weisen jedoch aufgrund des erhöhten Salicylsäuregehaltes und Zelltod-Phänotyps eine verstärkte Resistenz gegenüber dem obligat biotrophen Oomyceten *H. arabidopsidis* auf. Der Zelltod als möglicher pleiotroper Nebeneffekt der Überexpression erzeugt eine Schein-Resistenz der GFP-PiAVR2-Pflanzen gegenüber *H. arabidopsidis* und überdeckt damit den möglichen Einfluss des Effektors PiAVR2.

Diese beiden Infektionsassays wurden nach einem etablierten Protokoll durchgeführt, was die Kultivierung der Pflanzen bei Dauerlicht beinhaltet. Die Kombination von Überexpressionsstress und Lichtstress scheint insbesondere die Infektionsversuche von *Arabidopsis*-Keimlingen mit *H. arabidopsidis* beeinflusst zu haben. Jedoch kann auch eine Beeinflussung der *P. parasitica*-Infektionsassays nicht ausgeschlossen werden. Dazu müssten jedoch die Infektionsassays unter Kurztagbedingungen etabliert/validiert oder induzierbare Überexpressionspflanzen ohne Nebenwirkungen generiert werden.

Spätere Infektionsassays in unserem Labor wurden unter Kurztagbedingungen durchgeführt und deuten darauf hin, dass PiAVR2 eine erhöhte Resistenz gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* vermittelt und die Pflanzen sensibler gegenüber einer Infektion mit dem hemibiotrophen Bakterium *Pseudomonas syringae* macht (Marek Malec, persönliche Kommunikation).

Aufgrund der verschiedenen Infektionsassays, die in unterschiedlichen Entwicklungsstufen (zwei, vier oder sechs Wochen alt) und bei verschiedenen Lichtbedingungen (Kurztag oder Dauerlicht) durchgeführt wurden, ist es schwer, endgültige Schlüsse zur Wirkung von PiAVR2 auf die Immunantwort zu ziehen.

Turnbull *et al.* (2017) zeigten, dass eine transiente Überexpression von PiAVR2 oder StCHL1 in Kartoffelpflanzen zu einem verstärktem Blattbefall durch *P. infestans* und zu einer Beeinträchtigung des INF1-induzierten Zelltodes führt. Des Weiteren führte eine Herunterregulation (Knockdown) von CHL1 in Tabakpflanzen mittels Virus-induced-Gene-Silencing zu einer Reduktion des Befalls mit *P. infestans*. PiAVR2 greift dabei in den Brassinosteroid-Signalweg ein, um in *Solanaceae* den bHLH-Transkriptionsfaktor StCHL1 zu beeinflussen. Es wird vermutet, dass StCHL1 in *Solanaceae* den Antagonismus zwischen dem BR-Signalweg und der angeborenen Immunität reguliert, wie AtHBI1, AtCIB1 und AtBEE2 in *Arabidopsis* (siehe Kapitel 4.2).

4.11 Weiterführende Arbeiten

Um die Interaktion von PiAVR2 mit den Kelchphosphatasen genauer zu charakterisieren, sind weitere biochemische Untersuchungen erforderlich. Eine Bestimmung des endogenen BSL-Levels mit einem BSL-spezifischen Antikörper wäre nötig, um die Hypothese der BSL1-3-Degradation zu verifizieren (siehe Kapitel 4.1). Diese ist in der weiterführenden Arbeit von Marek Malec geplant.

Um den direkten Einfluss von PiAVR2 auf die Kelchphosphatasen zu zeigen, würde man einen Phosphatase-Aktivitätstest benötigen. Dieser Test sollte Aufschluss darüber geben, ob PiAVR2 die Aktivität der Kelchphosphatasen hemmt. Dafür benötigt man größere Proteinmengen, was entweder einer heterologen Expression in Hefe oder einer Extraktion aus Tabakblättern im großen Maßstab bedarf. Beide Wege wurden in unserem Labor beschritten, die Versuchsreihen jedoch nicht zu Ende geführt. Bisher konnten nur radioaktive Phosphatase-Aktivitäts-Analysen mit bakteriell-überexprimiertem BSU1 (Kim *et al.*, 2011; Mora-Garcia *et al.*, 2004) *in vitro* eine Aktivierung von BSU1 nachweisen.

Es stellt sich weiterhin die Frage, auf welche Weise PiAVR2 die Phosphatasen hemmt. Eine *in-silico*-Analyse der PiAVR2-Sequenz (in Zusammenarbeit mit Nadine Wagener, ZMBP) führte zur Identifizierung folgender Besonderheiten in der Proteinsequenz: Zum einen ist die Sequenz sehr lysinreich, was die Entropie des Proteins erhöht und oft bei ungefalteten Proteinen beobachtet wird. Es könnte also sein, dass PiAVR2 ungefaltet in die Wirtszelle gelangt und erst beim Kontakt mit den Kelchphosphatasen seine dreidimensionale Struktur ausbildet. Diese Vermutung wird untermauert durch die Tatsache, dass bisher nur ungefaltetes PiAVR2 heterolog exprimiert werden konnte und dadurch eine Kristallisation verhindert wird (Nadine Wagener, persönliche Kommunikation). Zum anderen finden sich in der PiAVR2-Sequenz zahlreiche Wiederholungen und gespiegelte Wiederholungen, wie zum Beispiel das KAKDKAKE-Motiv (s. Abbildung 46, mit Sternchen markiert). Das auffälligste Motiv in der PiAVR2-Sequenz ist das KIKTF-Motiv (AS 32 bis 36). Dieses Motiv ähnelt entfernt dem KIXF-Motiv von bakteriellen Phosphatase-Inhibitoren (Connor *et al.*, 2001; Egloff *et al.*, 1997; Terry-Lorenzo *et al.*, 2005). Eine Mutation dieses Motivs könnte die Frage klären, ob das KIKTF-Motiv die gleiche Funktion hat.

Das KIKTF-Motiv befindet sich jedoch noch vor dem RXLR-Motiv und bisher konnte nur für das vollständige PiAVR2 und für den C-Terminus eine Bindung an BSL1 mittels Yeast-2-Hybrid und Split-YFP gezeigt werden (Saunders *et al.*, 2012). Das würde bedeuten, dass die Bindung und die Inhibition der BSLs von verschiedenen Untereinheiten von PiAVR2 reguliert werden.

Unter welchen Bedingungen kommt die Bindung von PiAVR2 an die BSLs zustande? Müssen die Kelchphosphatasen dafür aktiviert sein? Um die Interaktion von PiAVR2 mit den BSLs besser charakterisieren zu können, wären *in-vivo*-Interaktionsstudien mit inaktiven BSLs hilfreich. Diese Mutationen in der Phosphatasedomäne von BSL1 (D584A oder H651A), BSL2 und BSL3 (D709A oder H776A) wären auch als Negativkontrollen für den Phosphatase-Aktivitätstest nützlich. Des Weiteren könnte verkürzte Expressionskonstrukte, die nur die Phosphatasedomäne oder nur die Kelchdomäne enthalten, genauer Aufschluss geben, welches Motiv von PiAVR2 an die BSLs bindet.

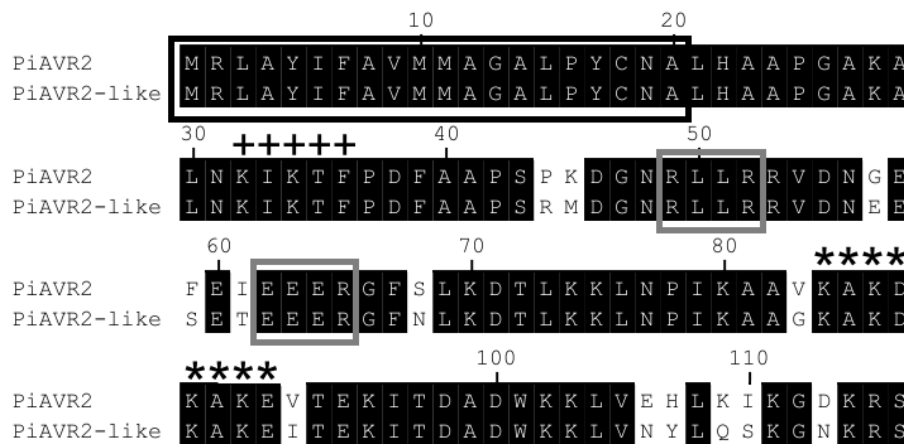


Abbildung 46: Alignment der Proteinsequenzen von PiAVR2 und PiAVR2-like

Die Sequenzen wurden mittels eines ClustalV-Algorithmus mit MegAlign (DNASar Version 10.0.1) ausgerichtet. Gleiche AS sind schwarz hinterlegt. Die schwarze Box markiert das Signalpeptid. Die grauen Boxen zeigen die RXLR- und die EER-Domäne. Die Sterne markieren das KAKDKAKE-Motiv.

Um mehr über die Wirkungsweise von PiAVR2 in *Arabidopsis* zu erfahren, wäre es hilfreich, die Wirkung von PiAVR2 auf die BZR2-Homologe (BZR1 sowie BEH1-4) zu untersuchen. Um möglichst naturnahe Versuchsaufbauten zu verwenden, sollte in induzierbaren PiAVR2-Pflanzen (z.B. Ethanol-induzierbar) mit spezifischen Antikörpern der Phosphorylierungsstatus (mit und ohne BL- und BRZ-Behandlung) aller BZR2-Homologe untersucht werden. Dadurch ließe sich eventuell auch das uneindeutige Genexpressionsmuster erklären.

In der Familie der Brassicaceae existieren vier Kelchphosphatasen. In allen anderen Pflanzenfamilien (inklusive der Solanaceae) wurden nur AtBSL1-3-Homologe identifiziert. Dies könnte bedeuten, dass *Arabidopsis* aufgrund seiner vierten Kelchphosphatase immun gegenüber PiAVR2-induzierter Virulenz ist.

Diskussion

Um dies zu testen, könnte eine BSU1-Knockout- oder -Knockdown-*Arabidopsis*-Linie auf die Wirkung von PiAVR2-Expression untersucht werden. Somit könnte untersucht werden, ob BSU1 die Signalweiterleitung des BR-Signalweges aufrechterhält und somit die angestrebte Virulenzwirkung verhindert oder ob andere Signalkomponenten ausschlaggebend sind (welche unterschiedlich in *Arabidopsis* und Solanaceae sind).

Für zukünftige Untersuchungen können Kreuzungen der GFP-PiAVR2-Linien mit BSL-Deletions- und -Überexpressionsmutanten sowie die Generierung von induzierbaren PiAVR2-Linien (mit Ethanol-induzierbarem Promotor) bei der Erforschung der molekularen und biochemischen Wirkung von PiAVR2 helfen. Des Weiteren wäre interessant, ob in *Arabidopsis* ein Einfluss auf bHLH-Transkriptionsfaktoren gezeigt werden kann, z.B. mit transienten Überexpressions- oder Funktionsverlust-Mutanten. Die angeregten Versuche sollten möglichst in transient induzierbaren Linien (z.B. Ethanol-induzierbarer Promoter) durchgeführt werden, um pleiotrope Nebeneffekte durch konstante Überexpression von PiAVR2 zu vermeiden.

Es wäre weiterhin interessant, den Zelltod-Phänotyp der GFP-PiAVR2-Überexpressionspflanzen näher zu untersuchen. Regulieren BSL2 und BSL3 den Zelltod? Und wenn ja, erfolgt dies direkt oder indirekt und ist der in *Arabidopsis* beobachtete Zelltod SA-abhängig oder -unabhängig? Kreuzungen von GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien mit NahG-Pflanzen könnten diese Frage eindeutig klären.

5 Zusammenfassung

Der RXLR-Effektor PiAVR2 ist mit 116 AS sehr klein, und weniger als die Hälfte seiner Sequenz besteht aus der Effektordomäne. Trotzdem ist PiAVR2 ein essentieller Virulenzfaktor für *P. infestans* (Saunders et al., 2012; Turnbull et al., 2017). In dieser Arbeit wurde PiAVR2 in der Modelnpflanze *Arabidopsis thaliana* molekularbiologisch und physiologisch charakterisiert.

PiAVR2 interagiert mit den Kelchphosphatasen BSL1, BSL2 und BSL3 *in vivo*. Mit der vierten und phylogenetisch entferntesten Kelchphosphatase, BSU1, konnte keine Interaktion gezeigt werden. BSU1 existiert ausschließlich in Brassicaceae. In allen anderen Pflanzenfamilien, inklusive Solanaceae, den Wirtspflanzen von *P. infestans*, existieren nur BSL1, BSL2 und BSL3 und sind stark konserviert (Maselli et al., 2014).

Die Kelchphosphatasen BSU1 und BSL1 sind in *A. thaliana* positive Regulatoren des Brassinosteroid (BR)-Signalweges. Um den Einfluss von PiAVR2 auf BSL1, BSL2 und BSL3 zu untersuchen, wurde PiAVR2 in *A. thaliana* konstitutiv überexprimiert. Der Phänotyp der Pflanzen (zwerghenwüchsig, epinastische Blätter, verkürzte Petiolen, kurze dicke Schoten) ähnelt BR-defizienten Mutanten und lässt eine Inhibition der BSL-Aktivität durch PiAVR2 vermuten. Auf molekularer Ebene war wenig bis kein Effekt von PiAVR2 auf typische BR-Antworten erkennbar. PiAVR2 beeinflusst in GFP-PiAVR2-Pflanzen nicht die Phosphorylierung von BZR2 und führt zu einer geringen Suppression der Genexpression von SAUR-65 und SAUR-AC. Diese Ergebnisse sind konsistent mit Untersuchungen an *bsl1*-, *bsl2*-, *bsl3*- und *bsl2/bsl3*-Funktionsverlustmutanten (Maselli et al., 2014). Obwohl BSL1-3 Homologe von BSU1 sind, führt ihr Funktionsverlust in *Arabidopsis* zu keiner oder nur einer teilweisen Phosphorylierung von BZR2 und hat keinen Einfluss auf die Expression von BR-regulierten Genen. Vermutlich reicht die volle Funktionstüchtigkeit von BSU1 in *Arabidopsis* aus, um die wichtigsten regulatorischen Funktionen aufrecht zu erhalten, oder Feedback-Regulationsmechanismen des BR-Signalweges wurden initiiert, um die Effekte der konstitutiven Überexpression von PiAVR2 abzumildern.

Es bleibt jedoch die Frage bestehen, warum PiAVR2 essentiell für die Pathogenität von *P. infestans* ist. Es konnte kein Einfluss von PiAVR2 auf die PAMP-getriggerte Immunität gezeigt werden. PiAVR2 beeinflusst weder die Aktivierung der MPKs, noch die Induktion von frühen PAMP-induzierten Genen, wie *FRK1* oder *WRKY17*. Die Überexpression von PiAVR2 inhibiert auch nicht die PAMP-induzierte Callose-Einlagerung.

Werden die GFP-PiAVR2-Pflanzen im Dauerlicht angezogen, weisen sie ein erhöhtes basales Expressionsniveau der stress- und pathogen-induzierten Gene PR1, PR2 und PR5 auf und es kommt zu Zelltod-Reaktionen. Da sowohl der BR- als auch der Auxin-Signalweg an der Lichtregulation beteiligt sind, führt die konstitutive Überexpression eines Effektors, der diese Signalwege beeinflusst, zu einer lichtinduzierbaren Stressreaktion. Des Weiteren weisen die GFP-PiAVR2-Pflanzen (insbesondere im Keimlingsstadium) ein erhöhtes Niveau der Abwehrhormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Indol-3-Essigsäure auf sowie einen 20-fach erhöhten Gehalt des Phytoalexins Camalexin.

Zusammenfassung

Diese Veränderung der Genexpression und des Hormongleichgewichts führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem obligat biotrophen *H. arabidopsidis* und zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber dem hemibiotrophen *P. parasitica*. Inzwischen wurde von unserem Kooperationslabor gezeigt, dass PiAVR2 in der *Phytophthora infestans*-Wirtspflanze Kartoffel zu einer erhöhten Expression des bHLH-Transkriptionsfaktors StCHL1 führt (Turnbull et al., 2017). Dieser integriert wahrscheinlich, ähnlich wie seine *Arabidopsis*-Homologe AtHB11 (und wahrscheinlich AtCIB1 und AtBEE2), Signale des BR-Signalweges und der PTI, um ressourcen-sparend zu agieren (Bai et al., 2012; Fan et al., 2014; Malinovsky et al., 2014). Turnbull et al. (2017) zeigten des Weiteren, dass durch die transiente Überexpression von PiAVR2 oder StCHL1 *P. infestans* Kartoffeln stärker befallen konnte und dass ein Knockdown von StCHL1 in Tabak den Blattbefall durch *P. infestans* verringerte.

Da es in Brassicaceae, als einziger Pflanzenfamilie, neben BSL1-3 auch BSU1 gibt, weichen einige BR-Signalweg-Regulationen in *Arabidopsis* von denen der *Phytophthora infestans*-Wirtspflanze Kartoffel ab. So konnten Turnbull et al. (2017) eine verstärkte Aktivierung des BR-Signalweges in Solanaceae durch PiAVR2 zeigen, im Gegensatz zum BR-defizienten Phänotyp der GFP-PiAVR2-*Arabidopsis*-Linien. Für zukünftige Untersuchungen wäre es interessant, die Wirkung von PiAVR2 in *bsu1*-Knockout-*Arabidopsis*-Linien zu untersuchen. Wenn die unterschiedliche Beeinflussung des BR-Signalweges nur von der Anwesenheit von BSU1 in *Arabidopsis* abhängt, so müsste sich dann auch eine verstärkte Aktivierung des BR-Signalweges nachweisen lassen. Sollte dies nicht der Fall sein, kann *Arabidopsis* nicht bzw. nur eingeschränkt als Modellpflanze zur Untersuchung des Brassinosteroid-Signalweges in Solanaceae verwendet werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., und Parker, J.E.** (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *95*, 10306-10311.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., und Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) Function as Transcriptional Activators in Abscisic Acid Signaling. *The Plant Cell Online* *15*, 63-78.
- Ahuja, I., Kissen, R., und Bones, A.M.** (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* *17*, 73-90.
- Albrecht, C., Boutrot, F., Segonzac, C., Schwessinger, B., Gimenez-Ibanez, S., Chinchilla, D., Rathjen, J.P., de Vries, S.C., und Zipfel, C.** (2012). Brassinosteroids inhibit pathogen-associated molecular pattern-triggered immune signaling independent of the receptor kinase BAK1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 303-308.
- Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E., und Beynon, J.L.** (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew. *Science* *306*, 1957-1960.
- Alonso, J.M., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., und Ecker, J.R.** (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* *284*, 2148-2152.
- Amirsadeghi, S., McDonald, A.E., und Vanlerberghe, G.C.** (2007). A glucocorticoid-inducible gene expression system can cause growth defects in tobacco. *Planta* *226*, 453-463.
- Andersen, S.U., Cvitanich, C., Hougaard, B.K., Roussis, A., Gronlund, M., Jensen, D.B., Frokjaer, L.A., und Jensen, E.O.** (2003). The glucocorticoid-inducible GVG system causes severe growth defects in both root and shoot of the model legume *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* *16*, 1069-1076.
- Anderson, J.P., Badruzsaufari, 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. *The Plant Cell Online* *16*, 3460-3479.
- Aoyama, T., und Chua, N.H.** (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* *11*, 605-612.
- Apel, K., und Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* *55*, 373-399.
- Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Pritchard, L., Bos, J.I., Venter, E., Avrova, A.O., Rehmany, A.P., Bohme, U., Brooks, K., Cherevach, I., et al.** (2005). An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 7766-7771.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., und Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* *415*, 977-983.
- Asami, T., Min, Y.K., Nagata, N., Yamagishi, K., Takatsuto, S., Fujioka, S., Murofushi, N., Yamaguchi, I., und Yoshida, S.** (2000). Characterization of brassinazole, a triazole-type brassinosteroid biosynthesis inhibitor. *Plant Physiol* *123*, 93-100.
- Asami, T., Mizutani, M., Fujioka, S., Goda, H., Min, Y.K., Shimada, Y., Nakano, T., Takatsuto, S., Matsuyama, T., Nagata, N., et al.** (2001). Selective interaction of triazole derivatives with DWF4, a cytochrome P450 monooxygenase of the

- brassinosteroid biosynthetic pathway, correlates with brassinosteroid deficiency in planta. *J Biol Chem* 276, 25687-25691.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., und Höfte, M.** (2008). Global Switches and Fine-Tuning—ABA Modulates Plant Pathogen Defense. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21, 709-719.
- Attard, A., Gourgues, M., Callemeyn-Torre, N., und Keller, H.** (2010). The immediate activation of defense responses in *Arabidopsis* roots is not sufficient to prevent *Phytophthora parasitica* infection. *New Phytol* 187, 449-460.
- Ausubel, F.M.** (2005). Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature immunology* 6, 973-979.
- 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, 1537-1546.
- 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, 369-377.
- Bai, M.Y., Shang, J.X., Oh, E., Fan, M., Bai, Y., Zentella, R., Sun, T.P., und Wang, Z.Y.** (2012). Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol* 14, 810-817.
- Bailey, K., Cevik, V., Holton, N., Byrne-Richardson, J., Sohn, K.H., Coates, M., Woods-Tor, A., Aksoy, H.M., Hughes, L., Baxter, L., et al.** (2011). Molecular cloning of ATR5(Emoy2) from *Hyaloperonospora arabidopsidis*, an avirulence determinant that triggers RPP5-mediated defense in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 24, 827-838.
- Bari, R., und Jones, J.** (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* 69, 473-488.
- Bartsch, M., Gobbato, E., Bednarek, P., Debey, S., Schultze, J.L., Bautor, J., und Parker, J.E.** (2006). Salicylic Acid-Independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Signaling in *Arabidopsis* Immunity and Cell Death Is Regulated by the Monooxygenase FMO1 and the Nudix Hydrolase NUDT7. *The Plant Cell Online* 18, 1038-1051.
- Baxter, L., Tripathy, S., Ishaque, N., Boot, N., Cabral, A., Kemen, E., Thines, M., Ah-Fong, A., Anderson, R., Badejoko, W., et al.** (2010). Signatures of Adaptation to Obligate Biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* Genome. *Science* 330, 1549-1551.
- Bednarek, P., Piślewska-Bednarek, M., Ver Loren van Themaat, E., Maddula, R.K., Svatoš, A., und Schulze-Lefert, P.** (2011). Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives. *New Phytologist* 192, 713-726.
- Belkhadir, Y., Jaillais, Y., Epple, P., Balsemao-Pires, E., Dangl, J.L., und Chory, J.** (2012). Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 297-302.
- Bent, A.F., Kunkel, B.N., Dahlbeck, D., Brown, K.L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J., und Staskawicz, B.J.** (1994). RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* 265, 1856-1860.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., und Solano, R.** (2002). Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in *Arabidopsis* confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* 29, 23-32.
- Betsuyaku, S., Katou, S., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., Nomura, N., und Fukuda, H.** (2018). Salicylic Acid and Jasmonic Acid Pathways are Activated in

Spatially Different Domains Around the Infection Site During Effector-Triggered Immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 59, 439.

Bhattacharjee, S., Hiller, N.L., Liolios, K., Win, J., Kanneganti, T.D., Young, C., Kamoun, S., und Haldar, K. (2006). The malarial host-targeting signal is conserved in the Irish potato famine pathogen. *PLoS Pathog* 2, e50.

Bhattacharjee, S., Stahelin, R.V., Speicher, K.D., Speicher, D.W., und Haldar, K. (2012). Endoplasmic reticulum PI(3)P lipid binding targets malaria proteins to the host cell. *Cell* 148, 201-212.

Birch, P.R., Rehmany, A.P., Pritchard, L., Kamoun, S., und Beynon, J.L. (2006). Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends Microbiol* 14, 8-11.

Birch, P.R., und Whisson, S.C. (2001). *Phytophthora infestans* enters the genomics era. *Mol Plant Pathol* 2, 257-263.

Bishop, G.J. (2007). Refining the plant steroid hormone biosynthesis pathway. *Trends in Plant Science* 12, 377-380.

Bleckmann, A., Weidtkamp-Peters, S., Seidel, C.A., und Simon, R. (2010). Stem cell signaling in *Arabidopsis* requires CRN to localize CLV2 to the plasma membrane. *Plant Physiol* 152, 166-176.

Block, A., Li, G., Fu, Z.Q., und Alfano, J.R. (2008). Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol* 11, 396-403.

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, 1425-1440.

Boddey, J.A., Hodder, A.N., Gunther, S., Gilson, P.R., Patsiouras, H., Kapp, E.A., Pearce, J.A., de Koning-Ward, T.F., Simpson, R.J., Crabb, B.S., et al. (2010). An aspartyl protease directs malaria effector proteins to the host cell. *Nature* 463, 627-631.

Bohman, S., Staal, J., Thomma, B.P.H.J., Wang, M., und Dixelius, C. (2004). Characterisation of an *Arabidopsis*-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *The Plant Journal* 37, 9-20.

Boller, T. (1995). Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 46, 189-214.

Boller, T., und He, S.Y. (2009). Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324, 742-744.

Bos, J.I., Kanneganti, T.D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R., und Kamoun, S. (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J* 48, 165-176.

Bos, J.I.B., Armstrong, M., Whisson, S.C., Torto, T.A., Ochwo, M., Birch, P.R.J., und Kamoun, S. (2003). Intraspecific comparative genomics to identify avirulence genes from *Phytophthora*. *New Phytologist* 159, 63-72.

Bouwmeester, K., de Sain, M., Weide, R., Gouget, A., Klamer, S., Canut, H., und Govers, F. (2011). The lectin receptor kinase LecRK-I.9 is a novel *Phytophthora* resistance component and a potential host target for a RXLR effector. *PLoS Pathog* 7, e1001327.

Bozkurt, T.O., Schornack, S., Win, J., Shindo, T., Ilyas, M., Oliva, R., Cano, L.M., Jones, A.M., Huitema, E., van der Hoorn, R.A., et al. (2011). *Phytophthora infestans* effector AVRblb2 prevents secretion of a plant immune protease at the haustorial interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 20832-20837.

- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Broekaert, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F.C., und Cammue, B.P.A.** (2006). The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. *Annual Review of Phytopathology* 44, 393-416.
- Browse, J.** (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60, 183-205.
- Bush, D.S., Cornejo, M.J., Huang, C.N., und Jones, R.L.** (1986). Ca-stimulated secretion of alpha-amylase during development in barley aleurone protoplasts. *Plant Physiol* 82, 566-574.
- Cao, F., Yoshioka, K., und Desveaux, D.** (2011). The roles of ABA in plant-pathogen interactions. *Journal of Plant Research* 124, 489-499.
- Champouret, N.** (2010). *Functional Genomics of Phytophthora infestans Effectors and Solanum Resistance Genes* (Wageningen, The Netherlands: Wageningen University), pp. 162.
- Chen, H., Xue, L., Chintamanani, S., Germain, H., Lin, H., Cui, H., Cai, R., Zuo, J., Tang, X., Li, X., et al.** (2009). ETHYLENE INSENSITIVE3 and ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE1 Repress SALICYLIC ACID INDUCTION DEFICIENT2 Expression to Negatively Regulate Plant Innate Immunity in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* 21, 2527-2540.
- Chen, Z., Agnew, J.L., Cohen, J.D., He, P., Shan, L., Sheen, J., und Kunkel, B.N.** (2007). Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters Arabidopsis thaliana auxin physiology. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 20131-20136.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., und Xie, D.** (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in Arabidopsis. *Mol Plant* 4, 279-288.
- Cheung, F., Win, J., Lang, J.M., Hamilton, J., Vuong, H., Leach, J.E., Kamoun, S., Andre Levesque, C., Tisserat, N., und Buell, C.R.** (2008). Analysis of the Pythium ultimum transcriptome using Sanger and Pyrosequencing approaches. *BMC Genomics* 9, 542.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., und Kemmerling, B.** (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* 14, 535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D., Felix, G., und Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448, 497-500.
- Chini, A., Fonseca, S., Chico, J.M., Fernandez-Calvo, P., und Solano, R.** (2009). The ZIM domain mediates homo- and heteromeric interactions between Arabidopsis JAZ proteins. *Plant J* 59, 77-87.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., Garcia-Casado, G., Lopez-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al.** (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666-671.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B., und Staskawicz, B.J.** (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124, 803-814.
- Choe, S., Fujioka, S., Noguchi, T., Takatsuto, S., Yoshida, S., und Feldmann, K.A.** (2001). Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in Arabidopsis. *Plant J* 26, 573-582.
- Choi, J., Choi, D., Lee, S., Ryu, C.-M., und Hwang, I.** (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends in Plant Science* 16, 388-394.

- Chory, J., Nagpal, P., und Peto, C.A.** (1991). Phenotypic and Genetic Analysis of *det2*, a New Mutant That Affects Light-Regulated Seedling Development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3, 445-459.
- Chory, J., und Susek, R.** (1994). Light signal transduction and the control of seedling development (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Churikova, V.V., Chozhainova, G.N., und Eprintsev, A.T.** (1999). The action of epin on the activity of malatdehydrogenase in seedlings of cucumber plants. In *Regulators of plant growth and development 5* (Moskau: Agricultural Academy), p. 141.
- Clouse, S.D.** (2002). Brassinosteroids. Plant counterparts to animal steroid hormones? *Vitam Horm* 65, 195-223.
- Clouse, S.D., Langford, M., und McMorris, T.C.** (1996). A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiol* 111, 671-678.
- Clouse, S.D., und Sasse, J.M.** (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49, 427-451.
- Coaker, G., Falick, A., und Staskawicz, B.** (2005). Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* 308, 548-550.
- Coates, M.E., und Beynon, J.L.** (2010). *Hyaloperonospora Arabidopsisidis* as a pathogen model. *Annu Rev Phytopathol* 48, 329-345.
- Connor, J.H., Weiser, D.C., Li, S., Hallenbeck, J.M., und Shenolikar, S.** (2001). Growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD34 assembles a novel signaling complex containing protein phosphatase 1 and inhibitor 1. *Mol Cell Biol* 21, 6841-6850.
- Cox, J., und Mann, M.** (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372.
- Cui, J.-X., Zhou, Y.-H., Ding, J.-G., Xia, X.-J., Shi, K.A.I., Chen, S.-C., Asami, T., Chen, Z., und Yu, J.-Q.** (2011). Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. *Plant Cell Environ* 34, 347-358.
- Dangl, J.L., und Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411, 826-833.
- Davis, A.M., Hall, A., Millar, A.J., Darrah, C., und Davis, S.J.** (2009). Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* 5, 3.
- Davis, E.L., Hussey, R.S., Mitchum, M.G., und Baum, T.J.** (2008). Parasitism proteins in nematode-plant interactions. *Curr Opin Plant Biol* 11, 360-366.
- de Koning-Ward, T.F., Gilson, P.R., Boddey, J.A., Rug, M., Smith, B.J., Papenfuss, A.T., Sanders, P.R., Lundie, R.J., Maier, A.G., Cowman, A.F., et al.** (2009). A newly discovered protein export machine in malaria parasites. *Nature* 459, 945-949.
- de la Fuente van Bentem, S., und Hirt, H.** (2007). Using phosphoproteomics to reveal signalling dynamics in plants. *Trends Plant Sci* 12, 404-411.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., und Cervone, F.** (2001). The role of polygacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 39, 313-335.
- De Torres Zabala, M., Bennett, M.H., Truman, W.H., und Grant, M.R.** (2009). Antagonism between salicylic and abscisic acid reflects early host-pathogen conflict and moulds plant defence responses. *The Plant Journal* 59, 375-386.
- De Vleeschauwer, D., Xu, J., und Hofte, M.** (2014). Making sense of hormone-mediated defense networking: from rice to *Arabidopsis*. *Frontiers in plant science* 5, 611.

- De Vos, M., Van Zaanen, W., Koornneef, A., Korzelius, J.P., Dicke, M., Van Loon, L.C., und Pieterse, C.M.J.** (2006). Herbivore-Induced Resistance against Microbial Pathogens in Arabidopsis. *Plant Physiology* *142*, 352-363.
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., und Leemans, J.** (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res* *13*, 4777-4788.
- Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., et al.** (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* *266*, 1247-1250.
- Denby, K.J., Jason, L.J.M., Murray, S.L., und Last, R.L.** (2005). *ups1*, an Arabidopsis thaliana camalexin accumulation mutant defective in multiple defence signalling pathways. *The Plant Journal* *41*, 673-684.
- Depuydt, S., und Hardtke, C.S.** (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr Biol* *21*, R365-373.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., und Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 8024-8029.
- Ding, J., Shi, K., Zhou, Y.-H., und Yu, J.-Q.** (2009). Effects of Root and Foliar Applications of 24-Epibrassinolide on Fusarium Wilt and Antioxidant Metabolism in Cucumber Roots. *HortScience* *44*, 1340-1345.
- Divi, U.K., und Krishna, P.** (2009). Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* *26*, 131-136.
- Divi, U.K., Rahman, T., und Krishna, P.** (2010). Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol* *10*, 151.
- Dodds, P.N., und Rathjen, J.P.** (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews Genetics* *11*, 539-548.
- Doehlemann, G., Requena, N., Schaefer, P., Brunner, F., O'Connell, R., und Parker, J.E.** (2014). Reprogramming of plant cells by filamentous plant-colonizing microbes. *New Phytol* *204*, 803-814.
- Dombrecht, B., Xue, G.P., Sprague, S.J., Kirkegaard, J.A., Ross, J.J., Reid, J.B., Fitt, G.P., Sewelam, N., Schenk, P.M., Manners, J.M., et al.** (2007). MYC2 Differentially Modulates Diverse Jasmonate-Dependent Functions in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* *19*, 2225-2245.
- Dong, X.** (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology* *7*, 547-552.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Chen, Y., Wang, Q., Jiang, R.H., Arredondo, F.D., Anderson, R.G., Thakur, P.B., McDowell, J.M., et al.** (2008a). Conserved C-terminal motifs required for avirulence and suppression of cell death by *Phytophthora sojae* effector Avr1b. *Plant Cell* *20*, 1118-1133.
- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X., und Tyler, B.M.** (2008b). RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell* *20*, 1930-1947.
- Dow, M., Newman, M.A., und von Roepenack, E.** (2000). The Induction and Modulation of Plant Defense Responses by Bacterial Lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* *38*, 241-261.
- Du, Y., Weide, R., Zhao, Z., Msimuko, P., Govers, F., und Bouwmeester, K.** (2018). RXLR effector diversity in *Phytophthora infestans* isolates determines recognition by

- potato resistance proteins; the case study AVR1 and R1. *Studies in Mycology* 89, 85-93.
- Duncan, J.M.** (1999). Phytophthora - an abiding threat to our crops. *Microbiol Today* 26, 114-116.
- Egloff, M.P., Johnson, D.F., Moorhead, G., Cohen, P.T., Cohen, P., und Barford, D.** (1997). Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *EMBO J* 16, 1876-1887.
- Erwin, D.C., und Ribeiro, O.K.** (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide* (St. Paul, MN: APS Press).
- Fan, M., Bai, M.Y., Kim, J.G., Wang, T., Oh, E., Chen, L., Park, C.H., Son, S.H., Kim, S.K., Mudgett, M.B., et al.** (2014). The bHLH transcription factor HB11 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* 26, 828-841.
- Farkas, I., Dombradi, V., Miskei, M., Szabados, L., und Koncz, C.** (2007). Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci* 12, 169-176.
- 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, 265-276.
- Fry, W.** (2008). Phytophthora infestans: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol* 9, 385-402.
- Fry, W., N., G., Cooke, D., McLeod, A., Forbes, G., und Cao, K.** (2009). Population genetics and population diversity of Phytophthora infestans (Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell).
- Fry, W.E., und Goodwin, S.B.** (1997a). Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Dis* 81, 1349-1357.
- Fry, W.E., und Goodwin, S.B.** (1997b). Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Bioscience* 47, 363-371.
- Fu, Z.Q., Guo, M., Jeong, B.R., Tian, F., Elthon, T.E., Cerny, R.L., Staiger, D., und Alfano, J.R.** (2007). A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. *Nature* 447, 284-288.
- Fujioka, S., Takatsuto, S., und Yoshida, S.** (2002). An early C-22 oxidation branch in the brassinosteroid biosynthetic pathway. *Plant Physiol* 130, 930-939.
- Fujioka, S., und Yokota, T.** (2003). Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annu Rev Plant Biol* 54, 137-164.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H., und Ryals, J.** (1993). Requirement of Salicylic Acid for the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Science* 261, 754-756.
- Gampala, S.S., Kim, T.W., He, J.X., Tang, W., Deng, Z., Bai, M.Y., Guan, S., Lalonde, S., Sun, Y., Gendron, J.M., et al.** (2007). An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell* 13, 177-189.
- Gan, P.H., Rafiqi, M., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R., und Dodds, P.N.** (2010). Lipid binding activities of flax rust AvrM and AvrL567 effectors. *Plant Signal Behav* 5, 1272-1275.
- Gao, B., Allen, R., Maier, T., Davis, E.L., Baum, T.J., und Hussey, R.S.** (2003). The parasitome of the phytonematode Heterodera glycines. *Mol Plant Microbe Interact* 16, 720-726.
- Gao, M., Wang, X., Wang, D., Xu, F., Ding, X., Zhang, Z., Bi, D., Cheng, Y.T., Chen, S., Li, X., et al.** (2009). Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe* 6, 34-44.
- Garelik, G.** (2002). Agriculture. Taking the bite out of potato blight. *Science* 298, 1702-1704.

- Gaulin, E., Madoui, M.A., Bottin, A., Jacquet, C., Mathe, C., Couloux, A., Wincker, P., und Dumas, B.** (2008). Transcriptome of *Aphanomyces euteiches*: new oomycete putative pathogenicity factors and metabolic pathways. *PLoS One* 3, e1723.
- Gendron, J.M., und Wang, Z.Y.** (2007). Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10, 436-441.
- Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., und Farmer, E.E.** (2010). Jasmonate Biochemical Pathway. *Sci Signal* 3, cm3-.
- Gilroy, E.M., Breen, S., Whisson, S.C., Squires, J., Hein, I., Kaczmarek, M., Turnbull, D., Boevink, P.C., Lokossou, A., Cano, L.M., et al.** (2011a). Presence/absence, differential expression and sequence polymorphisms between PiAVR2 and PiAVR2-like in *Phytophthora infestans* determine virulence on R2 plants. *New Phytol* 191, 763-776.
- Gilroy, E.M., Taylor, R.M., Hein, I., Boevink, P., Sadanandom, A., und Birch, P.R.** (2011b). CMPG1-dependent cell death follows perception of diverse pathogen elicitors at the host plasma membrane and is suppressed by *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a. *New Phytol* 190, 653-666.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 43, 205-227.
- Glazebrook, J., Chen, W., Estes, B., Chang, H.-S., Nawrath, C., Métraux, J.-P., Zhu, T., und Katagiri, F.** (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal* 34, 217-228.
- Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., und Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-Deficient Mutants of *Arabidopsis* Reveal That PAD4 Encodes a Regulatory Factor and That Four PAD Genes Contribute to Downy Mildew Resistance. *Genetics* 146, 381-392.
- Goda, H., Sasaki, E., Akiyama, K., Maruyama-Nakashita, A., Nakabayashi, K., Li, W., Ogawa, M., Yamauchi, Y., Preston, J., Aoki, K., et al.** (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J* 55, 526-542.
- Goda, H., Sawa, S., Asami, T., Fujioka, S., Shimada, Y., und Yoshida, S.** (2004). Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134, 1555-1573.
- Goda, H., Shimada, Y., Asami, T., Fujioka, S., und Yoshida, S.** (2002). Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 130, 1319-1334.
- Göhre, V., und Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* 46, 189-215.
- Göhre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W., und Robatzek, S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* 18, 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., und Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18, 277-284.
- 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, 843-846.
- Greeff, C., Roux, M., Mundy, J., und Petersen, M.** (2012). Receptor-like kinase complexes in plant innate immunity. *Frontiers in plant science* 3.

- Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W.K., Mandava, N.B., Worley, J.F., Warthen, J.D., Steffens, G.L., Flippen-Anderson, J.L., und Cook, J.C.** (1979). A unique growth promoting steroid from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281, 216-217.
- Grünwald, N.J., und Flier, W.G.** (2005). The Biology of *Phytophthora infestans* at Its Center of Origin*. *Annual Review of Phytopathology* 43, 171-190.
- Gudesblat, G.E., Schneider-Pizon, J., Betti, C., Mayerhofer, J., Vanhoutte, I., van Dongen, W., Boeren, S., Zhiponova, M., de Vries, S., Jonak, C., et al.** (2012). SPEECHLESS integrates brassinosteroid and stomata signalling pathways. *Nat Cell Biol* 14, 548-554.
- Gürlebeck, D., Thieme, F., und Bonas, U.** (2006). Type III effector proteins from the plant pathogen *Xanthomonas* and their role in the interaction with the host plant. *J Plant Physiol* 163, 233-255.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., et al.** (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* 461, 393-398.
- Hammerschmidt, R.** (1999). PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol* 37, 285-306.
- Han, S.K., und Torii, K.U.** (2016). Lineage-specific stem cells, signals and asymmetries during stomatal development. *Development* 143, 1259-1270.
- Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., und Rathjen, J.P.** (2010). Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr Opin Plant Biol* 13, 388-393.
- Hann, D.R., und Rathjen, J.P.** (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* 49, 607-618.
- 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, 1634-1638.
- He, J.X., Gendron, J.M., Yang, Y., Li, J., und Wang, Z.Y.** (2002). The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10185-10190.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T., und Sheen, J.** (2006). Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell* 125, 563-575.
- He, S.Y.** (1996). Elicitation of Plant Hypersensitive Response by Bacteria. *Plant Physiol* 112, 865-869.
- Hearne, P.Q., Knorr, D.A., Hillman, B.I., und Morris, T.J.** (1990). The complete genome structure and synthesis of infectious RNA from clones of tomato bushy stunt virus. *Virology* 177, 141-151.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 12217-12222.
- Hein, I., Birch, P.R.J., Danan, S., Lefebvre, V., Odeny, D.A., Gebhardt, C., Trognitz, F., und Bryan, G.J.** (2009). Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives. . *Potato Research* 52, 215-227.
- Hellens, R., Mullineaux, P., und Klee, H.** (2000). Technical Focus:a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends Plant Sci* 5, 446-451.

- Hiller, N.L., Bhattacharjee, S., van Ooij, C., Liolios, K., Harrison, T., Lopez-Estrano, C., und Haldar, K.** (2004). A host-targeting signal in virulence proteins reveals a secretome in malarial infection. *Science* 306, 1934-1937.
- Hofius, D., Schultz-Larsen, T., Joensen, J., Tsitsigiannis, D.I., Petersen, N.H., Mattsson, O., Jorgensen, L.B., Jones, J.D., Mundy, J., und Petersen, M.** (2009). Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell* 137, 773-783.
- Howe, G.A., und Jander, G.** (2008). Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59, 41-66.
- Ichimura, K., Casais, C., Peck, S.C., Shinozaki, K., und Shirasu, K.** (2006). MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem* 281, 36969-36976.
- Ito, Y., Kaku, H., und Shibuya, N.** (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J* 12, 347-356.
- Ivanov, S., Fedorova, E., und Bisseling, T.** (2010). Intracellular plant microbe associations: secretory pathways and the formation of perimicrobial compartments. *Curr Opin Plant Biol* 13, 372-377.
- Jaillais, Y., und Chory, J.** (2010). Unraveling the paradoxes of plant hormone signaling integration. *Nat Struct Mol Biol* 17, 642-645.
- Jaillais, Y., Hothorn, M., Belkhadir, Y., Dabi, T., Nimchuk, Z.L., Meyerowitz, E.M., und Chory, J.** (2011). Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes Dev* 25, 232-237.
- Janeway, C.** (1989a). Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunology today* 10, 283-286.
- Janeway, C.A., Jr.** (1989b). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 54 Pt 1, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr., und Medzhitov, R.** (2002). Innate immune recognition. *Annual review of immunology* 20, 197-216.
- Jeong, B.R., Lin, Y., Joe, A., Guo, M., Korneli, C., Yang, H., Wang, P., Yu, M., Cerny, R.L., Staiger, D., et al.** (2011). Structure function analysis of an ADP-ribosyltransferase type III effector and its RNA-binding target in plant immunity. *J Biol Chem* 286, 43272-43281.
- Jiang, C.-J., Shimono, M., Sugano, S., Kojima, M., Yazawa, K., Yoshida, R., Inoue, H., Hayashi, N., Sakakibara, H., und Takatsuji, H.** (2010). Abscisic Acid Interacts Antagonistically with Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice–Magnaporthe grisea Interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 791-798.
- Jiang, R.H., Tripathy, S., Govers, F., und Tyler, B.M.** (2008). RXLR effector reservoir in two Phytophthora species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 4874-4879.
- Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., und Glazebrook, J.** (1999). Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13583-13588.
- Jones, J.D., und Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323-329.
- Kale, S.D., Gu, B., Capelluto, D.G., Dou, D., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., et al.** (2010). External lipid PI3P mediates entry of eukaryotic pathogen effectors into plant and animal host cells. *Cell* 142, 284-295.

- Kall, L., Storey, J.D., MacCoss, M.J., und Noble, W.S.** (2008). Posterior error probabilities and false discovery rates: two sides of the same coin. *J Proteome Res* 7, 40-44.
- Kamoun, S.** (2003). Molecular genetics of pathogenic oomycetes. *Eukaryotic cell* 2, 191-199.
- Kang, H.G., Fang, Y., und Singh, K.B.** (1999). A glucocorticoid-inducible transcription system causes severe growth defects in Arabidopsis and induces defense-related genes. *Plant J* 20, 127-133.
- Kang, S., Yang, F., Li, L., Chen, H., Chen, S., und Zhang, J.** (2015). The Arabidopsis transcription factor BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ETHYL METHANESULFONATE-SUPPRESSOR1 is a direct substrate of MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE6 and regulates immunity. *Plant Physiol* 167, 1076-1086.
- Kanneganti, T.-D., Huitema, E., Cakir, C., und Kamoun, S.** (2006). Synergistic Interactions of the Plant Cell Death Pathways Induced by Phytophthora infestans Nep1-Like Protein PiNPP1.1 and INF1 Elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 854-863.
- Kaschani, F., Shabab, M., Bozkurt, T., Shindo, T., Schornack, S., Gu, C., Ilyas, M., Win, J., Kamoun, S., und van der Hoorn, R.A.** (2010). An effector-targeted protease contributes to defense against Phytophthora infestans and is under diversifying selection in natural hosts. *Plant Physiol* 154, 1794-1804.
- Katagiri, F., und Tsuda, K.** (2010). Understanding the Plant Immune System. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1531-1536.
- Kawamura, Y., Hase, S., Takenaka, S., Kanayama, Y., Yoshioka, H., Kamoun, S., und Takahashi, H.** (2009). INF1 Elicitor Activates Jasmonic Acid- and Ethylene-mediated Signalling Pathways and Induces Resistance to Bacterial Wilt Disease in Tomato. *Journal of Phytopathology* 157, 287-297.
- Kazan, K., und Manners, J.M.** (2009). Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 14, 373-382.
- Kazan, K., und Manners, J.M.** (2012). JAZ repressors and the orchestration of phytohormone crosstalk. *Trends in Plant Science* 17, 22-31.
- Kemen, E., Gardiner, A., Schultz-Larsen, T., Kemen, A.C., Balmuth, A.L., Robert-Seilantantz, A., Bailey, K., Holub, E., Studholme, D.J., Maclean, D., et al.** (2011). Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol* 9, e1001094.
- Kenton, P., Mur, L.A.J., Atzorn, R., Wasternack, C., und Draper, J.** (1999). (—) Jasmonic Acid Accumulation in Tobacco Hypersensitive Response Lesions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 74-78.
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., und De Groot, A.** (2000). Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany* 86, 441-447.
- Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., Litvinovskaya, R.P., Zavadskaya, M.I., Savel'eva, E.A., Karas, I.I., Kilchevskii, A.V., und Titova, S.N.** (1996). A method for protection of potato from phytophthorosis. In Pat Appl (BY).
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., und Mackey, D.** (2005). Two Pseudomonas syringae type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in Arabidopsis. *Cell* 121, 749-759.
- Kim, T.W., Guan, S., Burlingame, A.L., und Wang, Z.Y.** (2011). The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Mol Cell* 43, 561-571.

- Kim, T.W., Guan, S., Sun, Y., Deng, Z., Tang, W., Shang, J.X., Burlingame, A.L., und Wang, Z.Y.** (2009). Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nat Cell Biol* *11*, 1254-1260.
- Kim, T.W., Michniewicz, M., Bergmann, D.C., und Wang, Z.Y.** (2012). Brassinosteroid regulates stomatal development by GSK3-mediated inhibition of a MAPK pathway. *Nature* *482*, 419-422.
- Kim, T.W., und Wang, Z.Y.** (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* *61*, 681-704.
- 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*, 167-171.
- Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., und Denby, K.J.** (2005). Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* *44*, 25-36.
- Koch, A., Krug, K., Pengelley, S., Macek, B., und Hauf, S.** (2011). Mitotic substrates of the kinase aurora with roles in chromatin regulation identified through quantitative phosphoproteomics of fission yeast. *Sci Signal* *4*, rs6.
- Korableva, N.P., Platonova, T.A., Dogonadze, M.Z., und Bibick, N.D.** (1999). A stability change of potato to premature germination and diseases under the brassinosteroid action. In *Regulators of plant growth and development 5* (Moskau: Agricultural Academy), pp. 102–103.
- Kutschera, U., und Wang, Z.-Y.** (2012). Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of Experimental Botany* *63*, 3511-3522.
- Lachowiec, J., Mason, G.A., Schultz, K., und Queitsch, C.** (2018). Redundancy, Feedback, and Robustness in the Arabidopsis thaliana BZR/BEH Gene Family. *Front Genet* *9*, 523.
- Ladwig, F., Dahlke, R.I., Stuhrwohldt, N., Hartmann, J., Harter, K., und Sauter, M.** (2015). Phytosulfokine Regulates Growth in Arabidopsis through a Response Module at the Plasma Membrane That Includes CYCLIC NUCLEOTIDE-GATED CHANNEL17, H⁺-ATPase, and BAK1. *Plant Cell* *27*, 1718-1729.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lampard, G.R., Macalister, C.A., und Bergmann, D.C.** (2008). Arabidopsis stomatal initiation is controlled by MAPK-mediated regulation of the bHLH SPEECHLESS. *Science* *322*, 1113-1116.
- Lau, O.S., Davies, K.A., Chang, J., Adrian, J., Rowe, M.H., Ballenger, C.E., und Bergmann, D.C.** (2014). Direct roles of SPEECHLESS in the specification of stomatal self-renewing cells. *Science* *345*, 1605-1609.
- Lawton, K.A., Potter, S.L., Uknes, S., und Ryals, J.** (1994). Acquired Resistance Signal Transduction in Arabidopsis Is Ethylene Independent. *The Plant Cell Online* *6*, 581-588.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., und Pugin, A.** (2002). Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana glauca* cells. *Plant Cell* *14*, 2627-2641.
- Lee, E., Lucas, J.R., Goodrich, J., und Sack, F.D.** (2014a). Arabidopsis guard cell integrity involves the epigenetic stabilization of the FLP and FAMA transcription factor genes. *Plant J* *78*, 566-577.
- Lee, E., Lucas, J.R., und Sack, F.D.** (2014b). Deep functional redundancy between FAMA and FOUR LIPS in stomatal development. *Plant J* *78*, 555-565.
- Lenz, H.D., Haller, E., Melzer, E., Kober, K., Wurster, K., Stahl, M., Bassham, D.C., Vierstra, R.D., Parker, J.E., Bautor, J., et al.** (2011). Autophagy differentially

controls plant basal immunity to biotrophic and necrotrophic pathogens. *Plant J* 66, 818-830.

Lévesque, C.A., Brouwer, H., Cano, L., Hamilton, J.P., Holt, C., Huitema, E., Raffaele, S., Robideau, G.P., Thines, M., Win, J., et al. (2010). Genome sequence of the necrotrophic plant pathogen *Pythium ultimum* reveals original pathogenicity mechanisms and effector repertoire. *Genome Biol* 11, R73.

Li, J., and Chory, J. (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90, 929-938.

Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., McMorris, T.C., and Chory, J. (1996). A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272, 398-401.

Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E., and Walker, J.C. (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 213-222.

Li, L., Yu, X., Thompson, A., Guo, M., Yoshida, S., Asami, T., Chory, J., and Yin, Y. (2009). *Arabidopsis* MYB30 is a direct target of BES1 and cooperates with BES1 to regulate brassinosteroid-induced gene expression. *Plant J* 58, 275-286.

Li, Q.F., and He, J.X. (2016). BZR1 Interacts with HY5 to Mediate Brassinosteroid- and Light-Regulated Cotyledon Opening in *Arabidopsis* in Darkness. *Mol Plant* 9, 113-125.

Li, Q.F., Lu, J., Yu, J.W., Zhang, C.Q., He, J.X., and Liu, Q.Q. (2018). The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochim Biophys Acta* 1861, 561-571.

Lindeberg, M., Cunnac, S., and Collmer, A. (2012). *Pseudomonas syringae* type III effector repertoires: last words in endless arguments. *Trends Microbiol* 20, 199-208.

Link, A.J., Eng, J., Schieltz, D.M., Carmack, E., Mize, G.J., Morris, D.R., Garvik, B.M., and Yates, J.R. (1999). Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 17, 676-682.

Liu, J., Elmore, J.M., Lin, Z.-J.D., and Coker, G. (2011). A Receptor-like Cytoplasmic Kinase Phosphorylates the Host Target RIN4, Leading to the Activation of a Plant Innate Immune Receptor. *Cell Host & Microbe* 9, 137-146.

Liu, L., Sonbol, F.M., Huot, B., Gu, Y., Withers, J., Mwimba, M., Yao, J., He, S.Y., and Dong, X. (2016). Salicylic acid receptors activate jasmonic acid signalling through a non-canonical pathway to promote effector-triggered immunity. *Nature communications* 7, 13099.

Liu, Z., Bos, J.I.B., Armstrong, M., Whisson, S.C., da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., Win, J., Avrova, A.O., Wright, F., Birch, P.R.J., et al. (2005). Patterns of Diversifying Selection in the Phytotoxin-like *scr74* Gene Family of *Phytophthora infestans*. *Molecular Biology and Evolution* 22, 659-672.

Lokossou, A.A., Park, T.H., van Arkel, G., Arens, M., Ruyter-Spira, C., Morales, J., Whisson, S.C., Birch, P.R., Visser, R.G., Jacobsen, E., et al. (2009). Exploiting knowledge of R/Avr genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 630-641.

Lorenzo, O., Chico, J.M., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2004). JASMONATE-INSENSITIVE1 Encodes a MYC Transcription Factor Essential to Discriminate between Different Jasmonate-Regulated Defense Responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 16, 1938-1950.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell Online* 15, 165-178.

- Lozano-Duran, R., Macho, A.P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I.E., und Zipfel, C.** (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* 2, e00983.
- Luo, X.M., Lin, W.H., Zhu, S., Zhu, J.Y., Sun, Y., Fan, X.Y., Cheng, M., Hao, Y., Oh, E., Tian, M., et al.** (2010). Integration of light- and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in Arabidopsis. *Dev Cell* 19, 872-883.
- Luo, Y., Caldwell, K.S., Wroblewski, T., Wright, M.E., und Michelmore, R.W.** (2009). Proteolysis of a negative regulator of innate immunity is dependent on resistance genes in tomato and *Nicotiana benthamiana* and induced by multiple bacterial effectors. *Plant Cell* 21, 2458-2472.
- MacAlister, C.A., Ohashi-Ito, K., und Bergmann, D.C.** (2007). Transcription factor control of asymmetric cell divisions that establish the stomatal lineage. *Nature* 445, 537-540.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A., und Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* 108, 743-754.
- Malinovsky, F.G., Batoux, M., Schwessinger, B., Youn, J.H., Stransfeld, L., Win, J., Kim, S.K., und Zipfel, C.** (2014). Antagonistic regulation of growth and immunity by the Arabidopsis basic helix-loop-helix transcription factor homolog of brassinosteroid enhanced expression2 interacting with increased leaf inclination1 binding bHLH1. *Plant Physiol* 164, 1443-1455.
- Mansfield, J.W.** (2009). From bacterial avirulence genes to effector functions via the hrp delivery system: an overview of 25 years of progress in our understanding of plant innate immunity. *Mol Plant Pathol* 10, 721-734.
- Marti, M., Good, R.T., Rug, M., Knuepfer, E., und Cowman, A.F.** (2004). Targeting malaria virulence and remodeling proteins to the host erythrocyte. *Science* 306, 1930-1933.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J., und Sessa, G.** (2003). Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol* 54, 23-61.
- Maselli, G.A., Slamovits, C.H., Bianchi, J.I., Vilarrasa-Blasi, J., Cano-Delgado, A.I., und Mora-Garcia, S.** (2014). Revisiting the evolutionary history and roles of protein phosphatases with Kelch-like domains in plants. *Plant Physiol* 164, 1527-1541.
- Matos, J.L., Lau, O.S., Hachez, C., Cruz-Ramirez, A., Scheres, B., und Bergmann, D.C.** (2014). Irreversible fate commitment in the Arabidopsis stomatal lineage requires a FAMA and RETINOBLASTOMA-RELATED module. *eLife* 3.
- McGrath, K.C., Dombrecht, B., Manners, J.M., Schenk, P.M., Edgar, C.I., Maclean, D.J., Scheible, W.-R., Udvardi, M.K., und Kazan, K.** (2005). Repressor- and Activator-Type Ethylene Response Factors Functioning in Jasmonate Signaling and Disease Resistance Identified via a Genome-Wide Screen of Arabidopsis Transcription Factor Gene Expression. *Plant Physiology* 139, 949-959.
- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., und He, S.Y.** (2006). Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126, 969-980.
- Memelink, J.** (2009). Regulation of gene expression by jasmonate hormones. *Phytochemistry* 70, 1560-1570.
- Meng, X., Chen, X., Mang, H., Liu, C., Yu, X., Gao, X., Torii, K.U., He, P., und Shan, L.** (2015). Differential Function of Arabidopsis SERK Family Receptor-like Kinases in Stomatal Patterning. *Curr Biol* 25, 2361-2372.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., und Michelmore, R.W.** (2003). Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in Arabidopsis. *Plant Cell* 15, 809-834.

- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., und Mittler, R.** (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 33, 453-467.
- Mishina, T.E., und Zeier, J.** (2007). Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in Arabidopsis. *The Plant Journal* 50, 500-513.
- Mithöfer, A., Ebel, J., und Felle, H.H.** (2005). Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 983-990.
- 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, 705-713.
- Moore, I., Samalova, M., und Kurup, S.** (2006). Transactivated and chemically inducible gene expression in plants. *Plant J* 45, 651-683.
- Moore, J.W., Loake, G.J., und Spoel, S.H.** (2011). Transcription Dynamics in Plant Immunity. *The Plant Cell Online* 23, 2809-2820.
- Mora-Garcia, S., Vert, G., Yin, Y., Cano-Delgado, A., Cheong, H., und Chory, J.** (2004). Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes Dev* 18, 448-460.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., und Klessig, D.F.** (2010). NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum* 138, 372-383.
- Mouchel, C.F., Osmont, K.S., und Hardtke, C.S.** (2006). BRX mediates feedback between brassinosteroid levels and auxin signalling in root growth. *Nature* 443, 458-461.
- Mundy, J., Nielsen, H.B., und Brodersen, P.** (2006). Crosstalk. *Trends in Plant Science* 11, 63-64.
- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., und Prats, E.** (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany* 59, 501-520.
- Mussig, C., Fischer, S., und Altmann, T.** (2002). Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol* 129, 1241-1251.
- Muto, H., Yabe, N., Asami, T., Hasunuma, K., und Yamamoto, K.T.** (2004). Overexpression of constitutive differential growth 1 gene, which encodes a RLCKVII-subfamily protein kinase, causes abnormal differential and elongation growth after organ differentiation in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136, 3124-3133.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischnig, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A., und Glazebrook, J.** (2007). Arabidopsis Cytochrome P450 Monooxygenase 71A13 Catalyzes the Conversion of Indole-3-Acetaldoxime in Camalexin Synthesis. *The Plant Cell Online* 19, 2039-2052.
- Nakashita, H., Yasuda, M., Nitta, T., Asami, T., Fujioka, S., Arai, Y., Sekimata, K., Takatsuto, S., Yamaguchi, I., und Yoshida, S.** (2003). Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant J* 33, 887-898.
- Nam, K.H., und Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110, 203-212.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N.P., und Jones, J.D.G.** (2008). DELLAs Control Plant Immune Responses by Modulating the Balance of Jasmonic Acid and Salicylic Acid Signaling. *Current Biology* 18, 650-655.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., und Jones, J.D.G.** (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* 312, 436-439.

- Nawrath, C., und Métraux, J.-P.** (1999). Salicylic Acid Induction–Deficient Mutants of Arabidopsis Express PR-2 and PR-5 and Accumulate High Levels of Camalexin after Pathogen Inoculation. *The Plant Cell Online* *11*, 1393-1404.
- Nemhauser, J.L., und Chory, J.** (2004). BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. *J Exp Bot* *55*, 265-270.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., und Chory, J.** (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* *126*, 467-475.
- Norris, S.R., Meyer, S.E., und Callis, J.** (1993). The intron of Arabidopsis thaliana polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Mol Biol* *21*, 895-906.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H., und Boller, T.** (2000). Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6. *J Biol Chem* *275*, 7521-7526.
- Nürnberger, T., Wirtz, W., Nennstiel, D., Hahlbrock, K., Jabs, T., Zimmermann, S., und Scheel, D.** (1997). Signal perception and intracellular signal transduction in plant pathogen defense. *Journal of receptor and signal transduction research* *17*, 127-136.
- Ohashi-Ito, K., und Bergmann, D.C.** (2006). Arabidopsis FAMA controls the final proliferation/differentiation switch during stomatal development. *Plant Cell* *18*, 2493-2505.
- Orsomando, G., Lorenzi, M., Raffaelli, N., Dalla Rizza, M., Mezzetti, B., und Ruggieri, S.** (2001). Phytotoxic Protein PcF, Purification, Characterization, and cDNA Sequencing of a Novel Hydroxyproline-containing Factor Secreted by the Strawberry Pathogen *Phytophthora cactorum*. *Journal of Biological Chemistry* *276*, 21578-21584.
- Park, J.H., Halitschke, R., Kim, H.B., Baldwin, I.T., Feldmann, K.A., und Feyereisen, R.** (2002). A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J* *31*, 1-12.
- Peck, S.C., Nuhse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F., und Boller, T.** (2001). Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell* *13*, 1467-1475.
- Pedras, M.S.C., Yaya, E.E., und Glawischnig, E.** (2011). The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: Chemistry and biology. *Natural Product Reports* *28*, 1381-1405.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Métraux, 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. *The Plant Cell Online* *8*, 2309-2323.
- Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., et al.** (2000). Arabidopsis map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* *103*, 1111-1120.
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., und Van Wees, S.C.M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* *5*, 308-316.
- Pillitteri, L.J., Sloan, D.B., Bogenschutz, N.L., und Torii, K.U.** (2007). Termination of asymmetric cell division and differentiation of stomata. *Nature* *445*, 501-505.
- Poppenberger, B., Rozhon, W., Khan, M., Husar, S., Adam, G., Luschnig, C., Fujioka, S., und Sieberer, T.** (2011). CESTA, a positive regulator of brassinosteroid biosynthesis. *EMBO J* *30*, 1149-1161.

- Postel, S., Kufner, I., Beuter, C., Mazzotta, S., Schwedt, A., Borlotti, A., Halter, T., Kemmerling, B., und Nürnberger, T.** (2010). The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *Eur J Cell Biol* 89, 169-174.
- Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J., und Memelink, J.** (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology* 147, 1347-1357.
- Pshenichnaya, L.A., Khripach, V.A., Volynetz, A.P., Prokhorchik, R.A., Manzhelesova, N.E., und Morozik, G.V.** (1997). Brassinosteroids and resistance of barley plants to leaf diseases. In Parfenov VI: Problems of experimental botany (Minsk: Byelorussian Science), pp. 210-217.
- Qiu, J.L., Zhou, L., Yun, B.W., Nielsen, H.B., Fiil, B.K., Petersen, K., Mackinlay, J., Loake, G.J., Mundy, J., und Morris, P.C.** (2008). Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol* 148, 212-222.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., Kufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Lubracki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., et al.** (2006). Phytotoxicity and Innate Immune Responses Induced by Nep1-Like Proteins. *The Plant Cell Online* 18, 3721-3744.
- Rehmany, A.P., Gordon, A., Rose, L.E., Allen, R.L., Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Kamoun, S., Tyler, B.M., Birch, P.R., und Beynon, J.L.** (2005). Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two Arabidopsis lines. *Plant Cell* 17, 1839-1850.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., und Jones, J.D.G.** (2011a). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49, 317-343.
- Robert-Seilaniantz, A., MacLean, D., Jikumaru, Y., Hill, L., Yamaguchi, S., Kamiya, Y., und Jones, J.D.G.** (2011b). The microRNA miR393 re-directs secondary metabolite biosynthesis away from camalexin and towards glucosinolates. *The Plant Journal* 67, 218-231.
- Roddick, J.G., und Guan, M.** (1991). Brassinosteroids and Root Development (Washington, DC: Am. Chem. Soc.).
- Roetschi, A., Si-Ammour, A., Belbahri, L., Mauch, F., und Mauch-Mani, B.** (2001). Characterization of an Arabidopsis-Phytophthora Pathosystem: resistance requires a functional PAD2 gene and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *The Plant Journal* 28, 293-305.
- Rooney, H.C.E., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G., und de Wit, P.J.G.M.** (2005). Cladosporium Avr2 Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* 308, 1783-1786.
- Rose, J.K., Ham, K.S., Darvill, A.G., und Albersheim, P.** (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *Plant Cell* 14, 1329-1345.
- Rosebrock, T.R., Zeng, L., Brady, J.J., Abramovitch, R.B., Xiao, F., und Martin, G.B.** (2007). A bacterial E3 ubiquitin ligase targets a host protein kinase to disrupt plant immunity. *Nature* 448, 370-374.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovskiy, F.G., Tor, M., de Vries, S., und Zipfel, C.** (2011). The arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic pathogens. *Plant Cell* 23, 2440-2455.

- Rowe, H.C., Walley, J.W., Corwin, J., Chan, E.K.F., Dehesh, K., und Kliebenstein, D.J.** (2010). Deficiencies in Jasmonate-Mediated Plant Defense Reveal Quantitative Variation in *Botrytis cinerea* Pathogenesis. *PLoS Pathog* 6, e1000861.
- Rozhon, W., Mayerhofer, J., Petutschnig, E., Fujioka, S., und Jonak, C.** (2010). ASKtheta, a group-III Arabidopsis GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant J* 62, 215-223.
- Rubartelli, A., und Lotze, M.T.** (2007). Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends in immunology* 28, 429-436.
- Russo, I., Babbitt, S., Muralidharan, V., Butler, T., Oksman, A., und Goldberg, D.E.** (2010). Plasmepsin V licenses Plasmodium proteins for export into the host erythrocyte. *Nature* 463, 632-636.
- Ryals, J., Uknes, S., und Ward, E.** (1994). Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* 104, 1109-1112.
- Ryu, H., Kim, K., Cho, H., Park, J., Choe, S., und Hwang, I.** (2007). Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19, 2749-2762.
- Sachs, T.** (1991). *Pattern Formation in Plant Tissues* (New York: Cambridge University Press).
- Sambrook, J.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Santiago, J., Henzler, C., und Hothorn, M.** (2013). Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science* 341, 889-892.
- Sato, M., Tsuda, K., Wang, L., Coller, J., Watanabe, Y., Glazebrook, J., und Katagiri, F.** (2010). Network Modeling Reveals Prevalent Negative Regulatory Relationships between Signaling Sectors in Arabidopsis Immune Signaling. *PLoS Pathog* 6, e1001011.
- Saunders, D.G., Breen, S., Win, J., Schornack, S., Hein, I., Bozkurt, T.O., Champouret, N., Vleeshouwers, V.G., Birch, P.R., Gilroy, E.M., et al.** (2012). Host Protein BSL1 Associates with Phytophthora infestans RXLR Effector AVR2 and the Solanum demissum Immune Receptor R2 to Mediate Disease Resistance. *Plant Cell*.
- Savary, S., Nelson, A., Sparks, A.H., Willocquet, L., Duveiller, E., Mahuku, G., Forbes, G., Garrett, K.A., Hodson, D., Padgham, J., et al.** (2011). International agricultural research tackling the effects of global and climate changes on plant diseases in the developing world. *Plant Disease* 95, 1204-1216.
- Savel'eva, E.A., Karas, I.I., Kilchevskii, A.V., Titova, S.N., Khripach, V.A., Zhabinskii, V.N., Litvinovskaya, R.P., und Zavadskaya, M.I.** (1999). New properties of natural brassinosteroids. Method of potato protection from phytophthorosis. In *Regulators of plant growth and development*, V.S. Shevelucha, G.I. Karlov, N.P. Karsunkina, E.I. Salnikova, I.V. Skorobogatova, und A.G. Siusheva, eds. (Moskau: Agricultural Academy), p. 247.
- Schiermeier, Q.** (2001). Russia needs help to fend off potato famine, researchers warn. *Nature* 410, 1011.
- Schlaeppli, K., Abou-Mansour, E., Buchala, A., und Mauch, F.** (2010). Disease resistance of Arabidopsis to Phytophthora brassicae is established by the sequential action of indole glucosinolates and camalexin. *The Plant Journal* 62, 840-851.
- Schornack, S., Huitema, E., Cano, L.M., Bozkurt, T.O., Oliva, R., Van Damme, M., Schwizer, S., Raffaele, S., Chaparro-Garcia, A., Farrer, R., et al.** (2009). Ten things to know about oomycete effectors. *Mol Plant Pathol* 10, 795-803.

- Schorneck, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S., und Huitema, E.** (2010). Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 17421-17426.
- Senchou, V., Weide, R., Carrasco, A., Bouyssou, H., Pont-Lezica, R., Govers, F., und Canut, H.** (2004). High affinity recognition of a<i>Phytophthora</i> protein by<i>Arabidopsis</i> via an RGD motif. *Cellular and Molecular Life Sciences* *61*, 502-509.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., und van der Hoorn, R.A.L.** (2008). Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *The Plant Cell Online* *20*, 1169-1183.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B., und Sheen, J.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* *4*, 17-27.
- Shan, W., Cao, M., Leung, D., und Tyler, B.M.** (2004). The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps1b. *Mol Plant Microbe Interact* *17*, 394-403.
- Shapiro, A.D., und Zhang, C.** (2001). The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* *127*, 1089-1101.
- Shattock, R.C.** (2002). *Phytophthora infestans*: populations, pathogenicity and phenylamides. *Pest management science* *58*, 944-950.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., und Lamb, C.** (1997). Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *The Plant Cell Online* *9*, 261-270.
- Shiu, S.-H., und Bleecker, A.B.** (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, Function, and Signaling. *Sci STKE* *2001*, re22-.
- Smart, C.D., und Fry, W.E.** (2001). Invasions by the Late Blight Pathogen: Renewed Sex and Enhanced Fitness. *Biological Invasions* *3*, 235-243.
- Sohn, K.H., Lei, R., Nemri, A., und Jones, J.D.** (2007). The downy mildew effector proteins ATR1 and ATR13 promote disease susceptibility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *19*, 4077-4090.
- Song, J., Win, J., Tian, M., Schornack, S., Kaschani, F., Ilyas, M., van der Hoorn, R.A., und Kamoun, S.** (2009a). Apoplastic effectors secreted by two unrelated eukaryotic plant pathogens target the tomato defense protease Rcr3. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1654-1659.
- Song, L., Zhou, X.Y., Li, L., Xue, L.J., Yang, X., und Xue, H.W.** (2009b). Genome-wide analysis revealed the complex regulatory network of brassinosteroid effects in photomorphogenesis. *Mol Plant* *2*, 755-772.
- Song, S., Huang, H., Gao, H., Wang, J., Wu, D., Liu, X., Yang, S., Zhai, Q., Li, C., Qi, T., et al.** (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *26*, 263-279.
- Spoel, S.H., Johnson, J.S., und Dong, X.** (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 18842-18847.
- Staal, J., Kaliff, M., Bohman, S., und Dixelius, C.** (2006). Transgressive segregation reveals two *Arabidopsis* TIR-NB-LRR resistance genes effective against *Leptosphaeria maculans*, causal agent of blackleg disease. *The Plant Journal* *46*, 218-230.

- Sun, Y., Fan, X.Y., Cao, D.M., Tang, W., He, K., Zhu, J.Y., He, J.X., Bai, M.Y., Zhu, S., Oh, E., et al.** (2010). Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Dev Cell* *19*, 765-777.
- Sun, Y., Han, Z., Tang, J., Hu, Z., Chai, C., Zhou, B., und Chai, J.** (2013). Structure reveals that BAK1 as a co-receptor recognizes the BRI1-bound brassinolide. *Cell Res* *23*, 1326-1329.
- Szekeress, M., Nemeth, K., Koncz-Kalman, Z., Mathur, J., Kauschmann, A., Altmann, T., Redei, G.P., Nagy, F., Schell, J., und Koncz, C.** (1996). Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in *Arabidopsis*. *Cell* *85*, 171-182.
- Tang, J., Han, Z., Sun, Y., Zhang, H., Gong, X., und Chai, J.** (2015). Structural basis for recognition of an endogenous peptide by the plant receptor kinase PEPR1. *Cell Res* *25*, 110-120.
- Tang, W., Deng, Z., und Wang, Z.Y.** (2010). Proteomics shed light on the brassinosteroid signaling mechanisms. *Curr Opin Plant Biol* *13*, 27-33.
- Tang, W., Kim, T.W., Osés-Prieto, J.A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A.L., und Wang, Z.Y.** (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* *321*, 557-560.
- Tang, W., Yuan, M., Wang, R., Yang, Y., Wang, C., Osés-Prieto, J.A., Kim, T.W., Zhou, H.W., Deng, Z., Gampala, S.S., et al.** (2011). PP2A activates brassinosteroid-responsive gene expression and plant growth by dephosphorylating BZR1. *Nat Cell Biol* *13*, 124-131.
- Terry-Lorenzo, R.T., Roadcap, D.W., Otsuka, T., Blanpied, T.A., Zamorano, P.L., Garner, C.C., Shenolikar, S., und Ehlers, M.D.** (2005). Neurabin/protein phosphatase-1 complex regulates dendritic spine morphogenesis and maturation. *Molecular biology of the cell* *16*, 2349-2362.
- The Angiosperm Phylogeny, G.** (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* *161*, 105-121.
- 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*, 163-171.
- Tian, M., Huitema, E., Da Cunha, L., Torto-Alalibo, T., und Kamoun, S.** (2004). A Kazal-like extracellular serine protease inhibitor from *Phytophthora infestans* targets the tomato pathogenesis-related protease P69B. *J Biol Chem* *279*, 26370-26377.
- Tian, M., Win, J., Savory, E., Burkhardt, A., Held, M., Brandizzi, F., und Day, B.** (2011). 454 Genome sequencing of *Pseudoperonospora cubensis* reveals effector proteins with a QXLR translocation motif. *Mol Plant Microbe Interact* *24*, 543-553.
- Tian, M., Win, J., Song, J., van der Hoorn, R., van der Knaap, E., und Kamoun, S.** (2007). A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplastic protease. *Plant Physiol* *143*, 364-377.
- Tian, Y., Fan, M., Qin, Z., Lv, H., Wang, M., Zhang, Z., Zhou, W., Zhao, N., Li, X., Han, C., et al.** (2018). Hydrogen peroxide positively regulates brassinosteroid signaling through oxidation of the BRASSINAZOLE-RESISTANT1 transcription factor. *Nature communications* *9*, 1063.
- Tierens, K.F.M.J., Thomma, B.P.H.J., Bari, R.P., Garmier, M., Eggermont, K., Brouwer, M., Penninckx, I.A.M.A., Broekaert, W.F., und Cammue, B.P.A.** (2002). *Esal*, an *Arabidopsis* mutant with enhanced susceptibility to a range of necrotrophic fungal pathogens, shows a distorted induction of defense responses by reactive oxygen generating compounds. *The Plant Journal* *29*, 131-140.

- Tomczynska, I., Stumpe, M., und Mauch, F.** (2018). A conserved RxLR effector interacts with host RABA-type GTPases to inhibit vesicle-mediated secretion of antimicrobial proteins. *Plant J* 95, 187-203.
- Ton, J., Flors, V., und Mauch-Mani, B.** (2009). The multifaceted role of ABA in disease resistance. *Trends in Plant Science* 14, 310-317.
- Torres, M.A.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiologia Plantarum* 138, 414-429.
- Trusch, F., Loebach, L., Wawra, S., Durward, E., Wuensch, A., Iberahim, N.A., de Bruijn, I., MacKenzie, K., Willems, A., Toloczko, A., et al.** (2018). Cell entry of a host-targeting protein of oomycetes requires gp96. *Nature communications* 9, 2347.
- Tsuda, K., und Katagiri, F.** (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 459-465.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J., und Katagiri, F.** (2009). Network properties of robust immunity in plants. *PLoS Genet* 5, e1000772.
- Turnbull, D., Wang, H., Breen, S., Malec, M., Naqvi, S., Yang, L., Welsh, L., Hemsley, P., Zhendong, T., Brunner, F., et al.** (2019). AVR2 Targets BSL Family Members, Which Act as Susceptibility Factors to Suppress Host Immunity. *Plant Physiol* 180, 571-581.
- Turnbull, D., Yang, L., Naqvi, S., Breen, S., Welsh, L., Stephens, J., Morris, J., Boevink, P.C., Hedley, P.E., Zhan, J., et al.** (2017). RXLR Effector AVR2 Up-Regulates a Brassinosteroid-Responsive bHLH Transcription Factor to Suppress Immunity. *174*, 356-369.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., et al.** (2006). Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313, 1261-1266.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., und Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 4, 645-656.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N., und Ishida, I.** (1997). The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 1029-1034.
- Unterholzner, S.J., Rozhon, W., Papacek, M., Ciomas, J., Lange, T., Kugler, K.G., Mayer, K.F., Sieberer, T., und Poppenberger, B.** (2015). Brassinosteroids Are Master Regulators of Gibberellin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 27, 2261-2272.
- Van Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M., und Van Kan, J.A.L.** (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of Arabidopsis with three Botrytis species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology* 8, 41-54.
- Van der Biezen, E.A., und Jones, J.D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* 23, 454-456.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J., und Linthorst, H.J.M.** (2006a). Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends in Plant Science* 11, 184-191.
- van Loon, L.C., Rep, M., und Pieterse, C.M.J.** (2006b). Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annual Review of Phytopathology* 44, 135-162.
- van Poppel, P.M., Guo, J., van de Vondervoort, P.J., Jung, M.W., Birch, P.R., Whisson, S.C., und Govers, F.** (2008). The Phytophthora infestans avirulence gene Avr4 encodes an RXLR-dEER effector. *Mol Plant Microbe Interact* 21, 1460-1470.

- van Verk, M.C., Gatz, C., und Linthorst, H.J.M.** (2009). Chapter 10 Transcriptional Regulation of Plant Defense Responses. In *Advances in Botanical Research* (Academic Press), pp. 397-438.
- van Wees, S.C.M., Chang, H.-S., Zhu, T., und Glazebrook, J.** (2003). Characterization of the Early Response of Arabidopsis to *Alternaria brassicicola* Infection Using Expression Profiling. *Plant Physiology* 132, 606-617.
- Veit, S., Worle, J.M., Nürnberger, T., Koch, W., und Seitz, H.U.** (2001). A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, Arabidopsis, and tobacco. *Plant Physiol* 127, 832-841.
- Verberne, M.C., Hoekstra, J., Bol, J.F., und Linthorst, H.J.M.** (2003). Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *The Plant Journal* 35, 27-32.
- Vert, G., und Chory, J.** (2006). Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441, 96-100.
- Vert, G., Nemhauser, J.L., Geldner, N., Hong, F., und Chory, J.** (2005). Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 177-201.
- Vleeshouwers, V.G., Raffaele, S., Vossen, J.H., Champouret, N., Oliva, R., Segretin, M.E., Rietman, H., Cano, L.M., Lokossou, A., Kessel, G., et al.** (2011). Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors. *Annu Rev Phytopathol* 49, 507-531.
- Vleeshouwers, V.G., Rietman, H., Krenek, P., Champouret, N., Young, C., Oh, S.K., Wang, M., Bouwmeester, K., Vosman, B., Visser, R.G., et al.** (2008). Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One* 3, e2875.
- Vleeshouwers, V.G.A.A., Driesprong, J.-D., Kamphuis, L.G., Torto-Alalibo, T., Van'T Slot, K.A.E., Govers, F., Visser, R.G.F., Jacobsen, E., und Kamoun, S.** (2006). Agroinfection-based high-throughput screening reveals specific recognition of INF elicitors in *Solanum*. *Molecular Plant Pathology* 7, 499-510.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.M.A., und Klessig, D.F.** (2009). Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease. *Annual Review of Phytopathology* 47, 177-206.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., und Baulcombe, D.** (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33, 949-956.
- von Dahl, C.C., und Baldwin, I.T.** (2007). Deciphering the role of ethylene in plant-herbivore interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 26, 201 - 209.
- Vriet, C., Russinova, E., und Reuzeau, C.** (2012). Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* 24, 842-857.
- Walters, D.R., und McRoberts, N.** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends in Plant Science* 11, 581-586.
- Wan, W.L., Zhang, L., Pruitt, R., Zaidem, M., Brugman, R., Ma, X., Krol, E., Perraki, A., Kilian, J., Grossmann, G., et al.** (2019). Comparing Arabidopsis receptor kinase and receptor protein-mediated immune signaling reveals BIK1-dependent differences. *New Phytol* 221, 2080-2095.
- Wang, C., Shang, J.X., Chen, Q.X., Osés-Prieto, J.A., Bai, M.Y., Yang, Y., Yuan, M., Zhang, Y.L., Mu, C.C., Deng, Z., et al.** (2013). Identification of BZR1-interacting proteins as potential components of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis through tandem affinity purification. *Mol Cell Proteomics* 12, 3653-3665.

- Wang, D., Pajerowska-Mukhtar, K., Culler, A.H., und Dong, X.** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* 17, 1784-1790.
- Wang, J., Li, H., Han, Z., Zhang, H., Wang, T., Lin, G., Chang, J., Yang, W., und Chai, J.** (2015). Allosteric receptor activation by the plant peptide hormone phytosulfokine. *Nature* 525, 265-268.
- Wang, X., und Chory, J.** (2006). Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science* 313, 1118-1122.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M.B., Huber, S.C., und Clouse, S.D.** (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* 15, 220-235.
- Wang, X., Li, X., Meisenhelder, J., Hunter, T., Yoshida, S., Asami, T., und Chory, J.** (2005). Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Dev Cell* 8, 855-865.
- Wang, Y., Li, J., Hou, S., Wang, X., Li, Y., Ren, D., Chen, S., Tang, X., und Zhou, J.M.** (2010). A *Pseudomonas syringae* ADP-ribosyltransferase inhibits Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases. *Plant Cell* 22, 2033-2044.
- Wang, Z.-Y.** (2012). Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 7-8.
- Wang, Z.Y., Nakano, T., Gendron, J., He, J., Chen, M., Vafeados, D., Yang, Y., Fujioka, S., Yoshida, S., Asami, T., et al.** (2002). Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2, 505-513.
- 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, 380-383.
- Wanke, D., Hohenstatt, M.L., Dynowski, M., Bloss, U., Hecker, A., Elgass, K., Hummel, S., Hahn, A., Caesar, K., Schleifenbaum, F., et al.** (2011). Alanine zipper-like coiled-coil domains are necessary for homotypic dimerization of plant GAGA-factors in the nucleus and nucleolus. *PLoS One* 6, e16070.
- Wawra, S., Trusch, F., Matena, A., Apostolakis, K., Linne, U., Zhukov, I., Stanek, J., Kozminski, W., Davidson, I., Secombes, C.J., et al.** (2017). The RxLR Motif of the Host Targeting Effector AVR3a of *Phytophthora infestans* Is Cleaved before Secretion. *Plant Cell* 29, 1184-1195.
- 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, 1937-1951.
- Westwood, J.H., Yoder, J.I., Timko, M.P., und dePamphilis, C.W.** (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci* 15, 227-235.
- Wewer, V., Dombrink, I., vom Dorp, K., und Dormann, P.** (2011). Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Lipid Res* 52, 1039-1054.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., et al.** (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature* 450, 115-118.
- Wiermer, M., Feys, B.J., und Parker, J.E.** (2005). Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 383-389.

- Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., und Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* *414*, 562-565.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., und Hancock, J.T.** (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* *31*, 622-631.
- Win, J., Morgan, W., Bos, J., Krasileva, K.V., Cano, L.M., Chaparro-Garcia, A., Ammar, R., Staskawicz, B.J., und Kamoun, S.** (2007). Adaptive Evolution Has Targeted the C-Terminal Domain of the RXLR Effectors of Plant Pathogenic Oomycetes. *The Plant Cell Online* *19*, 2349-2369.
- Xia, X.J., Wang, Y.J., Zhou, Y.H., Tao, Y., Mao, W.H., Shi, K., Asami, T., Chen, Z., und Yu, J.Q.** (2009). Reactive oxygen species are involved in brassinosteroid-induced stress tolerance in cucumber. *Plant Physiol* *150*, 801-814.
- Xia, X.J., Zhou, Y.H., Ding, J., Shi, K., Asami, T., Chen, Z., und Yu, J.Q.** (2011). Induction of systemic stress tolerance by brassinosteroid in *Cucumis sativus*. *New Phytol* *191*, 706-720.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., et al.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* *18*, 74-80.
- Yaeno, T., Li, H., Chaparro-Garcia, A., Schornack, S., Koshiba, S., Watanabe, S., Kigawa, T., Kamoun, S., und Shirasu, K.** (2011). Phosphatidylinositol monophosphate-binding interface in the oomycete RXLR effector AVR3a is required for its stability in host cells to modulate plant immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 14682-14687.
- Yan, Y., Kolomiets, M., und Valenzuela Baez, R.** (2013). Jasmonate Biosynthesis, Perception and Function in Plant Development and Stress Responses. In *Lipid Metabolism* (InTech).
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S., et al.** (2008). Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* *20*, 1678-1692.
- 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*, 249-259.
- Yin, Y., Wang, Z.Y., Mora-Garcia, S., Li, J., Yoshida, S., Asami, T., und Chory, J.** (2002). BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* *109*, 181-191.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H., und Sheen, J.** (2007). *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nature protocols* *2*, 1565-1572.
- You, I.S., Ghosal, D., und Gunsalus, I.C.** (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 3'-flanking region. *Biochemistry* *30*, 1635-1641.
- Yu, X., Li, L., Zola, J., Aluru, M., Ye, H., Foudree, A., Guo, H., Anderson, S., Aluru, S., Liu, P., et al.** (2011). A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* *65*, 634-646.
- Zeng, W., und He, S.Y.** (2010). A prominent role of the flagellin receptor FLAGELLIN-SENSING2 in mediating stomatal response to *Pseudomonas syringae* pv tomato DC3000 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* *153*, 1188-1198.
- Zhang, A., Zhang, J., Ye, N., Cao, J., Tan, M., und Jiang, M.** (2010). ZmMPK5 is required for the NADPH oxidase-mediated self-propagation of apoplastic H₂O₂ in

- brassinosteroid-induced antioxidant defence in leaves of maize. *J Exp Bot* *61*, 4399-4411.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al.** (2007). A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell host & microbe* *1*, 175-185.
- Zhang, X., Zhu, Z., An, F., Hao, D., Li, P., Song, J., Yi, C., and Guo, H.** (2014). Jasmonate-activated MYC2 represses ETHYLENE INSENSITIVE3 activity to antagonize ethylene-promoted apical hook formation in Arabidopsis. *Plant Cell* *26*, 1105-1117.
- Zhang, Y., Xu, W., Li, Z., Deng, X.W., Wu, W., and Xue, Y.** (2008). F-box protein DOR functions as a novel inhibitory factor for abscisic acid-induced stomatal closure under drought stress in Arabidopsis. *Plant Physiol* *148*, 2121-2133.
- Zhao, J., Peng, P., Schmitz, R.J., Decker, A.D., Tax, F.E., and Li, J.** (2002). Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol* *130*, 1221-1229.
- Zhao, J., Williams, C.C., and Last, R.L.** (1998). Induction of Arabidopsis Tryptophan Pathway Enzymes and Camalexin by Amino Acid Starvation, Oxidative Stress, and an Abiotic Elicitor. *The Plant Cell Online* *10*, 359-370.
- Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J.** (1999). Arabidopsis PAD3, a Gene Required for Camalexin Biosynthesis, Encodes a Putative Cytochrome P450 Monooxygenase. *The Plant Cell Online* *11*, 2419-2428.
- Zhu, J.Y., Li, Y., Cao, D.M., Yang, H., Oh, E., Bi, Y., Zhu, S., and Wang, Z.Y.** (2017). The F-box Protein KIB1 Mediates Brassinosteroid-Induced Inactivation and Degradation of GSK3-like Kinases in Arabidopsis. *Mol Cell* *66*, 648-657 e644.
- Zipfel, C.** (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* *20*, 10-16.

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Primer mit Sequenz und Schmelztemperatur T_m .

Primer	Sequenz (5'-3')	T_m °C
Avr2_for	CCCGAATTCCTGCATGCAGCTCCAGGTGC	67
Avr2_rev	CCCGCGGCCGCTTAACTCCTCTTGTCAACC	70
attB1	GGGGACAACCTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	60
attB2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	63
Bsu_attB1_for	AAAAAGCAGGCTttATGGCTCCTGATCAATCTTATCAATATCC	65
Bsu_attB2_rev	AGAAAGCTGGGTtTTATTCACTTGACTCCCCCTCGAGC	67
Bsl1_attB1_for	AAAAAGCAGGCTcaATGGGCTCGAAGCCTTGGCTACATCC	70
Bsl1_attB2_rev	AGAAAGCTGGGTTTCAGATGTATGCAAGCGAGC	64
Bsl2_attB1_for	AAAAAGCAGGCTTAATGGATGAAGATTCTGTCTATGG	62
Bsl2_attB2_rev	AGAAAGCTGGGTTTCACATCCAAGCCAGAGAACC	66
Bsl3_attB1_for	AAAAAGCAGGCTATATGGATTTGGATTCTTCAATGG	61
Bsl3_attB2_rev	AGAAAGCTGGGTTTTATATCCAAGCAAGAGAGCC	63
Bsu1_int_for	GCGATGGATAGATTGGCAGAGGCA	59
Bsu1_int_rev	GCAGTTCTCACCAAGCCACCTCG	61
Bsl1_int_for	CGCACGACCTCCTTCAGGCTCT	60
Bsl1_int_rev	TGGCGAGCTGGCATCAGAGG	58
Bsl2_int_for	TGCTGAAACTGGTGGCGCCTT	56
Bsl2_int_rev	ACTGCCGTGGAACAGGAGGC	58
Bsl3_int_for	GCTGCAGAAACAGGTGGAGCCT	59
Bsl3_int_rev	TGGAGGCTTCCACCCCCGAG	60
BSL3 K_for	AAAAAGCAGGCTCCAAAAACAATGGGCACGTATTCGGTKGTGRATGC	79
BSL3 K_rev	AGAAAGCTGGGTCTTATCTTCCAGGTGAACGGCCA	68
BSL3 P_for	AAAAAGCAGGCTCCAAAAACAATGGGCTCAATCAATAGTGTTCGGAAA	67
BSL3 P_rev	AGAAAGCTGGGTCTTATATCCAAGCAAGAGAGCCGC	67
BSL3 D709A for	ATTAAGATATTTGGTGCTTTGCAT	49
BSL3 D709A rev	ATGCAAAGCACCAATATCTTAAT	49
BSL3 H776A for	CACCTGATTTCGTGGAAATGCTGAAGCTGCCGAC	67
BSL3 H776A rev	GTCGGCAGCTTCAGCATTTCACGAATCAGGTG	67
bsu1-2 LP	TCAACAAAGGGTCCACAACCTC	52
bsu1-2 RP	TGTCCACTTCCTGGTCAAAAC	52
bsl1-1 LP	TGATTAAATCTTGTCCACGCC	51
bsl1-1 RP	GCTTCATCCGAGAGCTGTATG	54
bsl1-2 LP	AGAGTCTCTCACCTGTGCCAC	56
bsl1-2 RP	AGCGAAAACGCCTTTTCTATC	51
bsl2-1 LP	ATTCCACAGCCAATACTGTGC	52
bsl2-1 RP	TGTTGTAAACAAGCCTCGAGG	52
bsl2-2 LP	GGGGTTTGGACTCTTTTGAAC	52
bsl2-2 RP	GAACCTTCAAAGCAAGGAAGG	52
bsl2-3 LP	GAAAAAGGATCGGACTTGGAG	52

Anhang

bsl2-3 RP	ACCGAATACGTAGGTGCACAC	54
bsl2-4 LP	CAGGATCGTGAGTTTCAGAGC	54
bsl2-4 RP	TAACTACCATGGTCCCCACTG	54
bsl2-5 LP	ACCTTCCAGGTAATCGACCTG	54
bsl2-5 RP	TTGAATGGTTGATTGAGGAGC	50
bsl2-6 LP	TGGGTGTTCTTTTCTCTGCAG	52
bsl2-6 RP	TTGACTAAATCTCACGGTCCC	52
bsl3-1 LP	CTGGTGAAGTTTCAGGTGAGG	54
bsl3-1 RP	TAATGCACTTTTTGGTTTCCG	49
bsl3-3 LP	ATTTATCGACCGACCAATTCC	50
bsl3-3 RP	TCAATTTGAAAATGAGGGACG	49
bsl3-4 LP	CAAACATTTGAAAGGTACGATG	52
bsl3-4 RP	AAAACATACGAATGCCAGCAC	50
bsl3-5 LP	TCCATTGAGAAGAATGATGCAG	51
bsl3-5 RP	TCCATTAGCTGATGTATGGGC	52
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	59
Sai1LB	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACC	55
qSAUR-AC for	TGAGGAGTTTCTTGGGTGCT	58
qSAUR-AC rev	AAGTATGAAACCGGCACCAC	58
qSAUR-65 for	TGCCCTCAAGAGGAAAAGAA	58
qSAUR-65 rev	TCAACCGTGTAACCACGAA	58
qRT-CPD-F1	TTGCTCAACTCAAGGAAGAG	58
qRT-CPD-R1	TGATGTTAGCCACTCGTAGC	58
qRT-DWF4-F1	CATAAAGCTCTTCAGTCACGA	58
qRT-DWF4-R1	CGTCTGTTCTTTGTTTCCTAA	58
qKIN1 for	GCAAAGCTGAGGAGAAGAGC	58
qKIN1 rev	CCGCATCCGATACACTCTTT	58
qRT_BAS1_for	GGAGAAAAATCTACGGTGCTACATTTCTG	58
qRT_BAS1_rev	TAGTCCATCGCCTTCAAGTTGTTTAACC	58
qAct_for	AGTGGTCGTACAACCGGTATTGT	58
qAct_rev	GAGGAAGAGCATACCCCTCGTA	58
qFRK1_for	ATCTTCGCTTGGAGCTTCTC	58
qFRK1_rev	TGCAGCGCAAGGACTAGAG	58
RT_GVG for	cgctactctcccaaaacc	50
RT_GVG rev	TCATATCCTGCATACAACACC	50
MYCtagfor	CTAGTATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGA	66
MYCtagrev	CTAGTCAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCATA	66
p2KozMYCGW7_for1	GCGGCCGCACTAGTaaacaATGgccGAACAAAACTTATTTCTGAA	64
p2KozMYCGW7_rev1	TTCAGAAATAAGTTTTTGTTCggcCATtgttACTAGTGCGGCCGC	63
HAtagrev complementary:	CTAGTAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTACATACTAGT	68
HAtagrev:	ACTAGTATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTACTAG	68
Myctagrev complementary:	CTAGTCAGATCTTCTTCAGAAATAAGTTTTTGTTCATA	67
Myctagrev:	TATGGAACAAAACTTATTTCTGAAGAAGATCTGACTAG	68
Koz_HA_for	GCGGCCGCACTAGTaaacaATGgccTACCCATACGATGTTT	60
Koz_HA_rev	GAACATCGTATGGGGTAggcCATtgttACTAGTGCGGCCGC	66

M13 uni	AGGGTTTTCCCAGTCACGACGTT	57
M13 rev	GAGCGGATAACAATTCACACAGG	56
efl α -s	TCACATCAACATTGTGGTCATTGG	54
efl α -as	TTGATCTGGTCAAGAGCCTCAAG	55
pDONR-for	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	59
pDONR-rev	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	52

7.2 Alignmet der Phosphatasedomänen aller bekannten Kelch-phosphatasen aus *Arabidopsis* und den Solanaceae

```

AtBSL1 SPQGLHKKVIAALLRPRNWKPPGNRKFLLDSYEVGELCYAAEQIFMHEPTVLQKAPIKVFGDLHGQFGD
AtBSL2 SINSVPKKVIAHLKPRGWKPPVRRQFFLDCNEIADLDCSAERIFASEPTVLQKAPIKIFGDLHGQFGD
AtBSL3 SINSVPKKVIAHLKPRGWKPPVRRQFFLDCNEIADLDCSAERIFASSEPTVLQKAPIKIFGDLHGQFGD
AtBSU1 STQDLHKKVISTLLRPKTWTPPANRDFFTSYLEVKKLCCDEVEKIFMNEPTLLQLKVPKVFVDLHGQYGD
NbBSL1 SPQGLHKKIISTLLRPRNWKAPVNRKFFLDSYEVGELCYAAEQIFMHEPTVLQKAPKVFVDLHGQFGD
StBSL1 SPQGLHKKIISTLLRPRNWKAPVNRKFFLDSYEVGELCYAAEQIFMHEPTVLQKAPKVFVDLHGQFGD
StBSL2 SINSVPKKVITHLKPRGWKPPVRRQFFLDCNEIADLDCSAERIFASEPSVILQKAPIKIFGDLHGQFGD
SlBSL1 SPQGLHKKIISTLLRPRNWKAPVNRKFFLDSYEVGELCYAAEQIFMHEPTVLQKAPKVFVDLHGQFGD
SlBSL2 SVNSVPKKVIAHLKPRGWKPPVRRQFFLDCNEIADLDCSAERIFASSEPSVILQKAPIKIFGDLHGQFGD

AtBSL1 LMLRFDEYGFSPSTAGDITYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKIEYFENVHLIRGNHEAADINALFG
AtBSL2 LMLRFDEYGFSPSTAGDISYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKVEYQHNVHLIRGNHEAADINALFG
AtBSL3 LMLRFDEYGFSPSTAGDISYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKVEYQHNVHLIRGNHEAADINALFG
AtBSU1 LMLRFHEYGHPSVEGDITHIDYFLGDYVDRGQHSLETITMLLFALKIEYFKNIHLIRGNHESLANNRIYGD
NbBSL1 LMLRFDEYGFSPSTAGDITYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKIEYFENVHLIRGNHEAADINALFG
StBSL1 LMLRFDEYGFSPSTAGDITYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKIEYFENVHLIRGNHEAADINALFG
StBSL2 LMLRFDEYGFSPSTAGDISYIDYFLGDYVDRGQHSLETITMLLLALKVEYPLNVHLIRGNHEAADINALFG
SlBSL1 LMLRFDEYGFSPSTAGDITYIDYFLGDYVDRGQHSLETITLLALKIEYFDNVHLIRGNHEAADINALFG
SlBSL2 LMLRFDEYGFSPSTAGDIAYIDYFLGDYVDRGQHSLETITMLLLALKVEYFHNVHLIRGNHEAADINALFG

AtBSL1 FRIECIERMGEVDGIWAWTRFNQLFNYPPLAALIEKKIICMHGGIGRSISTVEQIEKIERPITMDAGSIV
AtBSL2 FRIECIERMGERDGIWVWHRINRNFNWLPLAALIEKKIICMHGGIGRSINHVEQIENIQRPITMEAGSIV
AtBSL3 FRIECIERMGERDGIWVWHRINRNFNWLPLAALIEKKIICMHGGIGRSINHVEQIENIQRPITMEAGSIV
AtBSU1 FLTECEERMGESYGFPAWLKINQVFDYPLAALIEKKIICMHGGIGRAVITIEIENIERPAFPDGTGSMLV
NbBSL1 FRIECIERMGEVDGIWAWTRFNQLFNYPPLAALIEKKIICMHGGIGRSINSVEQIEKIERPITMDAGSIV
StBSL1 FRIECIERMGEVDGIWAWTRFNQLFNYPPLAALIEKKIICMHGGIGRSINSVEQIEKIERPITMDAGSIV
StBSL2 FRIECIERMGERDGIWAWHRFNRFNWLPLAALIEKKIICMHGGIGRSINHVEQIENIQRPITMDAGSIV
SlBSL1 FRIECIERMGEVDGIWAWTRFNQLFNYPPLAALIEKKIICMHGGIGRSINSVEQIEKIERPITMDAGSII
SlBSL2 FRIECIERMGERDGIWAWHRINRNFNWLPLAALIEKKIICMHGGIGRSINHVEQIENIQRPITMEAGSII

AtBSL1 LMDLLWSDPTENDSIEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVTEFCKRNKQLIIRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
AtBSL2 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVMEFCNNNDLQLIVRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
AtBSL3 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVMEFCNNNDLQLIVRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
AtBSU1 KDILWSDPTMNDTVLGIVDNARGE
NbBSL1 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVTEFCKRNKQLIIRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
StBSL1 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVTEFCKRNKQLIIRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
StBSL2 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVMEFCNNNDLQLIVRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
SlBSL1 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVTEFCKRNKQLIIRAHECVMDGFERFAOGLLITLF
SlBSL2 LMDLLWSDPTENDSVEGLRPNARGPGLVTFGPDVRVMEFCNNNDLQLIVRAHECVMDGFERFAOGLLITLF

AtBSL1 SATNYCGTANNAGAILVVGRLVIVPKLIHPLPEPILSPENSPEHSGDAMMQELNIQRPPPTTRGR
AtBSL2 SATNYCGTANNAGAILVLRDLVVVVKLIHPLPAISSPETSPEHIEDTWMQELNANRPPTTRGR
AtBSL3 SATNYCGTANNAGAILVLRDLVVVVKLIHPLPAISSPETSPEHIEDTWMQELNANRPPTTRGR
AtBSU1
NbBSL1 SATNYCGTANNAGAILVVGRLVIVPKLIHPLPEPILSPETSPEHSGDAMMQELNIQRPPPTTRGR
StBSL1 SATNYCGTANNAGAILVLRDLVVVVKLIHPLPEPILSPETSPEHIEDTWMQELNANRPPTTRGR
StBSL2 SATNYCGTANNAGAILVLRDLVVVVKLIHPLPAISSPETSPEHIEDTWMQELNANRPPTTRGR
SlBSL1 SATNYCGTANNAGAILVVGRLVIVPKLIHPLPEPILSPETSPEHIEDTWMQELNIQRPPPTTRGR
SlBSL2 SATNYCGTANNAGAILVLRDLVVVVKLIHPLPAISSPENSPEHIEDTWMQELNANRPPTTRGR

```

Abbildung 47: Phylogenetischer Vergleich der Verwandtschaft der BSU1-Familie aus *Arabidopsis* und Solanaceae-Arten

Alignment der Phosphatasedomänen aller bekannter Proteine der BSU1-Familie von At= *Arabidopsis thaliana*; St = *Solanum tuberosum*, Kartoffel; Sl = *Solanum lycopersicum*, Tomate; Nb = *Nicotiana benthamiana*, Tabak. BSL1 Sequenzen von 522 bis 869 AS; AtBSL2: 658 bis 1005 AS; AtBSL3: 647 bis 994; AtBSU1: 448 bis 681; StBSL2: 640 bis 986 AS. Die Sequenzen wurden mittels eines ClustalV-Algorithmus mit MegAlign (DNASar Version 10.0.1) ausgerichtet. Gleiche AS sind schwarz hinterlegt.

7.3 Der Phänotyp der GFP-PiAVR2-Überexpressionslinien ist abhängig von der Lichtintensität

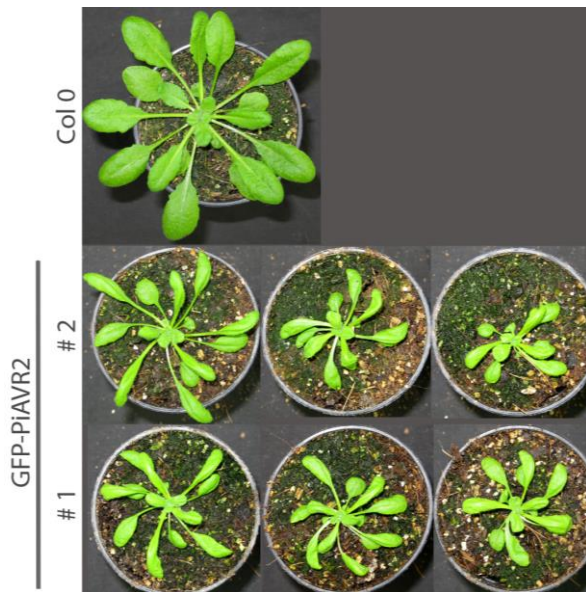


Abbildung 48: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Kurztag

Je 12 Pflanzen von zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und Col-0 wurden 4 Wochen auf Erde im Kurztag kultiviert. Gezeigt sind je drei typische Exemplare, die die Spannweite des Phänotypes verdeutlichen.



Abbildung 49: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Langtag

Je 12 Pflanzen von zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und Col-0 wurden 4 Wochen auf Erde im Langtag kultiviert. Gezeigt sind je drei typische Exemplare, die die Spannweite des Phänotypes verdeutlichen.

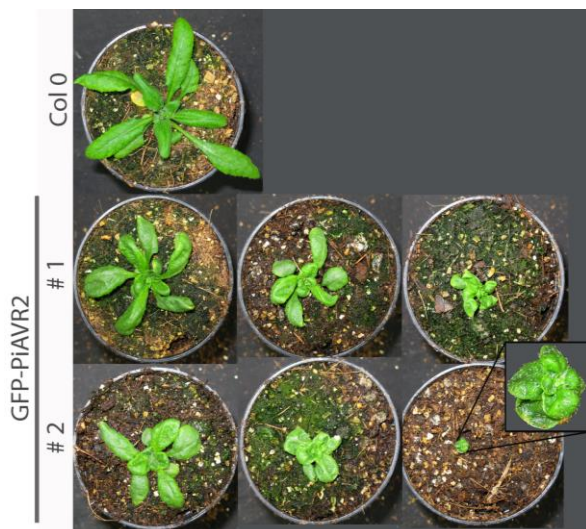


Abbildung 50: Phänotyp der GFP-PiAVR2-Linien im Dauerlicht

Je 12 Pflanzen von zwei *GFP-PiAVR2*-Linien und Col-0 wurden 4 Wochen auf Erde im Langtag kultiviert. Gezeigt sind je drei typische Exemplare, die die Spannweite des Phänotypes verdeutlichen.

8 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.

Darmstadt, den 14.10.2019

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre: Mein Dank gilt zunächst ganz besonders Herrn Dr. Frederic Brunner, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, die freundliche Hilfe und die mannigfache Ideengebung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Nürnberger für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung als Erstgutachter.

Ferner danke ich Malou Fraiture, Birgit Löffelhardt und Nina Jaspert für Ihre andauernde Unterstützung und Ihre gute Freundschaft. Ihr habt sehr viel Freude und Lachen in meine Tage gebracht. Mein Dank gilt auch den vielen Kollegen am ZMBP, die mich nicht nur wissenschaftlich unterstützt haben, sondern auch motiviert haben und zum Teil gute Freunde geworden sind. Es hat sehr viel Freude gemacht in solch einem guten Team zu Arbeiten.

Ich möchte auch meiner Familie für Ihre immerwährende Unterstützung danken, nicht nur während dieser Arbeit, sondern jederzeit.

Ich danke Eleanor Gilroy für das zur Verfügung stellen eines Vektors mit der PiAVR2-Sequenz (PITG_22870) aus *Phytophthora infestans*. Ich möchte mich des Weiteren bei Mirita Franz für die LC-Tandem-Massenspektroskopie Untersuchungen bedanken und bei Georg Felix (ZMBP) für die Bereitstellung von synthetisch hergestelltem flg22-Peptid. Die Transformation der Zellkultur-Protoplasten wurde freundlicherweise von Catarina Brancato (zentrale Einrichtung, ZMBP) durchgeführt. Bei der *in silico*-Analyse der PiAVR2-Sequenz hat mich Nadine Wagener (ZMBP) tatkräftig unterstützt. Ich danke Mark Stahl (ZMBP) für die Bestimmung der endogenen Hormon-Level in Protoplasten und Überexpressionslinien. Die Aufarbeitung der Proben und die Analyse mittels Gaschromatographie (GC)-Massenspektrometrie (MS) wurde freundlicherweise von Karl Wurster (ZMBP) durchgeführt.

Das BZR2-GFP Konstrukt für die Transformation in Protoplasten wurde freundlicherweise von Sacco de Vries (Wageningen, NL) zur Verfügung gestellt. Für die Immundetektion von endogenem BZR2 wurde freundlicherweise von Yanhai Yin (Ames, IA, USA) ein BZR2-spezifischer Antikörper zur Verfügung gestellt. Und unsere Taq-Polymerase wurde freundlicherweise zu Verfügung gestellt von Nina Jaspert.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund für seine unermüdliche Motivation, Unterstützung und so vieles mehr. Ohne dich hätte ich diese Arbeit nicht beendet.