

**DIE ROLLE AUTOPHAGIE-ASSOZIIERTER  
PROTEINE IN DER PFLANZLICHEN  
IMMUNANTWORT**

der Fakultät für Biologie

der **EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN**

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

von

HEIKE DORIS LENZ

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

vorgelegte

**DISSERTATION**

2011



Tag der mündlichen Prüfung:	14.10.2010
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thorsten Nürnberger
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Klaus Harter



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Pathogenabwehr und die angeborene Immunität der Pflanzen .....	1
1.2	Zelltodmechanismen in Pflanzen .....	4
1.3	Abbauwege und Formen der Autophagie .....	6
1.4	Autophagie in Eukaryoten: Vergleich zwischen Hefe, Mensch und Pflanze.....	10
1.5	Autophagie-assoziierte Gene und deren Funktion.....	12
1.6	Ziel der Arbeit.....	16
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>17</b>
2.1	Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und Isotope .....	17
2.2	Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen.....	17
2.3	Nährmedien und Antibiotika .....	18
2.4	Verwendete Vektoren .....	19
<b>2.5</b>	<b>Anzuchtbedingungen der Mikroorganismen</b> .....	<b>20</b>
2.5.1	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.5.2	Anzucht von <i>Pichia pastoris</i> .....	20
2.5.3	Anzucht von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> .....	20
2.5.4	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	21
2.5.5	Anzucht von <i>Alternaria brassicicola</i> und <i>Botrytis cinerea</i> .....	21
<b>2.6</b>	<b>Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen</b> .....	<b>21</b>
2.6.1	Verwendete <i>Arabidopsis thaliana</i> Linien .....	21
2.6.2	Anzuchtbedingungen .....	22
2.6.3	<i>Arabidopsis</i> Zellkulturbedingungen und Protoplastierung .....	22
2.6.4	Transiente Transformation von <i>Arabidopsis</i> Protoplasten .....	22
2.6.5	Stabile Transformation von <i>Arabidopsis</i> Pflanzen mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	23
<b>2.7</b>	<b>Molekularbiologische Techniken</b> .....	<b>24</b>
2.7.1	Allgemeine molekularbiologische Methoden .....	24
2.7.1.1	Agarosegelelektrophorese.....	24
2.7.1.2	DNA-Analyse über Sequenzierung.....	24
2.7.1.3	DNA-Analyse über Restriktionsenzyme .....	24
2.7.1.4	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen .....	24
2.7.1.5	Allgemeine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	25
2.7.1.6	PCR zur Amplifikation langer Fragmente .....	25
2.7.1.7	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Produkten.....	26
2.7.2	Klonierung von DNA .....	26
2.7.2.1	Klonierung mit Hilfe der Gateway™-Technologie.....	26
2.7.2.2	Traditionelle Klonierung - Dephosphorylierung .....	28
2.7.2.3	Ligation .....	28
2.7.2.4	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	28
2.7.2.5	Transformation von <i>E. coli</i> .....	29
2.7.2.6	Verwendete Oligonukleotide.....	29
2.7.2.7	Ansetzen von Glycerinkulturen .....	29

2.7.3	DNA-Präparationen .....	30
2.7.3.1	Isolation von DNA aus Bakterien.....	30
2.7.3.2	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen .....	30
2.7.4	DNA-Analytik .....	30
2.7.4.1	Genotypisierung von Transfer-DNA (T-DNA) Insertionslinien.....	30
2.7.4.2	„Gene silencing“ durch amiRNA-Linien und RNAi-Linien.....	31
2.7.4.3	Radioaktive Markierung von Nukleinsäurefragmenten.....	32
2.7.4.4	DNA-Hybridisierung (Southern Blot).....	33
2.7.5	RNA-Analytik .....	33
2.7.5.1	Isolierung von RNA aus Pflanzen.....	33
2.7.5.2	Ermittlung der Transkriptmenge mittels semiquantitativer RT-PCR.....	34
<b>2.8</b>	<b>Proteinanalytik .....</b>	<b>34</b>
2.8.1	Überexpression von Proteinen .....	34
2.8.2	Proteinextraktion.....	35
2.8.3	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	36
2.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	36
2.8.5	Detektion von Proteinen durch Coomassie-Färbung .....	36
2.8.6	Western-Blot Analyse zur Proteindetektion.....	36
2.8.7	Kinase-Aktivitätstest .....	37
<b>2.9</b>	<b>Phänotypische Analysen an <i>Arabidopsis</i>-Pflanzen .....</b>	<b>37</b>
2.9.1	Messung der Blattgröße .....	37
2.9.2	Seneszenzbestimmungen .....	38
2.9.3	Messung der Stomataöffnungen .....	38
2.9.4	Infiltrationsexperimente in Blätter und Keimlinge .....	38
2.9.5	Analyse des Bakterienwachstums <i>in planta</i> .....	38
2.9.6	Analyse der Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen .....	39
2.9.6.1	Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	39
2.9.6.2	Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	39
2.9.6.3	Infektion mit <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> .....	40
2.9.7	Ionenausstrahlungsmessungen .....	40
2.9.8	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies durch DAB-Färbung .....	40
2.9.9	Trypanblaufärbung zur Bestimmung toter Zellen .....	41
2.9.10	Kallose-Ablagerungen .....	41
2.9.11	Hormon- und Camalexinmessungen.....	41
2.9.12	Konfokale Laserscanning Mikroskopie.....	42
2.9.13	Statistik .....	43
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Auswahl Autophagie-assoziiierter Gene in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>3.2</b>	<b>Analyse der T-DNA-Insertionslinien .....</b>	<b>46</b>
3.2.1	Genotypisierung.....	47
3.2.2	Transkriptanalyse .....	48
3.2.3	Auswertung der Mikroarraydaten nach bakterieller Infektion und PAMP-Behandlung .....	49
<b>3.3</b>	<b>Phänotypische Analysen der Autophagiegene <i>ATG5</i>, <i>ATG7</i>, <i>ATG10</i> und <i>ATG18a</i> .....</b>	<b>51</b>
3.3.1	Blattgrößen und Frischgewichte .....	51
3.3.2	Seneszenz .....	53
3.3.3	Entwicklungsphänotypen.....	55
3.3.4	Analyse der Autophagiemutanten auf spontanen Zelltod und ROS-Produktion .....	55
<b>3.4</b>	<b>Lokalisation von <i>ATG5</i>, <i>ATG7</i>, <i>ATG10</i> und <i>ATG18a</i> .....</b>	<b>56</b>
3.4.1	Protoplastensystem .....	56
3.4.2	Stabile Transformationen .....	57
<b>3.5</b>	<b>Experimente zur Visualisierung von Autophagosomen .....</b>	<b>58</b>

<b>3.6</b>	<b>Einfluss der Autophagie-Mutationen auf Infektion mit nekrotrophen Pathogenen .....</b>	<b>61</b>
3.6.1	Infektionen mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	62
3.6.2	Infektionen mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	64
3.6.2.1	Bonitur, Chlorophyllgehalt und Läsionsdurchmesser .....	64
3.6.2.2	Trypanblaufärbung als Zelltodindikator .....	65
3.6.2.3	DAB-Färbung als ROS-Nachweis .....	66
<b>3.7</b>	<b>Toxinbehandlung: Fumonisin B1 und NLP<sub>Pp</sub> .....</b>	<b>69</b>
3.7.1	Behandlung mit Fumonisin B1 .....	69
3.7.2	Behandlung mit NLP <sub>Pp</sub> .....	71
<b>3.8</b>	<b>Einfluss der Autophagie-Mutationen auf Infektion mit biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen .....</b>	<b>72</b>
3.8.1	Infektionen mit <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> .....	72
3.8.2	Infektionen mit <i>Pseudomonas syringae</i> .....	76
3.8.2.1	Bakterielle Wachstumskurven .....	76
3.8.2.2	Ionenleitfähigkeitsmessungen .....	81
3.8.2.3	Trypanblaufärbung als Zelltodindikator .....	82
3.8.2.4	Zelltodentwicklung nach <i>Pto</i> avrRpm1-Infektion .....	84
<b>3.9</b>	<b>Analyse von Immunitäts-assoziierten Abwehrreaktionen in <i>atg</i>-Mutanten .....</b>	<b>86</b>
3.9.1	Markergenexpressionen nach Infektion mit <i>Pto</i> DC3000 .....	86
3.9.2	Markergenexpressionen nach PAMP-Behandlung .....	87
3.9.3	Stomata-Assay .....	88
3.9.4	Kallose-Assay .....	89
3.9.5	MAP-Kinase-Assay .....	91
3.9.6	Ethylenbestimmung .....	92
3.9.7	Hormon- und Camalexinmessungen .....	93
<b>3.10</b>	<b>Charakterisierung von <i>ATG1c</i> .....</b>	<b>95</b>
3.10.1	Lokalisation von <i>ATG1c</i> .....	96
3.10.2	Überexpressionsversuche und <i>in vitro</i> Kinase Assay .....	96
3.10.3	Herstellung einer RNAi-Linie und einer amiRNA-Linie .....	97
3.10.4	Phänotypische Analysen an <i>amiRNA-atg1</i> Pflanzen .....	98
3.10.4.1	Beobachtungen zur Seneszenz .....	98
3.10.4.2	Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	99
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Entwicklungsphänotypische Analysen .....</b>	<b>102</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss der Autophagie-Defekte nach Infektionen mit Phytopathogenen .....</b>	<b>103</b>
4.2.1	Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch nekrotrophe Pilze .....	104
4.2.2	Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch biotrophe Oomyceten .....	108
4.2.3	Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch hemibiotrophe Bakterien .....	109
<b>4.3</b>	<b>Autophagie als Abwehrmechanismus .....</b>	<b>113</b>
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>117</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>A</b>



# Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b>	Abwehrmechanismen der Pflanze .....	3
<b>Abb. 1.2:</b>	Verschiedene Formen der Autophagie .....	9
<b>Abb. 1.3:</b>	Vereinfachte Darstellung des Autophagieprozesses mit beteiligten <i>AtATG</i> -Genen.....	13
<b>Abb. 2.1:</b>	Amplifikation langer Fragmente .....	25
<b>Abb. 2.2:</b>	Überprüfung der T-DNA Insertion über genspezifische und insertspezifische Primer .....	30
<b>Abb. 2.3:</b>	Herstellung von amiRNA-Linien über microRNAs .....	31
<b>Abb. 3.1:</b>	Genstruktur von <i>ATG5</i> , <i>ATG7</i> , <i>ATG10</i> und <i>ATG18a</i> .....	46
<b>Abb. 3.2:</b>	Genotypisierung der <i>atg</i> -Mutanten <i>atg5-1</i> , <i>atg5-2</i> , <i>atg7</i> , <i>atg10</i> und <i>atg18a-2</i> .....	48
<b>Abb. 3.3:</b>	Transkriptanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR .....	49
<b>Abb. 3.4:</b>	Blattgrößen und Frischgewichte der <i>atg</i> -Mutanten .....	52
<b>Abb. 3.5:</b>	Seneszenzassay an abgeschnittenen Blättern.....	53
<b>Abb. 3.6:</b>	Seneszenzverlauf der <i>atg</i> -Linien .....	54
<b>Abb. 3.7:</b>	Verspätete Ausbildung von Blütenständen in den <i>atg</i> -Mutanten <i>atg5-1</i> und <i>atg7</i> .....	55
<b>Abb. 3.8:</b>	DAB und Trypanblaufärbungen als Indikatoren für ROS-Produktion und Zelltod .....	56
<b>Abb. 3.9:</b>	Protoplastenlokalisierung von <i>ATG5-GFP</i> , <i>ATG7-GFP</i> , <i>ATG10-GFP</i> und <i>ATG18a-GFP</i> ..	57
<b>Abb. 3.10:</b>	Lokalisation von <i>ATG5-GFP</i> und <i>ATG10-GFP</i> in Blättern von <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	58
<b>Abb. 3.11:</b>	Lokalisation von <i>GFP-ATG8a</i> , <i>GFP-ATG8b</i> und <i>GFP-ATG8h</i> in Protoplasten.....	59
<b>Abb. 3.12:</b>	<i>GFP-ATG8</i> -Pflanzen als mögliche Markerlinien für Autophagie .....	60
<b>Abb. 3.13:</b>	Bildung vesikelähnlicher Strukturen nach Fumonisin B1-Behandlung .....	61
<b>Abb. 3.14:</b>	Infektion mit dem nekrotrophen Pilz <i>Botrytis cinerea</i> .....	63
<b>Abb. 3.15:</b>	Läsionsdurchmesser der <i>atg7</i> -KO-Linie nach Infektion mit <i>Botrytis cinerea</i> .....	64
<b>Abb. 3.16:</b>	Infektion mit dem nekrotrophen Pilz <i>Alternaria brassicicola</i> .....	65
<b>Abb. 3.17:</b>	Trypanblaufärbungen nach Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	66
<b>Abb. 3.18:</b>	Trypanblaufärbungen als Indikator für den Zelltod nach Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	67
<b>Abb. 3.19:</b>	DAB-Färbungen als Indikator für ROS-Produktion nach Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	68
<b>Abb. 3.20:</b>	Toxinbehandlung mit Fumonisin B1 aus <i>Fusarium moniliforme</i> als Zelltodverursacher ..	70
<b>Abb. 3.21:</b>	Toxinbehandlung mit <i>NLP<sub>Pp</sub></i> aus <i>Phytophthora parasitica</i> .....	71
<b>Abb. 3.22:</b>	Infektion mit dem avirulenten Stamm <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> EMWA .....	73
<b>Abb. 3.23:</b>	Infektion mit dem virulenten Stamm <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> NOCO2.....	74
<b>Abb. 3.24:</b>	Infektion mit den virulenten <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> EMWA und WACO-Stämmen.....	75
<b>Abb. 3.25:</b>	Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit dem avirulenten Pathogen <i>Pto</i> avrRpm1 .....	76
<b>Abb. 3.26:</b>	Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit der T3SS-defizienten Mutante <i>Pto</i> hrcC <sup>-</sup> .....	78
<b>Abb. 3.27:</b>	Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit dem nicht-virulenten Stamm <i>Pph</i> .....	79

<b>Abb. 3.28:</b> Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit den Coronatin defizienten Stämmen <i>Pto</i> DC3661 und <i>Pto</i> $\Delta$ cmaA/cfa6.....	80
<b>Abb. 3.29:</b> Bakterielle Wachstumskurven mit dem virulenten Pathogen <i>Pto</i> DC3000.....	81
<b>Abb. 3.30:</b> Ionenleitfähigkeitsmessungen nach <i>Pto</i> DC3000 Infektion .....	82
<b>Abb. 3.31:</b> Makroskopische und mikroskopische Analyse <i>Pto</i> DC3000-infizierter Pflanzen .....	83
<b>Abb. 3.32:</b> Chlorophyllverlust nach <i>Pto</i> DC3000-Infektion in <i>atg7</i> -KO Pflanzen.....	84
<b>Abb. 3.33:</b> Läsionsentwicklung nach Infektion mit dem avirulenten Stamm <i>Pto</i> <i>avrRpm1</i> .....	85
<b>Abb. 3.34:</b> Expression der Markergene <i>PR-1</i> und <i>FRK1</i> nach Infektion mit <i>Pto</i> DC3000 und <i>Pto</i> <i>avrRpm1</i> .....	86
<b>Abb. 3.35:</b> Expression des Markergens <i>PR-1</i> in $MgCl_2$ -behandelten Blättern.....	87
<b>Abb. 3.36:</b> Expression der Markergene <i>FRK1</i> und <i>PR-1</i> nach PAMP-Behandlung.....	88
<b>Abb. 3.37:</b> Öffnungszustand der Stomata nach PAMP-Behandlung .....	89
<b>Abb. 3.38:</b> Bildung von Kallose nach PAMP-Behandlung.....	90
<b>Abb. 3.39:</b> Aktivierung der MPK6, MPK3 und MPK4 nach PAMP-Behandlung.....	92
<b>Abb. 3.40:</b> Ethylenmessungen nach FB1- und PAMP-Behandlung.....	93
<b>Abb. 3.41:</b> Lokalisation von ATG1c-GFP im Protoplasten .....	96
<b>Abb. 3.42:</b> ATG1 Überexpression in <i>P. pastoris</i> und <i>in vitro</i> Kinaseaktivitätstest.....	97
<b>Abb. 3.43:</b> Genstruktur und Transkriptanalyse der RNAi-Linie und ami-RNA-Linie.....	98
<b>Abb. 3.44:</b> Verfrühte Seneszenz der <i>ami-atg1</i> -Linie unter Lang- und Kurztagbedingungen .....	99
<b>Abb. 3.45:</b> Infektion mit <i>Alternaria brassicicola</i> .....	99

# Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1.1:</b>	Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Eukaryoten .....	12
<b>Tab. 1.2:</b>	Übersicht der in Hefe gefundenen beteiligten Autophagiekomponenten .....	14
<b>Tab. 2.1:</b>	Verwendete Bakterienstämme .....	17
<b>Tab. 2.2:</b>	Verwendete Pilzstämmen .....	18
<b>Tab. 2.3:</b>	Verwendete Antibiotika .....	18
<b>Tab. 2.4:</b>	Verwendete Nährmedien und Stammlösungen .....	18
<b>Tab. 2.5:</b>	Verwendete Vektoren .....	19
<b>Tab. 2.6:</b>	Hauptsächlich verwendete Knock-Out-Linien und RNAi- bzw. amiRNA-Linien .....	21
<b>Tab. 2.7:</b>	Zusammensetzung des für die Autophagie-Induktion verwendeten Mangelmediums .....	23
<b>Tab. 2.8:</b>	PCR-Protokoll für die Amplifizierung langer Fragmente .....	26
<b>Tab. 2.9:</b>	Gateway-PCR-Ansätze .....	27
<b>Tab. 2.10:</b>	Pipettierschema der BP-Reaktion .....	27
<b>Tab. 2.11:</b>	Pipettierschema der LR-Reaktion .....	27
<b>Tab. 2.12:</b>	Pipettierschema eines Ligationsansatzes .....	28
<b>Tab. 2.13:</b>	Oligonukleotide für Genotypisierungen und Resttranskript (RT)-Analysen .....	29
<b>Tab. 2.14:</b>	Klonierungsstrategie zur Herstellung von amiRNA .....	31
<b>Tab. 2.15:</b>	amiRNA-PCR-Ansätze .....	32
<b>Tab. 2.16:</b>	<i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i> -Stämme und deren Virulenz .....	40
<b>Tab. 2.17:</b>	Verwendete Objektive .....	42
<b>Tab. 3.1:</b>	Mikroarray-Daten nach Behandlung mit <i>Pseudomonas</i> -Stämmen und verschiedenen PAMPs .....	50
<b>Tab. 3.2:</b>	Hormon- und Camalexindaten nach Infektion mit <i>Pto</i> DC3000 .....	94
<b>Tab. 3.3:</b>	Hormon- und Camalexindaten nach Behandlung mit dem Toxin Fumonisin B1 .....	95
<b>Tab. 7.1:</b>	Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und Genotypisierungen .....	A
<b>Tab. 7.2:</b>	T-DNA Insertionslinien .....	C

# Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung	<b>µM</b>	Mikromolar
<b>AS</b>	Aminosäure	<b>mg</b>	Milligramm
<b>ATG</b>	Autophagiegen	<b>µl</b>	Mikroliter
<b>atg</b>	Autophagie-Mutante	<b>min</b>	Minute
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat	<b>ml</b>	Milliliter
<b>Avr</b>	Avirulenzfaktor	<b>mM</b>	Millimolar
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>Nep1</b>	„necrosis and ethylene inducing peptide 1“
<b>BTH</b>	Benzothiadiazole	<b>NLP<sub>PP</sub></b>	„Nep1 like peptide“ aus <i>P. parasitica</i>
<b>bzw.</b>	beziehungsweise	<b>PAMP</b>	„Pathogen-associated molecular pattern“
<b>CC</b>	„coiled-coil“	<b>PAS</b>	Prä-autophagosomale Struktur
<b>cDNA</b>	„complementary DNA“	<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>cfu</b>	koloniebildende Einheit	<b>PE</b>	Phosphatidylethanolamin
<b>Col-0</b>	Columbia-0, Ökotyp	<b>pH</b>	Pondus Hydrogenii
<b>CVT</b>	„cytoplasm to vacuole targeting“	<b>PR</b>	„Pathogenesis-related“
<b>DAMPs</b>	„Damage-associated molecular pattern“	<b>PRR</b>	„Pattern recognition receptors“
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b><i>Psph</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure	<b>PTI</b>	„PAMP-triggered immunity“
<b>EF-Tu</b>	Elongationsfaktor-Tu	<b><i>Pto</i></b>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<b>Elf18</b>	Peptid aus <i>EF-Tu</i> mit der Sequenz SKEKFERTKPHVNVGTIG	<b>pv.</b>	Pathovar
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum	<b>PCD</b>	„programmed cell death“
<b>ET</b>	Ethylen	<b>R-Gen</b>	Resistenzgen
<b>ETI</b>	„Effector triggered immunity“	<b>RLK</b>	„Receptor-like kinase“
<b>ETS</b>	„Effector triggered susceptibility“	<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>FB1</b>	Fumonisin B1	<b>rpm</b>	Umdrehung pro Minute
<b>FG</b>	Frischgewicht	<b>RPM1</b>	Resistent zu <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola1</i>
<b>Flg22</b>	Peptid aus Flagellin mit der Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA	<b>R-Protein</b>	Resistenzprotein
<b>FLS2</b>	„Flagellin sensitive 2“	<b>RT-PCR</b>	Reverse Transkription mit anschließender PCR
<b>g</b>	Gramm	<b>SA</b>	Salicylsäure
<b>GFP</b>	Grün fluoreszierendes Protein	<b>SAR</b>	„systemic acquired resistance“
<b>h</b>	Stunde	<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>HR</b>	Hypersensitive Reaktion	<b>T</b>	Thymin
<b>hrc</b>	„hypersensitive response and conserved“	<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA
<b>INA</b>	2,6-dichloroisoinictinic acid	<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>JA</b>	Jasmonsäure	<b>T-DNA</b>	Transfer-DNA
<b>Kap.</b>	Kapitel	<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Di-(dimethylamino)ethane
<b>kb</b>	Kilobase	<b>TIR</b>	Toll und Säuger Interleukin-1-Rezeptor
<b>kDa</b>	Kilodalton	<b>TLR</b>	Toll-ähnliche Rezeptoren
<b>KO</b>	Knock-Out	<b>TOR</b>	„Target of Rapamycin“
<b>LB</b>	Luria-Bertani-Medium	<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>LRR</b>	„leucine rich repeat“	<b>U</b>	Unit
<b>M</b>	Mol/l	<b>Ub</b>	Ubiquitin
<b>MAMP</b>	„Microbe-associated molecular pattern“	<b>ün</b>	über Nacht
<b>MAPK/MPK</b>	„Mitogen-activated protein kinase“	<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>MBP</b>	„Myelin basic protein“	<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>MDC</b>	Monodansylcadaverin	<b>YNB</b>	„Yeast nitrogen base“
<b>MES</b>	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	<b>YPD</b>	Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium
<b>µg</b>	Mikrogramm	<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>µm</b>	Mikrometer		

# 1 Einleitung

## 1.1 Pathogenabwehr und die angeborene Immunität der Pflanzen

Pflanzen sind durch ihre sessile Lebensweise in besonderem Maße verschiedensten Stressfaktoren, wie Nährstoffmangel, oxidativem Stress, Trockenstress oder Pathogenbefall ausgesetzt. Ein Überleben dieser widrigen Umstände wird durch morphologische, physiologische und biochemische Reaktionen ermöglicht (Fujita et al.; 2006). Die Fähigkeit, Infektionen einer Vielzahl von Pathogenen, wie Bakterien, Pilzen, Oomyceten, Viren, Viroiden oder von Parasiten wie Insekten und Nematoden zu widerstehen, wird als Immunität bezeichnet. Permanente physikalische und chemische Barrieren der Pflanze, wie beispielsweise das Vorhandensein der wachshaltigen Kutikula oder lignin-verstärkter Zellwände, erschweren eine Verankerung und ein Eindringen der Pathogene in die Zelle (Dangl und Jones; 2001). Konstitutiv gebildete Enzyme mit antimikrobieller Wirkung bilden einen zweiten Schutzwall vor eindringenden Erregern. Werden diese Barrieren überwunden, sieht sich das Pathogen mit induzierbaren Mechanismen der angeborenen Immunität konfrontiert. Eine Antwort auf Pathogenbefall spiegelt sich dann meist in mehreren Phasen wider, die sich vermutlich ko-evolutionär aus Pathogen-Pflanzen-Interaktionen entwickelt haben.

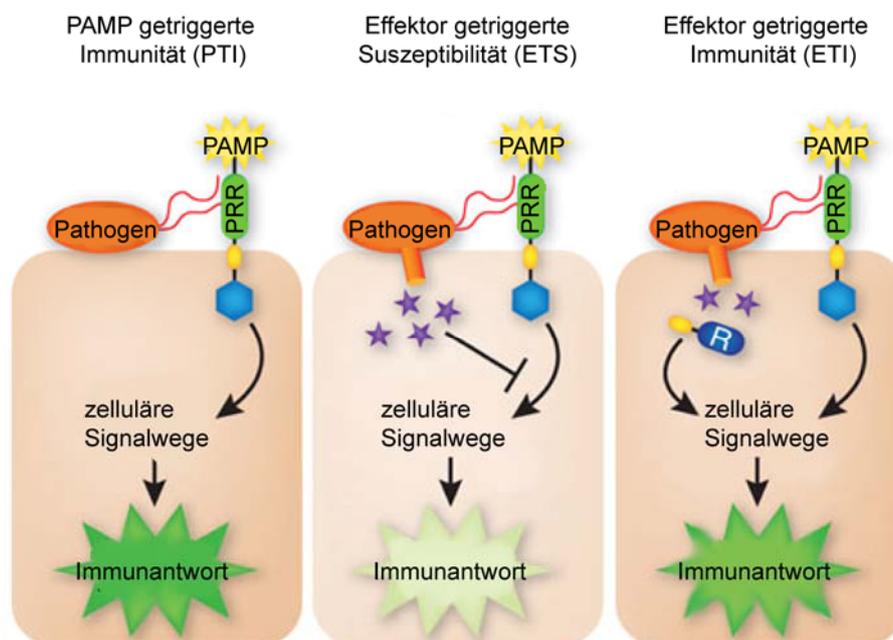
In der ersten Phase nehmen Pflanzen hochkonservierte pathogen-assoziierte Muster (PAMPs) als Fremdstrukturen wahr. PAMPs erfüllen essentielle Funktionen in der mikrobiellen Lebensweise und können durch charakteristische Epitope von pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren (PRR, „pattern recognition receptor“) erkannt werden (Nürnberger und Lipka; 2005). Lipopolysaccharide (LPS) Gram-negativer, sowie Peptidoglycane (PGN) Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien oder auch pilzliche Zellwandbestandteile wie Chitin sind Beispiele bekannter PAMPs. Die bereits am besten charakterisierten PAMPs sind Flagellin, eine strukturelle Komponente des Flagellums Gram-negativer Bakterien (Felix et al.; 1999, Kunze et al.; 2004) und der Elongationsfaktor (EF)-Tu (Kunze et al.; 2004). Der PRR FLS2 (Flagellin-sensitiv 2) erkennt ein 22 AS langes Epitop des Flagellins (Flg22) (Felix et al.; 1999, Gomez-Gomez et al.; 1999, Gomez-Gomez und Boller; 2000), wogegen EFR ein 18 AS langes Epitop des EF-Tus erkennt (Elf18) (Zipfel et al.; 2006). Beide PRRs ähneln in ihrem Aufbau den zur PAMP-Perzeption in Säugern vorhandenen Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLRs). So besitzen FLS2 und EFR wie die TLRs eine extrazelluläre leucinreiche (LRR)-Domäne zur PAMP-Erkennung (Felix et al.; 1999, Gomez-Gomez et al.; 1999, Gomez-Gomez und Boller; 2000), weisen allerdings keine TIR (Toll und Säuger Interleukin-1 Rezeptor)-Domäne auf, sondern sind über eine Transmembrandomäne direkt mit einer Kinasedomäne verbunden. Die Erkennung des

PAMPs Flg22 löst eine Internalisierung von FLS2 mit einhergehender Aktivierung von Abwehrmechanismen aus (Gomez-Gomez et al.; 2001, Robatzek et al.; 2006). Diese primäre Immunantwort wird auch als PAMP-ausgelöste Immunität (PTI) bzw. Nichtwirtsimmunität bezeichnet (Abb. 1.1). Da Elf18 und Flg22 ähnliche Änderungen in der pflanzlichen Genexpression hervorrufen, wird vermutet, dass ähnliche Signalwege der PAMP-induzierten Abwehr zugrunde liegen (Zipfel et al.; 2006). Zahlreiche pflanzliche Reaktionen sind nach Pathogenbefall festzustellen. So lässt sich ein verstärkter  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{H}^{+}$ -Einstrom und ein erhöhter  $\text{K}^{+}$  und  $\text{Cl}^{-}$ -Ausstrom an der Plasmamembran detektieren (Jabs et al.; 1997, Zimmermann et al.; 1997, Blatt et al.; 1999, Lee et al.; 2001), was zur Alkalisierung des Apoplasten führt und calciumabhängige Proteinkinasen aktiviert (Romeis et al.; 2000). Der PAMP-ausgelöste erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel löst durch Produktion von ROS den „oxidative burst“ aus (Blume et al.; 2000, Nürnberger und Scheel; 2001). Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) spielt hierbei eine bedeutende Rolle, da es zusätzlich zu Quervernetzungen von Zellwandproteinen (Bradley et al.; 1992, Brisson et al.; 1994, Lamb und Dixon; 1997) auch Membranschäden verursacht (Hammond-Kosack und Jones; 1996, Lamb und Dixon; 1997, Montillet et al.; 2005) und somit als lokaler Auslöser programmierten Zelltodes dient (Dangl et al.; 1996, Greenberg; 1996, Beers und McDowell; 2001, Greenberg und Yao; 2004). Ein weiteres bedeutendes Signalmolekül ist Stickstoffmonoxid (NO), dessen Funktion ebenso in der Beeinflussung von Ionenkanälen liegt. Auch MAPK- („mitogen activated protein kinase“) Kaskaden werden aktiviert (Nürnberger und Scheel; 2001, Zhang und Klessig; 2001, Jonak et al.; 2002, Nürnberger und Lipka; 2005), die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen und die Expression zahlreicher mit der Abwehr verbundener Gene induzieren (Navarro et al.; 2004, Zipfel et al.; 2006). Verschiedene Phytohormone dienen ebenso der pflanzlichen Abwehr und tragen zur Ausbildung verschiedener Resistenzformen bei (Durrant und Dong; 2004, Pieterse und Van Loon; 2004). Salicylsäure (SA) wird nach Infektion mit biotrophen Pathogenen vermehrt gebildet (Ryals et al.; 1996), während Jasmonsäurespiegel (JA) und Ethylengehalt (ET) vor allem nach Infektion mit nekrotrophen Pathogenen steigen. Papillenbildung durch Kalloseablagerungen (Abramovitch et al.; 2003, Hauck et al.; 2003, Jamir et al.; 2004) und Stomataschließungen (Melotto et al.; 2006) erschweren das Eindringen der Pathogene. Auch antimikrobielle Phytoalexine, wie Flavonoide, Terpenoide, Lektine, Phenylpropanoide oder Enzyminhibitoren, werden produziert (Hammerschmidt; 1999).

Pflanzen sind auch befähigt sogenannte Schaden-assoziierte Muster („Damage-associated molecular patterns“ (DAMPs)) zu erkennen und ähnliche wie oben beschriebene Signalwege auszulösen. DAMPs sind beispielsweise pflanzliche Zellwandfragmente, die durch das Wirken lytischer Enzyme des Angreifers freigesetzt werden und ein Gefahrensignal darstellen, welches in die Induktion von Abwehrmechanismen mündet (Boller und Felix;

2009). Dies stellt eine weitere Gemeinsamkeit in der Konzeption der angeborenen Immunität in Tieren und Pflanzen dar.

Wenn Pathogene befähigt sind diese oben beschriebene Basisresistenz zu überwinden, spricht man von effektorvermittelter Suszeptibilität (ETS) (Abb. 1.1), die zu Krankheitssymptomen in der Pflanze führt (Gohre und Robatzek; 2008). Die Inhibierung der PTI erfolgt durch unterschiedlichste Strategien. Einerseits können Toxine pflanzliche Abwehrmechanismen unterdrücken (Feys et al.; 1994, Mittal und Davis; 1995, Melotto et al.; 2006), andererseits können pathogeneigene Virulenzfaktoren gezielt pflanzliche Signalwege manipulieren (Mittal und Davis; 1995, Abramovitch et al.; 2006). Diese Virulenz erhöhenden Pathogenitätsfaktoren werden im Fall von Gram-negativen Bakterien über das Typ III Sekretionssystem in die Pflanze injiziert (Büttner und Bonas; 2003, Alfano und Collmer; 2004).



**Abb. 1.1: Abwehrmechanismen der Pflanze**

Pflanzen sind fähig pathogen-assoziierte Muster (PAMPs) über pathogen-responsive Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) zu erkennen, was zur Auslösung der PTI führt, die durch zahlreiche Abwehrkaskaden Immunantworten auslöst. Gelingt es den Pathogenen diese Immunantwort durch Effektormoleküle (lila Sterne) zu unterdrücken spricht man von ETS, welche in Krankheitsausbildung der Pflanze resultiert. Werden Effektormoleküle durch R-Gene erkannt kommt es zur ETI und erneut zur Auslösung zahlreicher Abwehrkaskaden (modifiziert nach Pieterse et al. (2009)).

Basierend auf Promotoranalysen wird angenommen, dass beispielsweise *P. syringae* mindestens 40 dieser Effektorproteine bilden kann (Greenberg und Vinatzer; 2003, Alfano und Collmer; 2004). So konnte z. B. für AvrRpt2 und AvrRpm1 ein inhibitorischer Effekt gegenüber Flg22-induzierter Abwehr festgestellt werden (Kim et al.; 2005). Diese Effektorproteine verlieren ihre Virulenzfunktion, wenn sie von pflanzlichen Resistenzgenen (R-Genen) erkannt werden, womit eine zweite Abwehrphase ausgelöst wird (Dangl und Jones; 2001), die als effektorvermittelte Immunität (ETI) oder als Rasse-Kultivar-spezifische-

bzw. Gen-für-Gen-Resistenz (Abb. 1.1) bezeichnet wird (Chisholm et al.; 2006, Jones und Dangl; 2006). Die meisten R-Proteine besitzen eine Nukleotidbindestelle (NBS), LRRs und entweder eine aminoterminal TIR oder CC („coiled-coil“)-Domäne, die direkt oder indirekt die Anwesenheit von Effektoren wahrnehmen (Belkhadir et al.; 2004). R-Gene die zur CC-NB-LRR-Klasse gehören sind beispielsweise RPM1 oder RPS2, Beispiele für die TIR-NB-LRR-Klasse sind in RPP5 bzw. RPS4 gegeben (Nürnberg et al.; 2004).

Ko-Evolutionen von Virulenzeffektoren und R-Genen erlauben die Bildung immer weiterer Virulenzeffektoren, die wiederum in die Bildung weiterer R-Gen-Spezifitäten resultieren und somit die Weiterentwicklung von Angriffs- und Verteidigungsstrategien der Pathogene und Pflanzen zu einem Konkurrenzwettkampf vorantreibt (Jones und Dangl; 2006). R-Gen vermittelte Resistenz wird durch eine Reihe von Abwehrkaskaden erreicht, die denen der PTI ähneln, allerdings schneller und mit höherer Intensität ablaufen und auch in hypersensitivem Zelltod (HR) resultieren, der den Pathogenbefall einschränken soll (Lam; 2004) und auf den im Folgekapitel näher eingegangen wird.

## 1.2 Zelltodmechanismen in Pflanzen

Vielzellige Organismen weisen unterschiedliche Arten an Zelltodmechanismen auf. Der nicht-physiologische Prozess der Nekrose tritt beispielsweise in Zellen auf, die schwerwiegende Verletzungen aufweisen oder wird durch mikrobielle Toxine, wie NLP<sub>PP</sub> („necrosis and ethylene inducing peptide 1 (Nep1-) like protein“), welches in vielen Bakterien, Pilzen und Oomyceten vorhanden ist (Gijzen und Nürnberg; 2006), stimuliert. Pflanzen können wenig Einfluss auf diesen degenerativen Prozess ausüben. Charakteristika sind das Anschwellen der Zelle, die Lyse und der Ausfluss von Zellbestandteilen.

Im Gegensatz dazu steht der genetisch programmierte Zelltod (PCD: „programmed cell death“), ein Energie-abhängiger physiologischer Prozess, der Signalwege auf gezielten Zellabbau ausrichtet, somit aber auch vom aktivem Wertsstoffwechsel abhängig ist (Mittler und Lam; 1997, Pennell und Lamb; 1997, Gilchrist; 1998). Der PCD ist während vielerlei Entwicklungsprozesse und auch als Strategie zur Pathogenabwehr bedeutend. Beispiele entwicklungsbedingten Zelltodes sind durch die Seneszenz, die Geschlechtsbestimmung in eingeschlechtlichen Blütenpflanzen und der Bildung des Gefäßsystems gegeben (Pennell und Lamb; 1997). PCD in Pflanzen-Pathogen-Interaktionen kann abhängig von biotropher oder nekrotropher Lebensweise des Pathogens in Resistenz oder Anfälligkeit der Pflanze münden (Greenberg; 1997), das heißt weitere Abwehrkaskaden aktivieren, aber auch die Aggressivität oder Ausbreitung mancher Pathogene fördern. Im tierischen System ist die häufigste Form des PCDs die Apoptose. Schlüsseleffektoren dieses Prozesses sind Cystein-Aspartat-spezifische Proteasen, sogenannte Caspasen (Green und Reed; 1998), von denen

in *Arabidopsis* noch keine echten Homologe identifiziert wurden, jedoch Proteine mit Caspase-ähnlichen Aktivitäten nachweisbar waren (Elbaz et al.; 2002, Lincoln et al.; 2002, del Pozo und Lam; 2003). Caspaseaktivitäten bewirken Zellverdichtungen, Schrumpfungen und die Bildung apoptotischer Körperchen (Nicholson und Thornberry; 1997). Mitochondrien sind für Zelltodmechanismen in Tieren bedeutend (Green und Reed; 1998) und können unter vielen „pro-death“-Signalen auch ROS freisetzen. Auch in Pflanzen stellt oxidativer Stress ein Stimulus zur Auslösung von Zelltod dar (Levine et al.; 1996, Mittler et al.; 1996). Pflanzen teilen manche morphologischen Charakteristika wie Zytoplasmakondensierung und Schrumpfung, während Zytoplasmafragmentierungen nicht auftreten. Auch DNA-Spaltung und Fragmentierung konnte nur in manchen Zelltypen gezeigt werden (Krishnamurthy et al.; 2000). Pflanzen besitzen auch keine Phagozyten, jedoch kann das Zytoplasma durch vakuoläre Autophagie (Kap. 1.3) abgebaut werden. Apoptose-ähnlicher Zelltod wird von verschiedenen pilzlichen Toxinen, wie Fumonisin B1 (FB1) aus *Fusarium moniliforme* oder AAL aus *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* ausgelöst (Abbas et al.; 1994). Die Verwendung dieser Toxine ermöglicht es, in pathogenfreien Modellsystemen den pflanzlichen Zelltod näher zu untersuchen. Eine besondere Form des PCDs in Pflanzen ist in der in Kap. 1.1 erwähnten HR gegeben, die nach Infektion mit avirulenten Pathogenen als besonders schneller, morphologisch sichtbarer und lokal begrenzter Zelltod sichtbar wird (Staskawicz et al.; 1995, Dangl et al.; 1996, Hammond-Kosack und Jones; 1996). Im Gegensatz zu entwicklungsbedingtem Zelltod korreliert die HR immer mit der Induktion lokaler oder systemischer Abwehrantworten („systemic acquired resistance“ (SAR)) (Heath; 2000), womit in Folgeinfektionen eine lang anhaltende Resistenz gegenüber einer breiten Palette an Pathogenen vermittelt wird. Die Funktion dieses Zelltodmechanismus scheint darin zu liegen, solche Zellen aus dem Gewebe zu entfernen, die das Pathogenwachstum fördern. Außerdem werden antimikrobielle Komponenten und Signale freigesetzt, die Abwehrmechanismen in benachbarten, als auch weiter entfernt liegenden Zellen in Gang setzen (Goodman und Novacky; 1994). Der Zelltod alleine ist häufig allerdings nicht ausreichend, um das Pathogen in seinem Wachstum einzudämmen, wenn andere Abwehrantworten beeinträchtigt sind (Century et al.; 1995).

Damit der HR eine schützende und nicht zerstörerische Funktion zukommt, muss die Anzahl „geopferter“ Zellen möglichst klein gehalten werden, und der Prozess multiplen Kontrollmechanismen unterliegen. So sind nicht nur die in Kap. 1.1 beschriebenen aktivierten R-Gene für die Auslösung der HR bedeutend, sondern auch andere Gene in die Regulation involviert. Diese sind vermutlich sowohl in resistenten als auch anfälligen Pflanzen vorhanden und besitzen die Fähigkeit eine HR auch in Abwesenheit von der Gen-für-Gen Erkennung zu vermitteln, wie beispielsweise *NDR1* („non-race specific disease resistance“) und *EDS1* („enhanced disease susceptibility 1“) (Morel und Dangl; 1999). Fortschritte in der

Entschlüsselung des HR-Mechanismus wurden mit *lsd* und *acd*-Mutanten („lesion simulating disease“; „accelerated cell death“) erzielt, die zeigten, dass allein die Wirtsfaktoren ausreichend sind, um einen HR-ähnlichen Zelltod, verbunden mit erhöhter Resistenz und SAR-Ausbildung, auszulösen (Morel und Dangl; 1999, Brodersen et al.; 2002). Weitere Faktoren, die sowohl positiven als auch negativen Einfluss auf die HR ausüben, wurden in den Autophagie-assoziierten Genen (ATGs) gefunden (Kap. 1.3- Kap. 1.5). Erste Hinweise eines Zusammenspiels zwischen der HR und der Autophagie wurden durch Mikroarray-Analysen gewonnen, da 10 ATGs eine mehr als zweifache transkriptionelle Induktion nach programmiertem Zelltod zeigten, wie *ATG1* (*At3g53930*), *ATG5* (*At5g17290*) und *ATG7* (*At5g45900*) (Seay et al.; 2006). Außerdem wurde herausgefunden, dass nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV) in *atg3*, *atg6* und *atg7*-Tabakmutanten, die HR zwar wie in Wildtyp-Pflanzen initiiert wurde, allerdings nicht mehr einer lokalen Begrenzung unterlag, sondern sich auch in nicht-infiziertes Areal ausbreitete (Liu et al.; 2005), was somit auf eine negative Zelltodregulation durch Autophagie hindeutet. Eine ähnliche HR-Fehlregulation konnte ebenso für *Arabidopsis atg6*-Mutanten bestätigt werden (Patel und Dinesh-Kumar; 2008). Spekulativ bleibt die Ursache dieses sich ausbreitenden Zelltodes. Eine mögliche Erklärung wäre die fehlende Entfernung eines Zelltod auslösenden bisher unbestimmten Faktors oder aber der fehlende Aufräumprozess, der weitere Zellschäden verursacht.

Wie auch im tierischen System agiert die Autophagie jedoch nicht nur für das Überleben, sondern kann auch eine Rolle als zelltodfördernder Mechanismus einnehmen, wie an zwei unterschiedlichen Beispielen gezeigt werden konnte. Zum einen können Protease-Vorläufer über die Autophagie zur Vakuole transportiert werden, wo sie nach Prozessierung aktiv den Zelltod herbeiführen können (Bassham; 2007), zum anderen wurde nach Infektion mit avirulenten Pathogenen in *atg*-Mutanten über Ionenleitfähigkeitsmessungen weniger Zelltod festgestellt (Hofius et al.; 2009), womit die Autophagie als positiver Regulator des Zelltodes wirksam wird.

Regulationsmechanismen des hypersensitiven Zelltodes und die Verbindung zu dem konservierten Prozess der Autophagie bedürfen aus diesem Grund weiterer Aufklärung.

### 1.3 Abbauege und Formen der Autophagie

Der Proteinabbau, der durch verschiedene Prozesse ermöglicht wird, spielt sich ubiquitär in allen Organismen auf ähnliche Art und Weise ab. So ist der pflanzliche Lebenszyklus von der Samenkeimung bis zur Seneszenz von kontinuierlichem Proteinabbau geprägt (Vierstra; 1993). Dieser essentielle Vorgang ermöglicht der Pflanze Aminosäuren (AS) wiederzuverwerten und somit den Bedarf an Proteinen in bestimmten Entwicklungsprozessen oder an verschiedenste Umweltbedingungen anzupassen.

Zelltoxizität beispielsweise kann durch den Abbau mutierter oder geschädigter Proteine vermieden werden (Mattoo et al.; 1984), die Stöchiometrie von Enzymen und ihren jeweiligen Kofaktoren kann bewahrt werden (Schmidt und Mishkind; 1983), Zymogene können in aktive Formen prozessiert werden (McGurl et al.; 1992) oder regulatorische Moleküle von Signalkaskaden entfernt werden (Vierstra; 1993). All dies spiegelt den vielfältigen Nutzen des Proteinabbaus wider.

Pflanzen besitzen mit dem Ubiquitin-Proteasom-Weg und der Autophagie mindestens zwei hochkonservierte, proteolytische Prozesse (Reggiori und Klionsky; 2002, Smalle und Vierstra; 2004). Der Ubiquitin-Proteasom-Weg ist durch zwei aufeinanderfolgende Schritte charakterisiert. Nach dem Anfügen multipler Ubiquitinmoleküle (Ub) an das Zielsubstrat wird das so markierte Molekül anschließend dem 26S Proteasomkomplex zum Abbau zugeführt (Hershko und Ciechanover; 1992). Die Konjugation zwischen dem konservierten Ub, einem 76-AS-Polypeptid, und dem Zielsubstrat erfolgt durch eine dreistufige Kaskade, die durch das Ub-aktivierende Enzym E1 ATP-abhängig initiiert wird. Eine energiereiche Thiolesterbindung zwischen E1 und Ub bildet einen Zwischenkomplex, bevor ein ebenfalls ATP-abhängiges Ub-konjugierendes Enzym E2 das aktivierte Ub erneut über eine energiereiche Thiolesterbindung bindet und zum Zielsubstrat überführt. Das Zielsubstrat wurde zuvor spezifisch von einer Ub-Protein Ligase E3 gebunden, die auch das E2 bindet (Glickman und Ciechanover; 2002). Die Spezifität der Substraterkennung wird daher durch die E2 und E3 Enzyme bestimmt (Weissman; 2001).

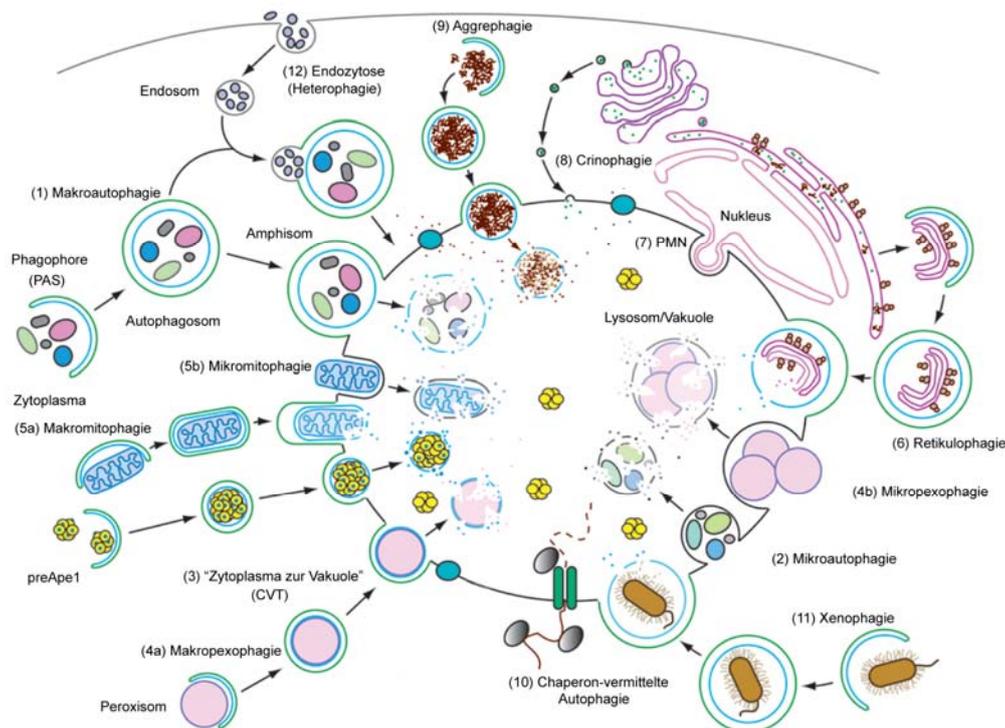
Ubiquitin-ähnliche Konjugationskaskaden finden sich auch im autophagischen Prozess (Kap. 1.5), welcher in vakuolärem bzw. lysosomalem Proteinabbau resultiert (Ohsumi; 2001, Levine und Klionsky; 2004). Der Begriff „Autophagie“ („auto“= selbst; „phagein“= essen) wurde bereits 1963 von Christian de Duve, dem Entdecker des Lysosoms, verwendet (De Duve; 1963). Eine damalige Annahme war, dass der Ub-Proteasom-Weg vor allem für den selektiven Abbau kurzlebiger, regulatorischer Proteine benötigt wird, während die Autophagie als ein nicht-selektiver Abbauweg für langlebige Proteine und für Proteinkomplexe galt, die zu groß für den proteasomalen Abbau wären. Doch nicht nur Proteine, sondern auch Zytosol und ganze Organellen, wie Chloroplasten oder Mitochondrien können über die Autophagie abgebaut werden. Neue Entdeckungen lieferten immer weitere Beweise, dass nicht nur unspezifischer Abbau erfolgt, sondern selektive Abbauprozesse ebenfalls über die Autophagie ablaufen können. Selektive und nicht-selektive Autophagieprozesse sind für die Wahrung eines kontrollierten Gleichgewichts zwischen Anabolismus und Katabolismus bedeutsam und spielen daher wichtige Rollen unter Mangelbedingungen, Zelldifferenzierungen, Zelltod und Seneszenz, da die Zelle auf diese Weise befähigt ist, nicht nur beschädigte oder überzählige Organellen zu entsorgen,

sondern auch die daraus gewonnenen Komponenten für eine Wiederverwertung zu gewinnen (Klionsky und Emr; 2000).

Werden bestimmte Komponenten nun für den autophagischen Abbau bestimmt, so kann deren Transport zur Vakuole auf verschiedene Art und Weise ablaufen (siehe Abb. 1.2). Die Makroautophagie stellt die am häufigsten beschriebene Form der Autophagie dar (Marty; 1999, Kim und Klionsky; 2000, Klionsky und Emr; 2000) und wurde bereits vor 40 Jahren mikroskopisch in Pflanzen beobachtet (Matile und Winkenbach; 1971). Aus einer Membran bisher unbekanntes Ursprungs bildet sich eine einzigartige Organelle, die Phagophore oder präautophagosomale Struktur (PAS) (Suzuki et al.; 2001), wobei Beteiligungen des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums an der Bildung dieser Struktur angenommen werden (Hamasaki und Yoshimori; 2010). Eine weitere Annahme ist, dass die PAS durch den Transport weiterer Vesikel zu einem großen, doppelmembranösen, zytosolischen Vesikel, dem sogenannten Autophagosom ( $\varnothing$  300- 900 nm) expandiert. Im Gegensatz zu Transportvesikeln des sekretorischen Weges bildet sich das Autophagosom somit *de novo* und nicht durch die Abknospung bereits gebildeter Organellen. Nach Fertigstellung des Autophagosoms wird das innere Vesikel samt Inhalt meist zum Lumen der Vakuole bzw. des Lysosoms transportiert. In Säugetieren gibt es eine zusätzliche Sonderform, bei der ein Autophagosom mit einem Endosom fusioniert, welches nun als Amphisom bezeichnet wird und im Folgeschritt ebenfalls mit dem Lysosom fusioniert (Gordon und Seglen; 1988). Im Lumen der Vakuole bzw. des Lysosoms kann anschließend durch das Vorhandensein zahlreicher Hydrolasen die innere Membran samt Beladung abgebaut werden, womit der Vakuole oder dem Lysosom eine besondere Rolle als katabolisches Kompartiment zukommt. Die aus dem Abbau resultierenden Makromoleküle können daraufhin für eine Wiederverwertung ins Zytosol entlassen werden. In Pflanzenzellen konnte auch die generell wenig charakterisierte Mikroautophagie morphologisch beschrieben werden (Minamikawa et al.; 2001, Toyooka et al.; 2001), wobei Zytoplasma direkt an der Oberfläche der Vakuole aufgenommen wird (Dunn; 1994). Der bereits vielfach beschriebene Transportweg „Zytoplasma zur Vakuole“ (CVT) dagegen konnte lediglich in Hefe identifiziert werden (Reggiori und Klionsky; 2002). Das Besondere und Gegensätzliche zur Mikro- oder Makroautophagie ist, dass dieser Weg nicht für den Abbau, sondern für die Biosynthese von mindestens zwei vakuolären Hydrolasen (Aminopeptidase 1 und  $\alpha$ -Mannosidase) benötigt wird (Shintani et al.; 2002). Ein konvergentes Analogon dazu könnte allerdings der in Pflanzen beschriebene „ER zur Vakuole“ beschriebene Transportweg darstellen (Herman und Schmidt; 2004). So wurden pflanzenspezifische ER-abgeleitete Vesikel, die Vorläufer von Cysteinproteasen enthielten, in samenspeichernden und seneszierenden Geweben vegetativer Organe gefunden (Hatsugai et al.; 2004). Autophagosomaler Transport dieser Vesikel, unter Umgehung des Golgi-Apparates, führte in der Vakuole zur Aktivierung der

Proteasen und könnte somit eine Rolle im Zelltod (siehe Kap. 1.2) oder in der Speicherproteinmobilisierung spielen (Bassham et al.; 2006).

In Pflanzen konnte der Nachweis selektiver Autophagie bisher nicht erbracht werden, in Hefe und in Säugetieren dagegen wurden bereits einige selektive Abbauwege beschrieben, wie die Pexophagie (Scott und Klionsky; 1998, Iwata et al.; 2006), die eine Unterteilung in Mikro- und Makropexophagie erlaubt und einen gezielten Peroxisomenabbau herbeiführt. Es wird angenommen, dass diese selektive Funktion in Glyoxysomen (Peroxisomen im Speichergewebe von Ölpflanzensamen) ebenfalls vonstatten gehen könnte (Vigil; 1970, Thompson und Vierstra; 2005). Weitere selektive autophagische Abbauförmen sind die Mikro- und Makromitophagie, die Retikulophagie und die „Piecemeal Mikroautophagie“ (PMN), wobei Mitochondrien, ER bzw. Teile des Nukleus dem Abbau zugeföhrt werden (Bernales et al.; 2006, Krick et al.; 2009, Tolkovsky; 2009).



**Abb. 1.2: Verschiedene Formen der Autophagie**

Die Autophagie lässt sich je nach abzubauenem Material in verschiedene Kategorien unterteilen, wobei nicht-selektive Abbaumechanismen (Makroautophagie (1) und Mikroautophagie (2)) von selektiven Formen (CVT (3), Pexophagie (4a,b), Mitophagie (5a,b), Retikulophagie (6), „Piecemeal Mikroautophagie“ (PMN) (7), Crinophagie (8), Aggrephagie (9), Chaperon-vermittelte Autophagie (10) und Xenophagie (11)) zu unterscheiden sind. Gegenätzlich zu diesen Prozessen steht die Heterophagie (12), die exogenes Material aufnimmt (modifiziert nach Klionsky et al. (2007)).

Die direkte Fusion sekretorischer Vesikel mit dem Lysosom wird als Crinophagie bezeichnet (Marzella et al.; 1981, Lenk et al.; 1991), während der selektive Abbau von Proteinaggregaten als Aggrephagie bezeichnet wird (Iwata et al.; 2005, Overbye et al.; 2007). Die nur in Säugern bekannte Chaperon-vermittelte Autophagie ermöglicht den Import und Abbau löslicher, zytosolischer Proteine durch chaperon-abhängige direkte Translokation

über die lysosomale Membran (Massey et al.; 2006). Für die Immunabwehr im tierischen System besonders relevant ist die Xenophagie, die den selektiven Abbau von intrazellulären Mikroben, wie Bakterien, Pilzen, Parasiten und Viren, durch einen autophagieverwandten Mechanismus hervorruft (Alexander und Leib; 2008). Dieser Vorgang ist nicht mit der Heterophagie zu verwechseln, die exogenes Material durch Einstülpung der Plasmamembran aufnimmt, wie es bei der Endo- und Phagozytose der Fall ist. Ein möglicher Hinweis von Xenophagie in Pflanzen konnte durch Vergleich resistenten Tabaks mit *atg6*-Mutanten festgestellt werden, da die „Tabakmosaikviren“ nur unter Wildtypbedingungen in ihrem Wachstum gehemmt wurden (Liu et al.; 2005).

## 1.4 Autophagie in Eukaryoten: Vergleich zwischen Hefe, Mensch und Pflanze

Das Überleben der Zelle kann entscheidend von einem geregelten Autophagieablauf abhängen (siehe Kap. 1.5). Doch nicht nur als Recyclingmechanismus, sondern auch als „Kontrollstation“ trägt die Autophagie dazu bei, überzählige bzw. beschädigte Organellen zu entfernen, um die Zelle vor möglichem Schaden zu bewahren. Zusätzlich zu diesen konstitutiv ablaufenden Mechanismen konnte in Hefe für eine Reihe von *ATGs* eine Beteiligung zur Bewältigung von oxidativem Stress nachgewiesen werden (Thorpe et al.; 2004). Auch in entwicklungsbiologischen Vorgängen, wie Zelldifferenzierungen, ist die Autophagie in Hefe involviert, da z. B. bestimmte *atg*-Mutanten nicht mehr zur Sporulation befähigt sind (Tsukada und Ohsumi; 1993, Thumm et al.; 1994).

Die Autophagie in Säugetieren findet ebenso wie für Hefe beschrieben unter Mangelbedingungen und oxidativem Stress statt. In Mäusen sind Autophagiedefekte in den Genen *ATG5* und *ATG7* neonatal letal (Kuma et al.; 2004), was somit eindrucksvoll auf die Bedeutung als Energielieferant zur Überbrückung von Hungerzuständen hindeutet. Bereits in jungem Gewebe konnte in konditionalen *atg7*-Mutanten der Nachweis erhöhter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erbracht werden (Wu et al.; 2009). Betrachtet man alterndes Gewebe, findet man zahlreich beschädigte Organellen und langlebige Proteine (Vittorini et al.; 1999), was auf eine altersabhängige Abnahme der Autophagieaktivität hindeutet. Die Autophagie spielt aber auch eine Rolle in der Immunabwehr, die zelltypisch sehr unterschiedlich ausfallen kann (Deretic; 2009). Eine zellautonome Abwehr intra- und extrazellulärer Pathogene konnte durch einsetzende Pexophagie (Kap. 1.3) mehrfach gezeigt werden (Levine; 2005). So konnte beispielsweise nach Überexpression von Beclin1 (*ATG6*) ein reduzierter Virustiter des „Sinbis Virus“ nachgewiesen werden (Liang et al.; 1998), während erhöhte Titer des „Herpes Simplex Virus“ in *atg5* und *Beclin1*-Mutanten gefunden wurden (Levine und Yuan; 2005). Außerdem kann die Autophagie die

Antigenpräsentation auf MHC Klasse II Molekülen unterstützen. Sie ist bedeutsam für die Homöostase von T-Zellen, B-Zellen und anderen spezialisierten Immunzellen, aktiviert oder schwächt Entzündungsprozesse und beeinflusst die Zellpolarisierung von T-Helferzellen. Besonders interessant, auch im Hinblick auf das pflanzliche System, ist der Befund, dass sogenannte PRRs und Toll-ähnliche Rezeptoren, die auch Analoge in Pflanzen haben und bedeutsam für antimikrobielle Signalerkennung und -weiterleitung sind (Kap. 1.1), durch die Autophagie aktiviert werden. Umgekehrt können diese Rezeptoren auch nach Ligandbindung eine Autophagieaktivierung herbeiführen, die somit direkt an der Beseitigung intrazellulärer Pathogene mitwirken kann (Sanjuan et al.; 2007, Xu et al.; 2007, Delgado et al.; 2008, Delgado und Deretic; 2009). Der Autophagieweg kann allerdings auch genutzt werden, um zytosolische, mikrobielle Produkte in einem als „Topologische Inversion“ bekannten Prozess zu den PRRs zu transportieren, wie es beispielsweise für den „Vesicular Stomatitis Virus“ beschrieben wurde (Kato et al.; 2008).

Die Autophagie in Pflanzen bzw. die Expression zahlreicher ATGs konnte in vielerlei Geweben junger und alter Pflanzen nachgewiesen werden (Thompson et al.; 2005). Dies zeigt, dass der Prozess weder auf einen speziellen Gewebetyp noch auf ein bestimmtes Entwicklungsfenster beschränkt ist. Autophagie-defiziente Pflanzen sind unter normalen Wachstumsbedingungen, im Gegensatz zu Säugetieren, überlebensfähig und weisen abgesehen von *atg6* außer geringerem Wuchs keine deutlichen Abnormalitäten hinsichtlich ihrer Entwicklung auf. Der Prozess scheint aber durchaus in entwicklungsbiologischen Prozessen eine Rolle zu spielen, wie in der vegetativen Vakuolenbildung (Marty; 1978) und der Regulation der Seneszenz, da *atg*-Mutanten einen verfrühten Seneszenzphänotyp aufweisen (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Surpin et al.; 2003). Die Rolle der Autophagie in der Seneszenz ist allerdings noch nicht geklärt. Die Notwendigkeit des Abbaus zellulärer Bestandteile für die Durchführung des Seneszenzprogramms und zum Erhalt der Lebensfähigkeit der Zelle gilt aber als wahrscheinlich (Buchanan-Wollaston et al.; 2005). In verschiedenen Pflanzen, wie Reis, Tabak und *Arabidopsis* konnte die überlebenswichtige Bedeutung der Autophagie unter Mangelbedingungen, wie für Hefe und Säugetiere geltend, nachgewiesen werden (Chen et al.; 1994, Moriyasu und Ohsumi; 1996, Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Surpin et al.; 2003, Contento et al.; 2004, Yoshimoto et al.; 2004). Anders als in Hefe beginnt der Abbau zytosolischer Komponenten und Proteinaggregate allerdings bereits im Autophagosom (Toyooka et al.; 2006). Auch durch oxidativen Stress wird die Autophagie in Pflanzen aktiviert. Sie sorgt für den Abbau oxidierter Proteine oder beschädigter Mitochondrien, da wie auch im tierischen System beschrieben eine erhöhte Menge oxidierter Proteine in den Autophagiemutanten gefunden werden konnte (Xiong et al.; 2007a, Xiong et al.; 2007b). Wie in Kap. 1.2 bereits erwähnt, erfüllt die Autophagie auch in

Pflanzen schützende oder destruktive Funktionen in der Immunantwort, deren genau zugrundeliegenden Mechanismen weiterer Klärung bedürfen.

## 1.5 Autophagie-assoziierte Gene und deren Funktion

Der morphologische Autophagienachweis gelang bereits vor 40 Jahren, die Identifizierung und beginnende Charakterisierung von ca. 36 ATGs dagegen wurde vor allem in der letzten Dekade in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erbracht (Klionsky et al.; 2003, Klionsky; 2005). Da die Autophagie einen in Eukaryoten hochkonservierten Mechanismus darstellt, wurden durch Sequenzanalysen zahlreiche homologe ATG-Gene in vielen weiteren eukaryotischen Systemen, wie beispielsweise der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, identifiziert (Hanaoka et al.; 2002). Ein Sequenzvergleich von *S. cerevisiae*, *A. thaliana* und den menschlichen ATGs, exemplarisch gezeigt für ATG 5 - 8 und ATG12 (Tab. 1.1), zeigt allerdings, dass sich die Sequenzähnlichkeiten lediglich auf 24 - 73 % belaufen. Bisher gelangen trotzdem erfolgreiche Komplementationsversuche von Hefemutanten mit pflanzlichen ATGs, wie für ATG4, ATG6 und ATG8 berichtet wurde (Hanaoka et al.; 2002, Yoshimoto et al.; 2004, Liu et al.; 2005). Essentielle AS-Reste der Hefe ATG-Proteine sind in *A. thaliana* konserviert, wie durch Funktionsanalysen in *atg*-Mutanten nachgewiesen wurde (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Yoshimoto et al.; 2004).

ATG	<i>A. thaliana</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mensch
ATG5	100 %	31 %	44 %
ATG6	100 %	24 %	36 %
ATG7	100 %	56 %	62 %
ATG8a - i	41-99 %	47 - 73 %	33 - 41 %
ATG12a - b	95 %	36 %	45 %

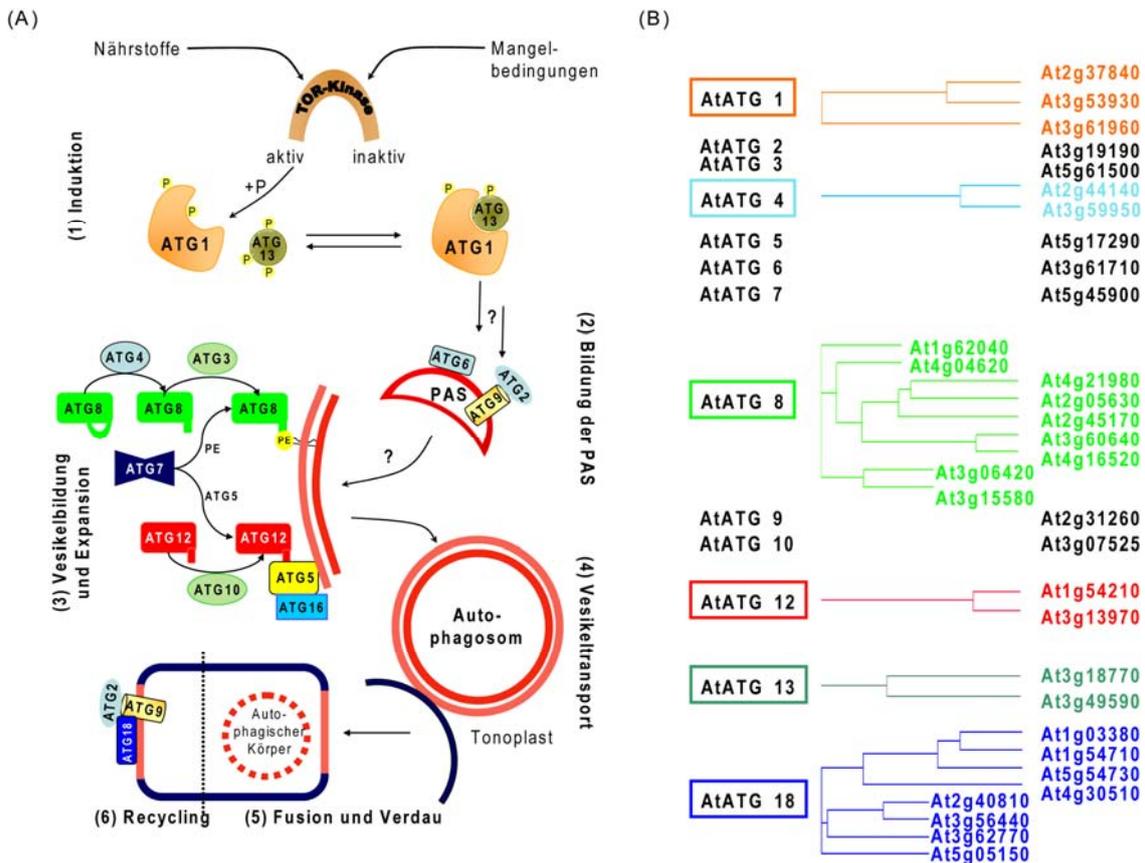
**Tab. 1.1: Sequenzhomologien zwischen verschiedenen Eukaryoten**

Sequenzen der ATGs ATG5, ATG6, ATG7, ATG8a-i und ATG12a und ATG12b wurden aus *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* und Mensch verglichen und auf die pflanzlichen ATGs [% der Ähnlichkeit] bezogen.

Von 36 Hefe ATGs konnten bisher 24 Homologe in *A. thaliana* gefunden werden, die häufig, und anders als in Hefe, in Multigenfamilien vorkommen, wie beispielsweise ATG8, VAC8 und ATG18. Auch Splice-Varianten treten beispielsweise in den ATG-Genen ATG4, ATG6 und ATG8 auf. Dies könnte auf weitere Rollen in verschiedensten zellulären Prozessen hindeuten (Bassham et al.; 2006). Weitere zu den Hefe ATGs homologe Gene wurden auch in Reis, Soja, Mais, Gerste, Weizen, Hirse und *Chlamydomonas* gefunden. Somit kann man auf einen ubiquitär in Pflanzen vorkommenden Mechanismus schließen.

Wie bereits erwähnt, wird die Autophagie vor allem unter limitierenden Nährstoffbedingungen überlebensnotwendig. In Hefe und Säugern wirkt die Serin/Threonin-Kinase TOR („target of rapamycin“) als zentraler Sensor des Nährstoffhaushalts und wird unter Mangelbedingungen

inaktiviert. Ein *Arabidopsis* TOR-Paralog existiert zwar, jedoch konnte bisher keine Beteiligung an der Autophagie nachgewiesen werden. Die Inaktivierung von TOR löst eine Reihe weiterer Reaktionen aus, die unter anderem zur Transkription verschiedener Proteine führen und in die Induktion der Autophagie münden (Noda und Ohsumi; 1998, Schmelzle und Hall; 2000, Raught et al.; 2001, Rohde et al.; 2001).



**Abb. 1.3: Vereinfachte Darstellung des Autophagieprozesses mit beteiligten *AtATG*-Genen**

Die Autophagie lässt sich wie in (A) gezeigt in 6 signifikante Abschnitte unterteilen (1-6). Nach der Induktion der Autophagie (1), wird die Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) bewirkt (2). Die Vesikelbildung und Expansion wird über 2 ubiquitin-ähnliche Konjugationskaskaden erreicht (3). Das so fertiggestellte Autophagosom wird über Transportmechanismen zur Vakuole transportiert und dockt an den Tonoplast an (4). Das innere autophagische Vesikel gelangt nach Fusion der äußeren Membran des Autophagosoms in das Innere der Vakuole, wo es dem Abbau zugeführt wird (5). Recyclingmechanismen erlauben eine Wiederverwertung beteiligter Autophagiekomponenten (6). Eine Übersicht der *AtATG*s mit Verwandtschaftsverhältnissen ist in (B) dargestellt. Details zu den *ATG*s finden sich im Text.

Die TOR-Kinase, die im aktiven Zustand eine Hyperphosphorylierung von ATG13 bewirkt, vermittelt nach Inhibierung eine partielle Dephosphorylierung dieses ATGs. In diesem Zustand kann ATG13, eine regulatorische Untereinheit der Serin/Threonin-Kinase ATG1, diese binden und somit nach Autophosphorylierung der Kinase eine Aktivierung auslösen (Funakoshi et al.; 1997, Kamada et al.; 2000). Die Bildung der PAS geschieht unter Beteiligung des PI3K Komplex I, dessen Aktivität wiederum durch einen Komplex vermittelt wird, der ATG6 (Beclin1) beinhaltet. Viele weitere ATGs werden zu dieser *de novo* gebildeten Struktur rekrutiert, wie beispielsweise ATG2, ATG9 und ATG18. Die Expansion der PAS geschieht über zwei ATP-abhängige ubiquitin-ähnliche Konjugationskaskaden

(Ohsumi; 2001), die die Schließung des Vesikels über einen bisher unbekanntem Mechanismus bewirken. Erzeugt wird aus den ubiquitinähnlichen Molekülen ATG12 und ATG8, das zuvor von der Cysteinprotease ATG4 prozessiert wird (Kirisako et al.; 2000), der ATG12-ATG5-ATG16-Komplex und ein Komplex aus ATG8 und Phosphatidylethanolamin (PE) unter Beteiligung des E1-ähnlichen Enzyms ATG7 und der E2-ähnlichen Enzyme ATG3 und ATG10. Außer beispielsweise ATG8, das nun membranassoziiert vorliegt, dissoziieren die meisten ATGs nach Fertigstellung des nun als Autophagosom bezeichneten Doppelmembranvesikels und werden zu ihren Ursprungsorten in einem bisher nicht völlig verstandenen Mechanismus zurücktransportiert. Bei diesem Rücktransport spielt das zirkulierende integrale Membranprotein ATG9, das sich zwischen der PAS und zytosolischen Vesikeln und Mitochondrien bewegt eine Rolle (Reggiori et al.; 2005) und ermöglicht, dass die ATGs für den nächsten Zyklus zur Verfügung stehen. Die ATG9 Zirkulierung ist wiederum abhängig von ATG1, ATG13, ATG2 und ATG18. Das Andocken und die Fusion des fertiggestellten Vesikels mit der Vakuole erfordert eine Reihe weiterer Komponenten, wie zum Beispiel SNARE-Proteine. Das Fusionsereignis endet im Lumen der Vakuole mit einem von einer Einzelmembran umgebenden Vesikel, gefolgt vom Abbau der Ladung für die Wiederverwertung.

Die Tab. 1.2 fasst alle bisher in Hefe entdeckten ATGs mit ihrer entsprechenden Funktion zusammen (Bassham et al.; 2006, Cao und Klionsky; 2007), wobei ATGs mit Homologen im pflanzlichen Genom in Fett dargestellt sind.

ATGs	Funktion in Hefe
<b>TOR</b>	Proteinkinase, negativer Regulator der Autophagie
<b>ATG1</b>	Ser/Thr-Kinase, beteiligt an der Autophagie-Induktion und an der Zirkulation des ATG9 Komplexes, interagiert mit ATG11, ATG13-17 und ATG29
<b>ATG2</b>	Benötigt für den retrograden Transport von ATG9 von der PAS zu peripheren Stellen, die vielleicht „Membranspender“ für die Vesikelbildung markieren
<b>ATG3</b>	Ähnlich einem Ub-konjugierenden Enzym, benötigt für die Anlagerung von PE an ATG8
<b>ATG4</b>	Cystein-Protease, prozessiert den C-Terminus von ATG8 und spaltet auch wieder Amidbindung zwischen ATG8 und PE ähnlich einem dekonjugierenden Enzym, das Ub entfernt
<b>ATG5</b>	Konjugation mit ATG12 durch eine Isopeptidbrücke am internen Lysin
<b>ATG6</b>	Komponente zweier PtdIns 3-Kinase Komplexe, die in der Autophagie und bei der vakuolären Proteinsortierung eine Rolle spielt, interagiert mit ATG14, VPS34 und VPS15
<b>ATG7</b>	Homolog zu einem Ub-aktivierenden E1, das für die Bildung der beiden Konjugate ATG8-PE und ATG5-ATG12 benötigt wird, das erste E1 welches zwei verschiedene Ub-ähnliche Proteine aktiviert
<b>ATG8</b>	Ub-ähnliches Protein, das mit C-terminalem Glyzin eine Verbindung zu PE über Amidbindung eingeht und dieses somit modifiziert, reguliert die Autophagosomengröße und bleibt mit dem Autophagosom verbunden
<b>ATG9</b>	Integrales Transmembranprotein, vermutlich benötigt für die Expansion der Phagophore und für Recyclingprozesse, interagiert mit ATG2, ATG23 und ATG27
<b>ATG10</b>	Ähnlich einem Ub-konjugierendem Enzym, keine Homologie zu bekannten E2s, benötigt für die Anlagerung von ATG12 an ATG5
<b>ATG11</b>	Peripheres Membranprotein, Hydrolase, Adapter oder Gerüst während spezifischer Autophagie (CVT Pfad und Pexophagie), interagiert mit ATG1, ATG9, ATG17, ATG19, ATG20 und mit sich selbst

<b>ATG12</b>	Ub-ähnliches Protein, geht mit dem C-terminalem Glyzin eine Verbindung zu dem Lysin des ATG5 ein
<b>ATG13</b>	ATG1-interagierendes Phosphoprotein, moduliert ATG1-Kinase-Aktivität, mögliche Schlüsselrolle in der Autophagieinitiation
<b>ATG14</b>	Untereinheit des PtdIns 3-Kinase Komplexes der in die Autophagie involviert ist, bestimmt die Lokalisierung des Komplexes an der PAS, Verbindungsglied zwischen ATG6 und VPS15/VPS34
<b>ATG15</b>	Vakuoläre Lipase für die Lyse der inneren Membran des Autophagosoms nach Fusion mit der Vakuole, integrales Membranprotein
<b>ATG16</b>	Bildet einen Komplex mit ATG5, das mit ATG12 konjugiert ist, interagiert mit sich selbst um ein Tetramer zu bilden, vermutlich zur Stabilisierung des Komplexes
<b>ATG17</b>	Teil des ATG1-Komplexes, moduliert die ATG1-Kinaseaktivität, interagiert mit ATG1, ATG13, ATG20 und ATG24
<b>ATG18</b>	Interagiert mit ATG9, benötigt für ATG9-Recycling und ATG2-Lokalisation, bindet PtdIns(3)-Phosphat, Lokalisation PtdIns 3-Kinase Komplex abhängig
<b>ATG19</b>	Rezeptor für Substrate des CVT-Pfads, Hydrolase interagiert mit ATG11, nicht benötigt für nicht-spezifische Autophagie in <i>S. cerevisiae</i> , bleibt wie ATG8 am reifen Autophagosom lokalisiert
<b>ATG20</b>	PX-Domäne enthaltendes Protein, bindet PtdIns(3)-Phosphat, nicht für unspezifische Autophagie benötigt, aber für CVT-Pfad, bindet ATG11, ATG17 und ATG24, Teil eines möglichen ATG1-Komplexes
<b>ATG21</b>	ATG18 Homolog, bindet PtdIns(3)-Phosphat, nur bedeutend für CVT-Pfad, benötigt für die Rekrutierung von ATG8 zur PAS
<b>ATG22</b>	Vakuoläre Permease für die Freisetzung von Makromolekülen (AS) nach vakuolärem Abbau ins Zytosol, nicht benötigt für den CVT-Pfad
<b>ATG23</b>	Zytosolisches Protein; für ATG-Recycling, benötigt für CVT-Pfad und für effiziente unspezifische Autophagie
<b>ATG24</b>	PX-Domäne enthaltendes Protein, bindet PtdIns(3)-Phosphat, CVT-Pfad, nicht für unspezifische Autophagie nötig, bindet ATG1, ATG17 und ATG20, Teil eines möglichen ATG1-Komplexes
<b>ATG25</b>	Nicht vorhanden in <i>S. cerevisiae</i> , benötigt für spezifischen Peroxisomenabbau in <i>Hansenula polymorpha</i>
<b>ATG26</b>	Protein mit GRAM Domäne, bindet PtdIns(4)-Phosphat, benötigt für spezifischen Peroxisomenabbau in <i>Pichia pastoris</i> , nicht in <i>S. cerevisiae</i>
<b>ATG27</b>	Transmembranprotein, bindet PtdIns(3)-Phosphat, Lokalisation in Zirkulierung wie ATG9, mit dem es interagiert, benötigt für CVT-Pfad und für effiziente unspezifische Autophagie
<b>ATG28</b>	Protein mit „coiled-coil“ Domäne, benötigt für spezifischen Peroxisomenabbau in <i>Pichia pastoris</i>
<b>ATG29</b>	Komponente des ATG1 Komplexes, interagiert direkt mit ATG1
<b>ATG30</b>	Protein benötigt für spezifischen Peroxisomenabbau in <i>Pichia pastoris</i>
<b>ATG31</b>	Komponente des ATG1 Komplexes, interagiert direkt mit ATG17
<b>VPS15</b>	Proteinkinase, benötigt für Vps34
<b>VPS34</b>	PI-3-K katalytische Untereinheit
<b>VAC8</b>	Armado Repeat Protein, interagiert mit ATG13, benötigt für den CVT-Pfad, nicht essentiell für Makroautophagie in <i>S. cerevisiae</i>
<b>PEP4</b>	Vakuoläre Proteinase A
<b>PRB1</b>	Vakuoläre Proteinase B

**Tab. 1.2: Übersicht der in Hefe beteiligten Autophagiekomponenten**

Die ebenfalls in *Arabidopsis thaliana* auftretenden Homologe sind in Fett hervorgehoben, Homologien wurden aufgrund von Datenbankvermerken, Sequenzähnlichkeiten und Vorhandensein konservierter Domänen und Reste festgestellt.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Die Autophagie erfüllt verschiedene Funktionen in der tierischen Immunantwort. Eine Beteiligung dieses Abbauweges in Abwehrprozessen konnte auch vor fünf Jahren erstmals in Pflanzen postuliert werden (Liu et al.; 2005). So wurde in Tabak der Nachweis erbracht, dass das Autophagiegen *ATG6 (Beclin1)* für die Eingrenzung des Zelltodes nach Pathogenbefall essentiell ist und möglicherweise die Virusreplikation einschränkt. *ATG6* erfüllt allerdings auch multiple autophagieunabhängige Funktionen, die für weitere *ATGs* noch nicht beschrieben wurden. In dieser Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob die Autophagie als Gesamtprozess eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort spielt, oder aber, ob der beobachtete Phänotyp auf einen *ATG6* spezifischen Effekt zurückzuführen ist. Deshalb sollten Gene verschiedener Autophagieschritte ausgewählt werden und die Beteiligung der von diesen Genen kodierten Proteinen in der Immunabwehr der Pflanze gegenüber nekrotrophen, hemibiotrophen und biotrophen Pathogenen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide und Isotope

Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Carl Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Molecular Probes (Leiden, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz) und BD (Sparks, USA) bezogen. Organische Lösemittel wurden von den Firmen Brenntag Chemiepartner GmbH NL (Plochingen), Fluka und Merck geliefert. Nukleinsäure modifizierende Enzyme (Restriktionsenzyme, *Pfu*-DNA Polymerase, T4-DNA Ligase), sowie Nukleotide wurden von den Firmen Fermentas (St. Leon-Rot) und New England Biolabs (Beverly, USA) erhalten. Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Radioaktive Verbindungen ( $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ ) stammten von GE Healthcare (Freiburg) oder Hartmann Analytic (Braunschweig). Antikörper lieferten die Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und New England Biolabs (Beverly, USA).

### 2.2 Verwendete Bakterien- und Pilzstämme

Alle verwendeten Bakterienstämme und deren Genotypen sind in Tab. 2.1 aufgelistet. Alle verwendeten Pilzstämme befinden sich in Tab. 2.2.

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> -M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
	DB3.1	RR1 <i>gyrA endA recA Spec<sup>r</sup></i>
	BL21AI	F-omp T <i>hsdSb</i> (rb-mb-) <i>gal dcm araB: T7RNAP-tetA</i>
<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Pph</i>	Rif <sup>r</sup>
	<i>Pto</i> DC3000	Rif <sup>r</sup>
	<i>Pto</i> DC3000 <i>avrRpm1</i>	pVSP61- <i>avrRpm1</i> , Rif <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup>
	<i>Pto</i> DC3000 <i>hrcC</i> <sup>-</sup>	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> (nptII)
	<i>Pto</i> DC3000 $\Delta$ <i>cmaA/cfa6</i>	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> Spec <sup>r</sup> cor <sup>-</sup>
	<i>Pto</i> DC3661	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> cor <sup>-</sup>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3103:pMP90	T-DNA <i>vir<sup>+</sup>Rif<sup>r</sup></i> , pMP90 Gen <sup>r</sup>

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Spezies	Bezeichnung/ Isolat
<i>Alternaria brassicicola</i>	MUCL 20297
<i>Botrytis cinerea</i>	B05-10
<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	EMWA
	NOCO
	WACO
<i>Pichia pastoris</i>	GS 115 (His4)

Tab. 2.2: Verwendete Pilzstämmen

## 2.3 Nährmedien und Antibiotika

Nährmedien wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt. Feste Nährmedien wurden mit 15 g/l Bacto-Agar (BD) bzw. 8 g/l Select-Agar (Sigma-Aldrich) für MS-Agar hergestellt. Tab. 2.4 fasst alle verwendeten Nährmedien zusammen. Nach dem Autoklavieren für 20 min bei 121°C wurde das Medium auf 60°C abgekühlt und bei Bedarf das entsprechende Antibiotikum oder weitere Inhaltsstoffe zugegeben (Tab. 2.3).

Antibiotikum	C <sub>Ende</sub> [µg/µl]	Lösemittel
Carbenicillin	100	Wasser
Cycloheximid	50	Wasser
Kanamycin	50	Wasser
Rifampicin	50	Methanol
Spectinomycin	100	Wasser
Tetracyclin	50	Ethanol

Tab. 2.3: Verwendete Antibiotika

Medium	Inhaltsstoffe je 1 l	Spezies
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	<i>Escherichia coli</i>
SOB	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 2,5 mM KCl (vorgelöst); pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und 0,4 M MgCl <sub>2</sub> zugeben	<i>Escherichia coli</i>
TB Puffer	3 g PIPES, 2,2 g CaCl <sub>2</sub> , 18,6 g KCl; pH 6,7 mit KOH einstellen, danach 10,88 g MnCl zugeben, sterilfiltrieren	<i>Escherichia coli</i>
SOC	2 g Trypton, 0,5 g Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl (vorgelöst); pH 7,0 mit NaOH einstellen, autoklavieren und 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , 20 mM α-D-Glukose steril filtriert zugeben	<i>Escherichia coli</i>
King's B	20 g Glycerin, 40 g Proteose-Pepton 3, nach dem Autoklavieren Zugabe von 10 ml 10 % K <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 10 ml 10 % MgSO <sub>4</sub>	<i>Pseudomonas syringae</i>

½ MS	2,2 g MS-Salz M0245 (Duchefa); pH 5,7 mit KOH einstellen	<i>Arabidopsis thaliana</i>
½ MS-Mangel	1 x MS-Basal-Salz M 0529 (Invitrogen), 3 mM CaCl <sub>2</sub> , 1,5 mM MgSO <sub>4</sub> , 5 mM KCl, 2 mM MES; pH 5,7, 1,25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
YPD	20 g Bacto Proteose Pepton, 20 g Glukose, 10 g Hefeextrakt	<i>Pichia pastoris</i>
BMGY und BMMY	1 % Hefeextrakt (w/v), 2 % (w/v) Pepton, 100 mM Kaliumphosphat, pH 6,0, 1,34 % YNB (w/v), 4x10 <sup>-5</sup> % Biotin (w/v), 1 % (v/v) Glyzerin (BMGY) oder 0,5 % (v/v) Methanol (BMMY); Hefeextrakt und Pepton in 700 ml Wasser autoklavieren, dann sterilfiltrierte Substanzen zugeben	<i>Pichia pastoris</i>
MD	1,34 % YNB (w/v), 4x10 <sup>-5</sup> % (w/v) Biotin, 2 % (w/v) Glukose	<i>Pichia pastoris</i>
½ PD	12 g/l PD (Kartoffel-Glukose, Duchefa); pH 5,8 mit NaOH einstellen	<i>Botrytis cinerea</i>
Sakai	34 g/l Bohnenmehl (frisch gemahlen) (Müllers Mühle), 17 g/l Haferkleie mit Keim (Alnatura), 8,5 g/l Saccharose, 15 g/l Agar; bei 95°C für 30 min quellen lassen, durch ein Sieb passieren, autoklavieren	<i>Alternaria brassicicola</i>

Tab. 2.4: Verwendete Nährmedien und Stammlösungen

## 2.4 Verwendete Vektoren

In Tab. 2.5 sind alle verwendeten Vektoren mit ihren wesentlichen Merkmalen aufgelistet.

Vektor	Merkmale	Verwendung	Referenz/Herkunft
pDONR201	Ori Puc, rrnB, T2, rrnB, T1, attP1, attP2, ccdB, Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für Gateway <sup>TM</sup> -Klonierungen	Invitrogen
pDONR207	Ori Puc, rrnB, T2, rrnB, T1, attP1, attP2, ccdB, Cm <sup>r</sup> , Gent <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für Gateway <sup>TM</sup> -Klonierungen	Invitrogen
pK7FWG2.0	P <sub>35S</sub> , T <sub>35S</sub> , eGFP, attR1, attR2, ccdB, Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Binärer Vektor für carboxyterminale eGFP- Fusion	VIB
pK7WGF2.0	P <sub>35S</sub> , T <sub>35S</sub> , eGFP, attR1, attR2, ccdB, Cm <sup>r</sup> , Kan <sup>r</sup>	Binärer Vektor für aminoternale eGFP- Fusion	VIB
pDEST15	PT7, RBS, GST-tag, attR1, attR2, ccdB, Cm <sup>r</sup> , PT7, bla, Promotor, Amp <sup>r</sup> , pBR322 origin, ROP, orf	Expressionsvektor für aminoternale GST- Fusion	Invitrogen
pBGWFS7	attR1, attR2, ccdB, Ba <sup>r</sup> , Sm/Sp <sup>r</sup> , Ba <sup>r</sup> , GUS, eGFP	Expressionsvektor für Promotor GUS/GFP- Fusion	VIB

pB7GWIWG2	P <sub>35S</sub> , attR1, ccdB, attR2, Cm <sup>r</sup> , attR2, ccdB, attR1, T <sub>35S</sub> Ba <sup>r</sup> , Sm/Sp <sup>r</sup>	RNAi-Linie	VIB
miR319a pBSK (pRS300)	B reverse, T3 promotor, miR319a, T7 promotor, A forward, Amp <sup>r</sup>	amiRNA	Weigelworld.org
pBluescript	pUCori, P Lac, MCS, lac Z', f1+ori, Amp <sup>r</sup>	amiRNA	Stratagene
pPIC9K	5' AOX1, Amp <sup>r</sup> , pBR322, 3' AOX1, Kan <sup>r</sup> ; HIS4 ORF, TT, Sekretionssignal	Expressionsvektor in <i>Pichia pastoris</i>	Invitrogen
pPIC3,5	5' AOX1, Amp <sup>r</sup> , pBR322, 3' AOX1, Kan <sup>r</sup> ; HIS4 ORF, TT	Expressionsvektor in <i>Pichia pastoris</i>	Invitrogen
pPICZαA	5' AOX1, Ori Puc, CYC1 TT, Zeocin <sup>r</sup> , P <sub>EM7</sub> , P <sub>TEF1</sub> , AOX1 TT, α-Faktor, c-myc-epitop, 6 x His	Expressionsvektor in <i>Pichia pastoris</i>	Invitrogen

Tab. 2.5: Verwendete Vektoren

## 2.5 Anzuchtbedingungen der Mikroorganismen

### 2.5.1 Anzucht von *Escherichia coli*

*E. coli* Stämme wurden entweder bei 37°C auf LB-Agar oder in LB-Medium bei 230 rpm üN kultiviert. Den Medien wurde je nach Bakterienstamm und enthaltener Plasmid-DNA die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

### 2.5.2 Anzucht von *Pichia pastoris*

100 ml *P. pastoris* wurde üN bei 30°C in BMGY bei 250 rpm angezogen bis eine OD<sub>600</sub> von 2 - 6 erreicht war. Zur Expression wurde nach Abzentrifugation (3000 x g, 5 min) bei RT das Pellet in BMMY (ca. 10 - 20 ml) aufgenommen. Für weitere Induktionen wurden täglich 100 % Methanol zu einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) zugegeben.

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

*Pseudomonas* Stämme wurden für längere Aufbewahrung auf King's B-Agar, für Wachstumsversuche auf LB-Agar, etwa 24 - 48 h bei 28°C inkubiert. Für Flüssigkulturen wurde stets King's B-Medium verwendet und bei 28°C und 180 rpm üN kultiviert. Die Pellets der Kulturen wurden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und mit MgCl<sub>2</sub> auf eine bestimmte Zelldichte eingestellt.

## 2.5.4 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Anzucht von *A. tumefaciens* wurde auf LB-Platten mit Rifampicin, Gentamycin und dem vektorspezifischen Antibiotikum bei 28°C für ca. 48 h vorgenommen. Flüssigkulturen wurden in LB-Medium mit genannten Antibiotika bei 28°C und 230 rpm kultiviert.

## 2.5.5 Anzucht von *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*

*Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* wurden alternierend auf Sakai Agar und 1 x PD-Agar 14 Tage angezogen, wobei *A. brassicicola* im Dunkeln bei RT und *B. cinerea* unter Langtagbedingungen kultiviert wurden. Die Sporenernte erfolgte nach diesem Zeitraum, indem die Platten mit 0,1 % Tween 20 überschichtet und mit einem Drigalski-Spatel die Oberfläche abgerieben wurde. Das erhaltene Material wurde über Miracloth (Cal Biochem, LaJolla, USA) gefiltert und 2 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Mittels Fuchs-Rosenthal-Kammer wurde die Sporenanzahl bestimmt und die Suspension mit Wasser auf 4 x 10<sup>7</sup> Sporen/ml eingestellt. 50 % (v/v) Glycerin wurden zugesetzt und die Aliquots bei - 80°C gelagert.

## 2.6 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

### 2.6.1 Verwendete *Arabidopsis thaliana* Linien

Für alle durchgeführten Pflanzenversuche wurden Wildtyp-Pflanzen der Spezies *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia 0* (Col-0) bzw. *Arabidopsis thaliana* var. *Wassilewskija* (Ws) sowie in diesen Ökotypen hergestellte Knock-Out (KO)-Linien verwendet.

Alle verwendeten KO-Linien stammten vom Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC) (Alonso et al.; 2003) bzw. wurden von anderen Arbeitsgruppen erhalten und sind in Tab. 7.2 zusammengefasst. Die in Tab. 2.6 zusammengefassten Linien sind diejenigen, die in dieser Arbeit für den Hauptteil der Experimente verwendet wurden.

Nummer	T-DNA-	ATG	Lokalisation der T-DNA	Referenz
Sail129_B07	<i>atg5-1</i>	<i>ATG5</i>	4. Intron	von R. Vierstra erhalten
Gabi294_F10	<i>atg5-2</i>	<i>ATG5</i>	300-UTR5-Region	Von R. van der Hoorn erhalten
-	<i>atg5-1/ATG5-1</i>	<i>ATG5</i>	komplementiert	von R. Vierstra erhalten
-	<i>atg7</i>	<i>ATG7</i>	10. Intron	von R. Vierstra erhalten
-	<i>atg7/ATG7</i>	<i>ATG7</i>	komplementiert	von R. Vierstra erhalten
-	<i>atg10</i>	<i>ATG10</i>	4. Exon	von R. Vierstra erhalten
-	<i>atg10/ATG10</i>	<i>ATG10</i>	komplementiert	von R. Vierstra erhalten
-	<i>atg18a-1</i>	<i>ATG18a</i>	RNAi-Linie	von D. Bassham erhalten
Gabi651_D08	<i>atg18a-2</i>	<i>ATG18a</i>	1. Exon	von R. van der Hoorn erhalten
-	<i>ami-RNA atg1</i>	<i>ATG1</i>	amiRNA-Linie	diese Arbeit
-	<i>atg1-RNAi</i>	<i>ATG1</i>	RNAi-Linie	diese Arbeit

Tab. 2.6: Hauptsächlich verwendete Knock-Out-Linien und RNAi- bzw. amiRNA-Linien

### 2.6.2 Anzuchtbedingungen

Samen von *A. thaliana* wurden entweder auf mit Vermikulit versetzter dampfsterilisierter GS90-Erde (Gebr. Patzer GmbH) ausgesät oder nach Oberflächensterilisation durch Chlorgas auf  $\frac{1}{2}$ -MS-Medium ausgelegt. Für Letzteres wurden 50 ml 12 % (v/v) Natriumhypochlorit-Lösung mit 1,5 ml 37 % HCl im Exsikkator zusammengeführt und dieser unmittelbar danach geschlossen. Nach 3 - 16 h Chlorgassterilisation wurden die Samen für 30 min unter die Sterilbank gestellt, um das Restgas entweichen zu lassen und anschließend ausgesät. Nach Stratifikation für mindestens zwei Tage bei 4°C in Dunkelheit wurden die Pflanzen entweder unter Langtag- (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) oder Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) bei 150  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ , 22°C und einer relativen Luftfeuchte von 40 - 60 % kultiviert.

*Nicotiana benthamiana* Pflanzen wurden im Gewächshaus angezogen (13 h Licht, 11 h Dunkelheit). Die Aussaat erfolgte in Mischerde (Einheitserde P, Einheitserde T, Sand, 2:2:1 + 0,1 % (v/v) Konfidor).

### 2.6.3 *Arabidopsis* Zellkulturbedingungen und Protoplastierung

Für Lokalisationsstudien verschiedener ATGs wurden *A. thaliana* var. *Columbia* (Col-0) Protoplasten aus Zellkultur gewonnen und präpariert (Negrutiu et al.; 1987). Die Zellen wurden bei 26°C und 120 rpm in MS-Medium angezogen, wobei alle 7 Tage 15 ml Kultur in 35 ml frisches Medium überimpft wurde.

### 2.6.4 Transiente Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten

Zellen einer drei Tage alten Vorkultur wurden nach 5-minütiger Zentrifugation bei 400 x g geerntet und mit enzymfreiem Zellwandverdauungspuffer (8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 M Mannitol; pH 5,5) gewaschen (2 x 10 ml). Anschließend wurden die Pellets in 2 x 7 ml Zellwandverdauungspuffer (1 % (v/v) Zellulase, 0,25 % (v/v) Mazerozym, 8 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 M Mannitol; pH 5,5) resuspendiert und auf einer Petrischale verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 6 h (26°C im Dunkeln, 50 rpm) wurden die Protoplasten bei 100 x g für 5 min geerntet. Erneut wurden 2 x 10 ml Protoplasten mit enzymfreiem Zellwandverdauungspuffer gewaschen und anschließend bei 100 x g für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in der verbleibenden Lösung vorsichtig resuspendiert und mit 10 ml W5-Lösung (154 mM NaCl, 125 mM  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 5 mM KCl, 5 mM  $\alpha$ -D-Glukose; pH 5,8 - 6,0) äquilibriert. Von einem Aliquot wurde nach Aufnahme in W5-Lösung die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die verbleibenden Protoplasten zentrifugiert und das Pellet zu einer Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Protoplasten/ml in MMM-Lösung

(15 mM  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 % (w/v) MES, 0,5 M Mannitol; pH 5,8) eingestellt und zu 250  $\mu\text{l}$  aliquotiert. Zu einem Aliquot wurden 20  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA gegeben und sehr langsam 250  $\mu\text{l}$  PEG-Lösung (40 % (v/v) PEG 4000, 0,4 M Mannitol, 0,1 M  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ; pH 8,0 - 9,0) dazupipettiert und der Ansatz für 15 - 20 min bei RT inkubiert. Darauf folgend wurden allmählich 10 ml W5-Lösung zugegeben, abzentrifugiert und die Zellen in 2 ml K3-Lösung (1,5 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 9 g/l  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 25 g/l  $\text{KNO}_3$ , 2,5 g/l  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 1,34 g/l  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2,5 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) aufgenommen und bei 26°C für 20 h im Dunkeln inkubiert.

Als Positivkontrolle der Transformationseffizienz wurde der Vektor cF203 (K. Schumacher) verwendet, der GFP5 (S65T) unter Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert.

Als möglicher Stimulus der Autophagosomenbildung wurde ein Teil der Protoplasten, anstatt in der K3-Lösung, in einem Mangelmedium inkubiert (M0529, Sigma-Aldrich). Zusätzlich wurden weitere in Tab. 2.7 angegebene Komponenten zugefügt.

Bestandteil	Menge/l [ml]
Mangelmedium M0529; pH 5,7	100
0,3 M $\text{CaCl}_2$	10
1,5 M $\text{MgSO}_4$	1
0,5 M KCl	10
0,2 M MES	1
1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,25
dd $\text{H}_2\text{O}$	126,75

Tab. 2.7: Zusammensetzung des für die Autophagie-Induktion verwendeten Mangelmediums

### 2.6.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis* Pflanzen mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Eine Vorkultur selektierter Agrobakterien (siehe Kap. 2.5.4) wurde in 500 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotika überimpft und für weitere 18 - 24 h bei 250 rpm kultiviert. Die Kultur wurde anschließend abzentrifugiert (20 min, 5500 rpm) und in frisch angesetzter 5 % (w/v) Saccharose zu einer optischen Dichte von 0,8 eingestellt. Nach Zugabe von 0,02 % (v/v) Silwet wurden junge Blütenstände der zu transformierenden Pflanzen für 1 min in die Bakteriensuspension getaucht (Bechtold und Pelletier; 1998, Clough und Bent; 1998). Für eine erhöhte Luftfeuchtigkeit wurden die benetzten Pflanzen in Plastiktüten verpackt und weitere 24 h inkubiert. In den Folgegenerationen wurde mittels Antibiotika-Resistenz nach tatsächlich transformierten Pflanzen gescreent.

## 2.7 Molekularbiologische Techniken

### 2.7.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden

#### 2.7.1.1 Agarosegelelektrophorese

Plasmid-DNA nach Restriktionsspaltung (Kap. 2.7.1.3) bzw. amplifizierte PCR-Produkte (Kap. 2.7.1.5) wurden mit Probenpuffer (5 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM Tris/HCl; pH 7,5 und 0,025 % (w/v) Bromphenolblau bzw. Orange G) versetzt und auf ein 1%iges (w/v) horizontales Agarosegel (mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V für 10 - 40 min in 1 x TAE-Puffer (2 M Tris/Acetat; pH 8,0, 100 mM EDTA; pH 8,0). Als Größenstandard dienten 2,5 µg des GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder-Markers von Fermentas. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele mit Hilfe des UV-Transilluminators (Infinity-3026 WL/26 MX, PeqLab) betrachtet und mit dem Analyseprogramm Infinity Capt Version 14.2 (PeqLab) ausgewertet.

#### 2.7.1.2 DNA-Analyse über Sequenzierung

Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. 1 µg eingedampfte Plasmid-DNA aus einer Plasmidpräparation über Säulchen (Qiagen) bzw. aufgereinigte PCR-Produkte (20 ng/100 bp Länge des Fragments) wurden für die Sequenzierreaktion benötigt. Dazu wurden Standardprimer und mitgelieferte genspezifische Primer verwendet. Die Sequenzdaten wurden mit der Lasergene DNA\*STAR-Software und Vector NTI (Invitrogen) analysiert.

#### 2.7.1.3 DNA-Analyse über Restriktionsenzyme

Ein Gemisch von 5 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl Restriktionsenzym bzw. 2 x 1 µl verschiedener Restriktionsenzyme wurde mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und mindestens 1 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Restriktionsansätze wurden nach den Protokollen von Fermentas oder New England Biolabs durchgeführt.

#### 2.7.1.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Nukleinsäurekonzentration wurde mittels eines Spektralphotometers (Ultraspec 2100 pro, Amersham) in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Über die folgenden Formeln lässt sich die Konzentration von dsDNA bzw. RNA ermitteln:

dsDNA:  $E_{260} = 1 \triangleq 50 \mu\text{g/ml}$ ; RNA:  $E_{260} = 1 \triangleq 40 \mu\text{g/ml}$

### 2.7.1.5 Allgemeine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifizierung von Nukleinsäureabschnitten wurde der „DNA Engine PTC-200“-Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) verwendet. Genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA bzw. Bakterienkolonien wurden als Matrize eingesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 20 µl wurden 2 µl 10 x PCR-Puffer (10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Triton-X-100; pH 9,0), je 1 µl der jeweiligen Oligonukleotide (10 µM), 2 µl der dNTP-Stammlösung (2,5 mM) und 2 - 10 U der Polymerase (*Pfu* oder *Taq*) der jeweiligen DNA zugeführt und mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide für Genotypisierungen und Resttranskriptanalysen der hauptsächlich verwendeten Linien findet sich in Tab. 2.13. Alle weiteren Oligonukleotide und deren Verwendung sind in Tab. 7.1 aufgelistet.

Nach einer anfänglichen Denaturierungsphase bei 94°C für 2 min folgte für jedes Primerpaar eine spezifische Anzahl von Zyklen. Der Denaturierungsphase (94°C, 30 s) folgte die Hybridisierungsphase (Temperatur primerabhängig, siehe Tab. 2.13, 30 s). Die Elongationszeit, abhängig von der Fragmentlänge, erfolgte bei 72°C. Nach Durchlauf der Zyklenanzahl wurde die Polymerisation für weitere 10 min bei 72°C fortgesetzt und der Reaktionsansatz anschließend auf 12°C gekühlt.

### 2.7.1.6 PCR zur Amplifikation langer Fragmente

Für die Amplifikation langer Fragmente, deren Klonierung sich als schwierig erwies, wurden in drei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen (Abb. 2.1) überlappende DNA-Fragmente generiert.

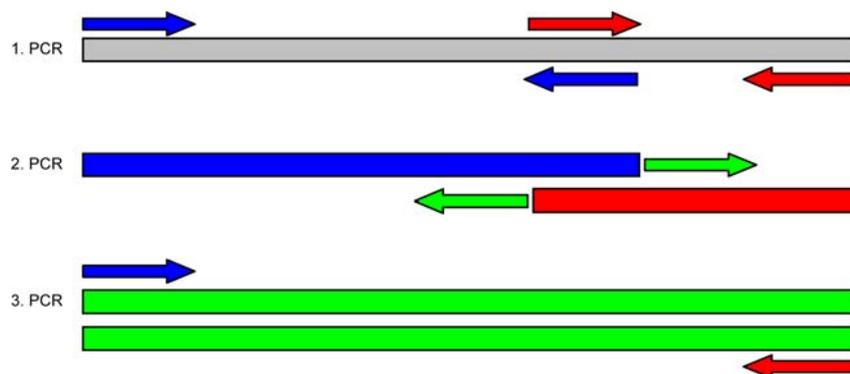


Abb. 2.1: Amplifikation langer Fragmente

Die einzelnen Schritte sind in Tab. 2.8 zusammengefasst. Die 1. PCR wurde mit komplementären Primern und Primern, die Anfang und Ende des zu amplifizierenden Fragments trugen, durchgeführt. Die zwei daraus resultierenden überlappenden Fragmente führten in der 2. PCR zur Vervollständigung des gesamten DNA-Doppelstranges. Die 3. PCR diente zur Amplifikation des kompletten Fragmentes.

Bestandteil	Menge [ $\mu$ l]	1. PCR	Temperatur	Zeit
10 x Pfu-Puffer	5		1) 94°C	2 min
2,5 mM dNTPs	5		2) 94°C	30 s
10 $\mu$ M forward-Primer	2,5		3) 60°C	30 s
10 $\mu$ M reverse-Primer	2,5		4) 72°C	2 min/kb
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	1		30 x zu 2)	
cDNA oder Plasmid	1		72°C	10 min
ddH <sub>2</sub> O	33		12°C	Ende

Bestandteil	Menge [ $\mu$ l]	2. PCR	Temperatur	Zeit
10 x Pfu-Puffer	4		1) 94°C	2 min
2,5 mM dNTPs	4		2) 94°C	15 s
Fragment 1 von 1. PCR	2		3) 45°C	30 s
Fragment 2 von 1. PCR	2		4) 72°C	2 min/kb
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	1		5 x zu 2)	
ddH <sub>2</sub> O	25		72°C	10 min
			12°C	Ende

Bestandteil	Menge [ $\mu$ l]	3. PCR	Temperatur	Zeit
10 x Pfu-Puffer	5		1) 94°C	2 min
2,5 mM dNTPs	5		2) 94°C	30 s
10 $\mu$ M forward-Primer	2,5		3) 60°C	30 s
10 $\mu$ M reverse-Primer	2,5		4) 72°C	2 min/kb
2. PCR	10		30 x zu 2)	
Fragment 1 von 1. PCR	2,5		72°C	10 min
Fragment 2 von 1. PCR	2,5		12°C	Ende
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	1			
ddH <sub>2</sub> O	19			

Tab. 2.8: PCR-Protokoll für die Amplifizierung langer Fragmente

### 2.7.1.7 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und PCR-Produkten

Das QIAquick *gel extraction kit* (Qiagen) wurde sowohl zur Aufreinigung von PCR-Produkten, als auch zur Aufreinigung von Ethidiumbromid-angefärbten DNA-Gelstücken verwendet, die unter UV-Licht ausgeschnitten wurden.

## 2.7.2 Klonierung von DNA

Die meisten hergestellten Konstrukte wurden über die Gateway<sup>TM</sup>-Technologie (Invitrogen) hergestellt (Kap. 2.7.2.1). Einige Konstrukte wurden herkömmlich kloniert (Kap. 2.7.2.2).

### 2.7.2.1 Klonierung mit Hilfe der Gateway<sup>TM</sup>-Technologie

In einer ersten PCR-Reaktion wurden genspezifische Adaptorprimer (angegeben in Tab. 7.1) verwendet, der ausgewählte Bereich amplifiziert und in einer zweiten PCR-Reaktion mit den Gateway-Primern attB1 und attB2 verlängert.

1. PCR

Bestandteil	Menge [µl]
10 x Pfu-Puffer	2
2,5 mM dNTPs	2
10 µM forward-Primer	1
10 µM reverse-Primer	1
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	0,5
cDNA oder Plasmid	1
ddH <sub>2</sub> O	12,5
Temperatur	Zeit
1) 95°C	1 min
2) 94°C	15 s
3) 45°C	30 s
4) 68°C	2 min/kb
5 x zu 2)	
5) 94°C	15 s
6) 55°C	30 s
7) 68°C	2 min/kb
20 x zu 5)	
12°C	Ende

Tab. 2.9: Gateway-PCR-Ansätze

2. PCR

Bestandteil	Menge [µl]
10 x Pfu-Puffer	4
2,5 mM dNTPs	4
10 µM attB1-Primer	8
10 µM attB2-Primer	8
<i>Pfu</i> -DNA Polymerase	1
Fragment 1 von 1. PCR	1
ddH <sub>2</sub> O	14
Temperatur	Zeit
1) 94°C	2 min
2) 94°C	15 s
3) 50 - 60°C	30 s
4) 72°C	2 min/kb
10 x zu 2)	
72°C	10 min
12°C	Ende

Das PCR Produkt wurde aufgereinigt (Kap. 2.7.1.7) und die Konzentration spektrophotometrisch bestimmt (Kap. 2.7.1.4). Dieses aufgereinigte PCR-Produkt wurde anschließend für die BP Reaktion (Invitrogen) eingesetzt, die über Rekombination den *entry*-Klon erzeugt. Als Eingangsvektoren wurden pDONR201 (Kanamycin-Resistenz) und pDONR207 (Gentamycin-Resistenz), die in *E.coli* DB3.1 Zellen propagiert wurden, verwendet.

Bestandteil	Menge [µl]
Donorvektor (150 ng/µl)	1
attB PCR-Produkt (≥ 10 ng/ µl)	1
5 x BP Klonase-Reaktionspuffer	2
TE-Puffer; pH 8,0	4
BP Rekombinase-Mix	2

Tab. 2.10: Pipettierschema der BP-Reaktion

Der Ansatz wurde üN bei 25°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Reaktionsansatzes mit 2 µl Proteinase K für 10 min bei 37°C wurden 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* DH5α Zellen mit 4 µl BP Reaktion transformiert (Kap. 2.7.2.5).

Bestandteil	Menge [µl]
<i>entry</i> -Klon (100 - 300 ng)	1
Zielvektor 150 ng/ µl)	1
5 x LR Klonase-Reaktionspuffer	2
TE-Puffer; pH 8,0	4
LR Klonase-Enzymmix	2

Tab. 2.11: Pipettierschema der LR-Reaktion

Nach Verifizierung des *entry*-Klons über Restriktions-Analyse (Kap. 2.7.1.3) mit anschließender Sequenzierung (Kap. 2.7.1.2) wurden 100 - 300 ng für die anschließende LR-Reaktion (Invitrogen) verwendet.

Der Ansatz wurde üN bei 25°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Reaktionsansatzes mit 2 µl Proteinase K für 10 min bei 37°C wurden 100 µl chemisch kompetente *E. coli* DH5α Zellen mit 4 µl LR Reaktion transformiert (Kap. 2.7.2.5). Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem entsprechenden Zielvektor-spezifischen Antibiotikum. Nach einer Kolonie-PCR und Plasmidpräparation mit anschließendem Kontrollverdau wurden die Vektoren für Expressionsversuche verwendet. Als Gateway-kompatible Expressionsvektoren wurden pDEST15, pK7FWG2, pK7WGF2, pBGW und pBGWIWG2 verwendet (siehe Tab. 2.5).

### 2.7.2.2 Traditionelle Klonierung - Dephosphorylierung

Zur Unterbindung der Selbstligation des geschnittenen Vektors, wurde dieser direkt nach der Restriktionsspaltung mit der „Antarctic Phosphatase“ der Firma NEB nach Herstellerangaben behandelt.

### 2.7.2.3 Ligation

Die für die Ligation einzusetzende DNA und der Zielvektor wurden zuvor mit entsprechenden Restriktionsenzymen (nach Herstellerangaben, 1 h, 37°C) verdaut. Ein Reaktionsansatz (10 µl) beinhaltet folgende Komponenten:

Komponenten	Volumen [µl]
Zielvektor, 50 - 100 ng	1
Insert (PCR-Fragment bzw. Vektorverdau), 150 - 200 ng	y (1 - 6)
ddH <sub>2</sub> O	6 - y
10 x T4 Ligasepuffer	1
T4 Ligase (1 U/µl)	2

Tab. 2.12: Pipettierschema eines Ligationsansatzes

Die Ligationsansätze wurden üN bei 14°C inkubiert. Vor der Transformation wurde für 10 min eine Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C durchgeführt.

### 2.7.2.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Kompetente *E. coli* Zellen des Stammes DH5α wurden mittels Calciumchlorid-Methode hergestellt (Inoue et al.; 1990), aliquotiert und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80°C gelagert.

### 2.7.2.5 Transformation von *E. coli*

In vorgekühlten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden 200 µl kompetente DH5α-Zellen mit Plasmid-DNA (ca. 10 ng DNA auf 30 µl Zellen) 30 min inkubiert, und danach einem Hitzeschock von 90 s bei 42°C ausgesetzt. Nach weiterer Inkubation für 5 min auf Eis wurden 800 µl LB-Medium zugegeben. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert, damit es zur phänotypischen Expression der Antibiotikaresistenz kommen kann. Zwischen 100 - 600 µl Bakteriensuspension wurden auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert.

### 2.7.2.6 Verwendete Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für Klonierungen, Genotypisierungen, RT-PCRs und Sequenzierungen sind in Tab. 7.1 aufgelistet. Alle verwendeten Oligonukleotide für Genotypisierungen und Resttranskript- (RT-)Analysen der in dieser Arbeit hauptsächlich charakterisierten Linien befinden sich in Tab. 2.13.

Name	Sequenz	T <sub>Schmelz</sub>	Verwendung
atg5-3	atg gcg aag gaa gcg gtc a	62.,2	Genotypisierung <i>atg5-1</i> und RT- <i>atg5-1</i>
atg5-6RP	atc act ctg aga cat gtt c	55,85	Genotypisierung <i>atg5-1</i> und RT- <i>atg5-1</i> und <i>atg5-2</i>
at5g17290-R1	tca cct ttg agg agc ttt cac	60,61	Genotypisierung <i>atg5-1</i>
Sail LB	gct tcc tat tat atc ttc cca aat tac c	60,70	Genotypisierung <i>atg5-1</i>
N854665LP	aag caa gtt tca ggt gtc tc	58,35	Genotypisierung <i>atg5-2</i>
N854665RP	taa gag gaa tca aca gag gc	58,35	Genotypisierung <i>atg5-2</i>
Atg5-F	att cac ttc ctg ctg gtc aag	60,61	RT- <i>atg5-2</i>
GABI_Kat_Lba	ccc att tgg acg tga atg tag aca c	63,00	Genotypisierung <i>atg5-2</i> und <i>atg18-2</i>
at5g45900F4	atg gta atg cgc cat ggt gc	62,45	Genotypisierung und RT <i>atg7</i>
at5g45900R4-2	atc tac agc tac atc gtc atc	58,66	Genotypisierung und RT <i>atg7</i>
7 lba r	tcc ttc aat cgt tgc ggt tct gtc agt tc	67,45	Genotypisierung <i>atg7</i>
Atg10f	atg gat tca gct cga gag gtc agc g	67,86	Genotypisierung und RT <i>atg10</i>
Atg10r	aca ggg atg tag ctt gaa cca tgg cct gtt	68,73	Genotypisierung und RT <i>atg10</i>
10 lba	tgg ttc acg tag tgg gcc atc g	66,40	Genotypisierung <i>atg10</i>
62770LP	att tcg atcgtggcgggtg	62,32	Genotypisierung <i>atg18</i>
62770RP	acacacatccagaaacagc	58,01	Genotypisierung <i>atg18</i>
eF1α-s	tca cat caa cat tgt ggt cat tgg	59,30	RT-Analyse-Kontrollprimer
eF1α-as	ttg atc tgg tca aga gcc tac ag	60,60	RT-Analyse-Kontrollprimer
at3g62770F1	atg gcc acc gta tct tct tc	60,40	RT- <i>atg18a-1</i> und <i>atg18a-2</i>
at3g62770R1	cta acc act gag cat ttg aa	56,30	RT- <i>atg18a-1</i> und <i>atg18a-2</i>

Tab. 2.13: Oligonukleotide für Genotypisierungen und Resttranskript (RT)-Analysen

### 2.7.2.7 Ansetzen von Glycerinkulturen

Zur Lagerung von *E. coli*-Kulturen wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu wurde in einem Verhältnis von 1:1 40%iges Glycerin mit der Bakterienkultur vermischt, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert.

## 2.7.3 DNA-Präparationen

### 2.7.3.1 Isolation von DNA aus Bakterien

Die Plasmid-DNA wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse aus 5 ml Übernachtskulturen von Bakterien gewonnen (Birnboim und Doly; 1979). Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der DNA erfordern, wie Sequenzierungen oder Protoplastentransformationen, wurde die Plasmid-DNA mit dem QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) über Säulchen nach Herstellerangaben präpariert. Bei Bedarf großer Mengen reiner Plasmid-DNA, wurden 100 ml Übernachtskultur mit dem QIAfilter™ Plasmid Midi Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

### 2.7.3.2 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen

Für Genotypisierungen wurde die Edwards-Methode angewendet (Edwards et al.; 1991). Jeweils 1 Blatt wurde mechanisch und chemisch mit 200 µl Edwards-Puffer (0,2 M Tris/HCl; pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA; pH 8,0, 0,5 % (w/v) SDS) aufgeschlossen. Nach 5 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde der Überstand abgenommen und mit 200 µl Isopropanol für 1 h bei RT gefällt. Die präzipitierte DNA wurde bei 4°C für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert und das Pellet mit 500 µl 70-%igem (v/v) Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde das Pellet an der Luft 1 h getrocknet und, je nach eingesetztem Blattmaterial, in 20 - 50 µl 10 mM Tris/HCl; pH 8,5 üN bei 4°C gelöst. Die Aufbewahrung genomischer DNA erfolgte bei 4°C.

## 2.7.4 DNA-Analytik

### 2.7.4.1 Genotypisierung von Transfer-DNA (T-DNA) Insertionslinien

Der Genotyp aller verwendeten Knock-Out-Linien wurde mittels Genotypisierung bestimmt. Da *A. thaliana* diploid ist, können die T-DNA-Insertionen segregieren. Deshalb wurden von jeweils 16 Pflanzen 2 PCR-Reaktionen parallel durchgeführt, die eine Unterscheidung zwischen homozygot Wildtyp (WT), homozygot Knock-Out (KO) oder heterozygot erlaubten.

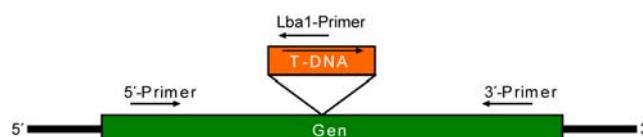


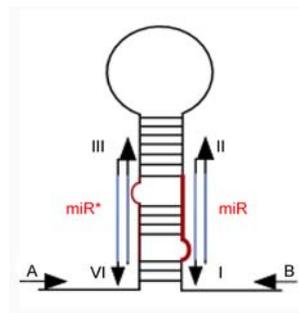
Abb. 2.2: Überprüfung der T-DNA Insertion über genspezifische und insertspezifische Primer

Wie Abb. 2.2 zeigt, wurden dazu genspezifische Primer verwendet, die 5' und 3' von der T-DNA Insertion liegen und eine Amplifikation des natürlichen, nicht durch die T-DNA Insertion unterbrochenen Genfragments erlauben (Wildtyp-PCR). Parallel dazu wurde ein T-DNA spezifischer Lba-Primer mit einem genspezifischen Primer kombiniert. So wurde eine Amplifikation des durch die Insertion neu entstandenen Fragments ermöglicht (Lba-PCR). Sollten homozygote KO-Pflanzen vorliegen, würde nur in der zweiten PCR ein Produkt zu erwarten sein. Für weitere funktionelle Analysen wurde ausschließlich mit homozygoten KOs weitergearbeitet.

### 2.7.4.2 „Gene silencing“ durch amiRNA-Linien und RNAi-Linien

#### amiRNA-Linien

amiRNAs (artifizielle microRNAs) sind einzelsträngige RNAs aufgebaut aus 21 Nukleotiden, die normalerweise in Pflanzen nicht vorhanden sind, die aber von endogenen miRNA-Vorläufern prozessiert werden und so spezifisch die Expression des Zielgens ausschalten (Reynolds et al.; 2004). Mit Hilfe des Web microRNA Designer (WMD; <http://wmd.weigelworld.org>) konnten aus vier gegebenen Primersequenzen (siehe Abb. 2.3) eine artifizielle 21mer microRNA hergestellt werden (Schwab et al.; 2005), die über gezielte Mutagenese in den Vektor miR319a pBSK (pRS300) eingeschleust wurde. Als Zielsequenz wurden die Gene *ATG1* und das „single-copy-gene“ *ATG7* gewählt. Das microRNA-Design wurde für *ATG1* so gewählt, dass es gegen die ganze *ATG1*-Familie (*At3g61960*, *At2g37840* und *At3g53930*) gerichtet sein sollte. Die Klonierungsstrategie ist in Abb. 2.3 und Tab. 2.14 gezeigt.



**Abb. 2.3: Herstellung von amiRNA-Linien über microRNAs**

6 Primer wurden verwendet, Primer I: microRNA forward; Primer II: microRNA reverse; Primer III: miR\* forward; Primer IV: miR\*reverse, sowie die Primer A und B (Plasmidsequenz).

Es wurden drei überlappende PCR-Reaktionen (1 - 3) durchgeführt, die in der PCR 4 mit den Primern A und B fusioniert wurden. PCR-Ansätze sind in Tab. 2.15 zusammengefasst.

PCR	Forward-Primer	Reverse-Primer	Template
1	A	IV	pRS300
2	III	II	pRS300
3	I	B	pRS300
4	A	B	1, 2, 3

**Tab. 2.14: Klonierungsstrategie zur Herstellung von amiRNA**

Bestandteil	Menge [ $\mu$ l]		Temperatur	Zeit
10 x Pfu-Puffer	5	PCR 1 PCR 2 PCR 3	1) 95°C	2 min
2,5 mM dNTPs	5		2) 95°C	30 s
10 $\mu$ M forward-Primer	2		3) 55°C	30 s
10 $\mu$ M reverse-Primer	2		4) 72°C	40 s
Plasmid-DNA (1:100)	2		24 x zu 2)	
Pfu-DNA Polymerase	0,5		72°C	7 min
ddH <sub>2</sub> O	33,5		12°C	Ende

Bestandteil	Menge [ $\mu$ l]		Temperatur	Zeit
10 x Pfu-Puffer	5	PCR 4	1) 95°C	2 min
2,5 mM dNTPs	5		2) 95°C	30 s
10 $\mu$ M forward-Primer	2		3) 55°C	30 s
10 $\mu$ M reverse-Primer	2		4) 72°C	1 min 30 s
PCR 1	0,5		24 x zu 2)	
PCR 2	0,5		72°C	7 min
PCR 3	0,5			
Pfu-DNA Polymerase	0,5		12°C	Ende
ddH <sub>2</sub> O	34,5			

Tab. 2.15: amiRNA-PCR-Ansätze

Nach erfolgter Amplifikation und Gelextraktion wurde das Fragment einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *BamHI* unterzogen und in den mit den gleichen Enzymen geschnittenen pBluescript-Vektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Mittels Elektroporation wurde das Plasmid anschließend in *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen transformiert und zur Generierung von amiRNA-Pflanzen die *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation (Bechtold und Pelletier; 1998, Clough und Bent; 1998) angewendet.

#### RNAi-Linien

Mit dem Gateway-Vektor pB7GWIWG2 wurde gegen *ATG1* eine RNAi-Linie hergestellt, die ebenfalls über *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelte Transformation in *Arabidopsis* eingebracht wurde.

#### 2.7.4.3 Radioaktive Markierung von Nukleinsäurefragmenten

Die DNA der SALK Southern-Sonde wurde von genomischer DNA amplifiziert. Nach Agarosegelelektrophorese (Kap. 2.7.1.1) und Gelextraktion (Kap. 2.7.1.7) wurde das *Megaprime DNA-labeling kit* (Amersham) verwendet und das Fragment mit 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Amersham) radioaktiv markiert. Die Abtrennung nicht eingebauter Nukleotide wurde über Gelfiltrationschromatographie mit *ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns* (Amersham Pharmacia) erreicht.

#### 2.7.4.4 DNA-Hybridisierung (Southern Blot)

Pflanzliche DNA von Wildtyp und T-DNA Insertionslinien wurde in einem Gesamtansatz von 100 µl mit 3 µl des jeweils angegebenen Restriktionsenzym bei 37°C üN verdaut. Die verdaute DNA wurde mit 10 µl 3M NaAc; pH 5,2 und 300 µl 100 % (v/v) EtOH gefällt und nach 5 min Inkubation bei RT für 20 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Pellets wurden 5 min mit 1 ml 70 % (v/v) EtOH gewaschen und für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Nach Lufttrocknung wurde das Pellet für 30 min bei 65°C in ddH<sub>2</sub>O geschüttelt (Thermoblock, 1000 rpm) und die DNA bei 100 V in einem 0,8%igen Agarosegel für ca. 2,5 h aufgetrennt. Das Gel wurde 10 -15 min im EtBr-Bad gefärbt (0,5 µg/ml) und die Markerbanden mit einem Skalpell eingeritzt, dann 2 x für 15 min in 0,25 M HCl geschwenkt und 2 x 15 min in Denaturierungs-Lösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und 2 x 30 min in Ammoniumacetat-Lösung (1 M Ammoniumacetat, 0,1 N NaOH) bei RT inkubiert. Mittels Kapillarkblocktechnik (Southern; 1992) wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylon-Membran (GE Healthcare) üN transferiert und durch 1-stündige Inkubation bei 80°C kovalent an die Membran gekoppelt.

Zur Sondenherstellung wurde das *Megaprime DNA-labeling kit* (Amersham) verwendet und 25 ng gereinigte SALK-DNA mit 5 µl Primer-Lösung bei 95°C für 5 min denaturiert und kurz bei 4°C zentrifugiert. Unmittelbar vor Verwendung wurden je 4 µl der dNTPs dATP, dTTP und dGTP mit 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 16 µl ddH<sub>2</sub>O, 2 µl Enzym Klenow und 5 µl [ $\alpha^{32}$ P]-dCTP bei 37°C für 10 min inkubiert und 0,2 M EDTA zugegeben.

Währenddessen wurde die Membran in der Hybridisierungsröhre mit 20 ml Church-Puffer (0,25 M NaHPO<sub>4</sub>; pH 7,2, 1 % (w/v) BSA, 1 mM EDTA, 7 % (w/v) SDS) versetzt und im Rotationsinkubator für 30 min bei 65°C inkubiert. Die Prähybridisierungslösung wurde verworfen und durch 25 ml Church-Puffer mit der Sonde zur Hybridisierung üN bei 65°C ersetzt. Anschließend wurde die Membran in 50 ml Waschpuffer I (1 mM EDTA, 5 % (w/v) SDS, 40 mM NaHPO<sub>4</sub>; pH 7,2) einmal geschwenkt und dann für 20 min bei 65°C gewaschen, 2 x in Waschpuffer II geschwenkt (1 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS, 40 mM NaHPO<sub>4</sub>; pH 7,2), die Membran in Folie eingeschweißt und auf den „Phospho-Screen“ (Fujifilm, BAS cassette 4043) exponiert und nachfolgend am „Phospho-Imager“ (Hitachi FMBIOIII, Multi-View) ausgewertet.

#### 2.7.5 RNA-Analytik

##### 2.7.5.1 Isolierung von RNA aus Pflanzen

Mit der Trizol-Methode (Chomczynski und Sacchi; 1987) wurde je Pflanze aus 1 - 2 Blättern Gesamt-RNA isoliert. Das in Stickstoff eingefrorene Blattmaterial wurde im Eppendorf-Reaktionsgefäß gemörsert und zügig im noch gefrorenem Zustand mit 1 ml Trizol-Reagenz (0,8 M Guanidiumthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Na-Acetat; pH 5,0,

5 % (v/v) Glycerin, 38 % (v/v) saures Phenol) versetzt. Die Zugabe von 200 µl Chloroform mit anschließendem Vortexen für 10 s und Inkubation für 10 min bei RT bewirkte die Phasentrennung. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die RNA in der oberen wässrigen Phase von der unteren Phase getrennt und mit gleichem Volumen 100 % Isopropanol für 1 h bei RT gefällt und 10 min bei 4°C und 13.000 rpm präzipitiert. Anschließend wurde das RNA-Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, 1 h luftgetrocknet und in 20 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.7.5.2 Ermittlung der Transkriptmenge mittels semiquantitativer RT-PCR

Nach der Isolierung von RNA aus Blattmaterial wurde eine Erststrangsynthese mit der M-MuLV Reverse Transkriptase (MBI Fermentas) und einem Oligo-dT-Primer nach Herstellerangaben durchgeführt. 1 µg Gesamt-RNA wurde als Ausgangsmaterial eingesetzt. Für anschließende PCR-Reaktionen wurde 1 µl cDNA eingesetzt. Als Kontrolle wurde stets ein Fragment des konstitutiv exprimierten Elongationsfaktors EF1 $\alpha$  amplifiziert.

## 2.8 Proteinanalytik

### 2.8.1 Überexpression von Proteinen

#### *E.coli*

Für GST-Fusionen im pDEST15-Vektor wurden BL21-AI-Zellen mit 5 - 10 ng Plasmid-DNA transformiert (Kap. 2.7.2.5) und auf LB-Carb-Platten selektioniert. Jeweils drei Transformanten wurden in LB-Carb kultiviert und die OD<sub>600</sub> bestimmt. Diese Kultur wurde in 50 ml LB-Carb auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 eingestellt und bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 angezogen. Der Ansatz wurde in 2 x 25 ml aufgeteilt (induziert versus nicht-induziert) und zu der induzierten Kultur 0,01 % (w/v) L-Arabinose hinzugefügt. Beide Kulturen wurden für 1 h und 3 h bei 28°C bzw. 30°C kultiviert und zu den entsprechenden Zeitpunkten 10 ml der Kultur pelletiert (3500 rpm, 5 min) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Pellets wurden mit 1 ml Lyse-Puffer behandelt (500 mM Kaliumphosphat-Puffer; pH 7,8, 400 mM NaCl, 100 mM KCl, 10 % (v/v) Glycerin, 0,5 % (v/v) Triton X-100 und 10 mM Imidazole), dem 1 mg/ml Lysozym zugefügt wurde, und 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend dreimal schockgefroren und bei 42°C aufgetaut, um dann für 10 s sonifiziert (20 %-Einstellung, Bandelin UW 2070) zu werden. Unlösliche Proteine wurden pelletiert (13000 rpm, 4°C, 10 min) und die Konzentration der Überstände bestimmt, die für die Western-Blot Analyse eingesetzt wurden.

*Pichia pastoris*

Der *Pichia* Stamm wurde in 5 ml YPD bei 30°C üN angezogen und in 250 ml YPD überimpft. Erneut wurde eine üN-Inkubation durchgeführt bis eine OD<sub>600</sub> von 1,3 - 1,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden abzentrifugiert (1500 x g, 5 min, 4°C) und das Pellet mit 250 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O behandelt. Nach erneuter Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wurde das Pellet in 125 ml eiskaltem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, zentrifugiert und in 10 ml 1 M Sorbitol aufgenommen. Nach Wiederholung des Zentrifugationsschrittes wurden die Zellen in 0,5 ml 1 M Sorbitol resuspendiert und für die Elektroporation verwendet. 5 -10 µg linearisierte DNA (*ATG1-pPICZαA*) wurde mit 80 µl Zellen gemischt, in eine eiskalte Elektroporationsküvette pipettiert, 5 min auf Eis inkubiert und bei einer Einstellung von 2500 „pulse“ 2 x elektroporiert (Eppendorf Elektroporator 2510). Unmittelbar folgend wurde 1 ml 1 M Sorbitol zugegeben und bei 30°C für 1 h geschüttelt. Die Proben wurden auf MD-Platten ausgestrichen und die Kolonien nach 2 - 3 Tagen in 25 ml BMGY üN bei 30°C angeimpft. Nach Eintreten einer OD<sub>600</sub> von 2 - 6 wurden die Zellen geerntet (3000 x g, 5 min) und eine OD<sub>600</sub> von 1 in BMMY-Medium eingestellt. Alle 24 h wurde 100 % MeOH zu einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) MeOH zugegeben, um die Induktion aufrecht zu erhalten. Zu bestimmten Zeitpunkten (1, 2, 3, 4 d) wurde 1 ml Kultur abzentrifugiert und Pellet und Überstand für Coomassie-Gele bzw. Western-Blots bei - 80°C aufbewahrt. Da das Protein aus dem Vektor *ATG1-pPICZαA* in den Überstand sekretieren sollte, wurde dieser aufkonzentriert und getestet.

**2.8.2 Proteinextraktion**

Für GFP-Western-Blots wurden 100 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff gemörsert und anschließend 200 µl Extraktionspuffer (50 mM Tris/HCl; pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100, 1 Proteaseinhibitor Tablette) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis wurde das Gemisch 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Proteineladepuffer (2 x: 100 mM Tris; pH 6,8, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) BPB, 20 % (v/v) Glycerin, 200 mM β-MSH) versehen.

Für MAPK-Western-Blots wurde ein Blatt mit einem Metallstößel zu Pulver zerrieben und 100 µl Extraktionspuffer zugegeben (50 mM Tris/HCl; pH 7,5, 1 Tablette/10 ml phosSTOP (Roche), 1 Tablette/ 10 ml COMPLETE (Roche)). Nach Auftauen auf Eis wurde der Extrakt 20 min bei 14000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Proben mit Ladepuffer (1 x: 50 mM Tris/HCl; pH 6,8, 100 mM Dithiothreitol, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v) Glycerin) versehen, 5 min bei 95°C erhitzt und auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

### 2.8.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Lösungen wurden nach Bradford mit Eichkurven (Bradford; 1976), auf Basis von Standardalbuminlösungen, mit der gebrauchsfertigen Roti-Quant-Lösung (Roth) oder mit folgender Formel bestimmt:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} = \text{OD}_{595} / (0,0283 \times \text{eingesetztes Volumen [ml]})$$

### 2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli; 1970) wurde die SDS-PAGE nach den Anweisungen von Sambrook (Sambrook; 1998) durchgeführt. Das Acrylamid-Bisacrylamid Gemisch (37,5: 1) wurde als Rotiphorese Gel 30-Lösung bezogen (Roth). In Gelapparaturen der Firma BioRad (München) wurden 10 bzw. 8%ige Trenngele mit 5%igen Sammelgelen verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte für 10 min bei 130 V und für weitere 45 bis 60 min bei 200 V. Als Größenstandard wurde der Protein Molecular Weight Marker oder der Prestained Protein Ladder Marker (Fermentas) verwendet.

### 2.8.5 Detektion von Proteinen durch Coomassie-Färbung

Die Coomassie-Brilliant Blau R-250-Lösung (0,125 % (w/v) Coomassie-Brilliant Blau R-250, 50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Eisessig) wurde zur Anfärbung der in dem SDS-Gel vorhandenen Proteine verwendet. Das Gel wurde mindestens 30 min in der Färbelösung inkubiert, bevor mit der Entfärbelösung (0,5 % (v/v) Eisessig) überschüssiger Farbstoff entfernt wurde. Nach Behandlung in Trockenlösung (30 % (v/v) Methanol, 5 % (v/v) Glycerin, 65 % (v/v) ddH<sub>2</sub>O) für 30 min wurde das Gel in Folie getrocknet.

### 2.8.6 Western-Blot Analyse zur Proteindetektion

Zur Proteindetektion mit spezifischen Antikörpern wurden Proteine nach der SDS-Gelelektrophorese auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Dies wurde mit einem Elektroblood (Mini Trans-Blot Cell von Biorad) bei 100 V für 1 h durchgeführt. Der Proteintransfer wurde durch Ponceau S Rot-Lösung (0,1 % (w/v) Ponceau S Rot, 5 % (v/v) Essigsäure) überprüft, welches ein direktes Anfärben der Proteine auf der Membran erlaubt. Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden für 1 h bei RT mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1 x TBST (150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl; pH 7,6, 0,1 % (v/v) Tween 20) bzw. PBST (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 % (v/v) Tween 20) geblockt. Dem Blockiervorgang folgten drei Waschschriffe in TBST oder PBST für jeweils 5 min.

Für GFP- und GST-Western-Blot Analysen wurde die Membran mit dem primären Antikörper anti-GFP 1: 10.000 in 5 % (w/v) Milchpulver in 0,05 % (v/v) PBST bzw. für die GST-Detektion mit dem Antikörper anti-GST 1: 5000 in 0,05 % (v/v) PBST üN bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschrritten wurde der sekundäre Antikörper „anti-rabbit Peroxidase“ 1: 37500 in 5 % (w/v) Milchpulver in 0,05 % (v/v) PBST zugegeben und nach drei Folgewaschschrritten mit dem ECL-Reagenz detektiert.

Für MAPK-Assays wurde der primäre Antikörper p44/42-MAPK (1:1000, Kaninchen) verwendet und die Membran üN bei 4°C in 10 ml TBST/5 % (w/v) BSA inkubiert. Vor Zugabe des sekundären Antikörpers gegen Kaninchen Immunglobulin G (aus Ziege, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase; 1: 3000) wurde die Membran drei weiteren Waschschrritten in TBST für jeweils 5 min unterzogen. Nach 1-stündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper bei RT und weiteren drei Waschschrritten mit TBST wurde die Membran in Tris pH 9,5-Puffer (150 mM Tris/HCl; pH 9,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl) 2 min äquiliibriert. Eine Anfärbung der Banden wurde durch BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat; 50 mg/ml vorgelöst in 70 % (v/v) Dimethylformamid) und NBT (50 mg/ml Nitrobluetetrazoliumchlorid in 100 % Dimethylformamid) erreicht. Die Stocklösungen wurden jeweils 1: 200 in Tris pH 9,5-Puffer verdünnt. Nach erfolgter Farbreaktion wurde die Membran mehrfach mit Wasser gewaschen.

### 2.8.7 Kinase-Aktivitätstest

Für die Messung der Kinaseaktivität wurde *ATG1c* mit den angegebenen Primern über PCR amplifiziert und in den *Pichia* Sekretionsvektor pPICZ $\alpha$ A kloniert. Nach Expression des Proteins ATG1 (1  $\mu$ g) wurden Kinaseassays durchgeführt. Dazu wurde ein Ansatz mit 1  $\mu$ l [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP, 1  $\mu$ g des jeweiligen Substrats (MBP [Sigma M 1891], Histon [Sigma H5505] oder Kasein [Sigma C4765] + 0,01 % (v/v) Triton X-100) und dem Kinasepuffer (50 mM HEPES, 1 mM DTT, 10  $\mu$ M ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) in einem Endvolumen von 30  $\mu$ l angesetzt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion gestoppt, 1 x SDS-Probenpuffer zugegeben, 5 min bei 95°C erhitzt und einer SDS-PAGE unterzogen (siehe Kap. 2.8.4). Die Gele wurden im Geltdrockner auf Filterpapier fixiert und darauf folgend die Radioaktivität mittels Autoradiographie durch einen Phosphoimager detektiert.

## 2.9 Phänotypische Analysen an *Arabidopsis*-Pflanzen

### 2.9.1 Messung der Blattgröße

Zur Messung der Blattgröße wurde längs der Blattachse ein Messschieber angelegt und pro Pflanze jeweils zwei der „gezackten“ 4 - 5 Wochen alten Blätter ausgemessen. Mindestens 10 Pflanzen pro Linie wurden hierbei verwendet.

### 2.9.2 Seneszenzbestimmungen

Unterschiede der einsetzenden Seneszenz zwischen den einzelnen Linien wurden mit zwei Ansätzen bestimmt. Einerseits wurden die Pflanzen über mehrere Wochen fotografisch dokumentiert, andererseits wurde der „detached leaf assay“ durchgeführt (Weaver et al.; 1998). Einzelne Blätter wurden dabei abgeschnitten und in Wasser in Dunkelheit inkubiert. Nach bestimmten Zeitabständen wurden die Blätter auf eintretenden Chlorophyllverlust untersucht und fotografiert.

### 2.9.3 Messung der Stomataöffnungen

4 - 6 Wochen alte *A. thaliana*-Pflanzen wurden für mindestens 3 Tage ohne Gewächshausdeckel kultiviert und stets feucht gehalten. Da Licht zur Öffnung der Stomata beiträgt und zum Beginn des Experimentes möglichst alle Stomata geöffnet vorliegen sollten, wurde darauf geachtet, dass Pflanzen erst nachmittags für Experimente verwendet wurden (Melotto et al.; 2006). Pro Linie und Behandlung wurden zwei Blätter zweier Pflanzen geerntet und deren Blattunterseiten unmittelbar mit Klebstoff („Uhu hart“) bestrichen. Nach 1 min wurde der getrocknete Klebefilm abgezogen und die so entstandenen Abdrücke mit dem 40er Objektiv am Lichtmikroskop (Nikon Eclipse 80 i) mikroskopiert. Mit der Leica Software und der Aufnahme eines digitalen Lineals wurden die Stomataöffnungen ausgemessen.

### 2.9.4 Infiltrationsexperimente in Blätter und Keimlinge

Toxine, PAMPs und Farbstoffe wurden in Pflanzen und Keimlinge infiltriert. Blätter wurden allgemein mit einer nadellosen Spritze beidseitig der mittleren Blattachse injiziert, Keimlinge wurden 10 s - 1 min vakuuminfiltriert. Das Toxin NLP<sub>PP</sub> aus *Phytophthora* wurde in einer Konzentration von 2 µM infiltriert, Fumonisin B1 (FB1) (Sigma-Aldrich, 34139) in einer Konzentration von 10 µM. PAMPs wie Flg22 und Elf18 wurden in einer Endkonzentration von 1 µM verwendet. Die Farbstoffe Lysotracker Rot und Lysotracker Grün wurden in einer Konzentration von 1 µM, Monodansylcadaverine in einer Konzentration von 0,05 mM verwendet.

### 2.9.5 Analyse des Bakterienwachstums *in planta*

4 - 5 Wochen alte Pflanzen, die unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, fanden für die Wachstumskurvenversuche Verwendung. Für das manuelle Infiltrieren von Blättern mit nadelloser Spritze wurden verschiedenen Pseudomonaden (Tab. 2.1) in einer Dichte von 10<sup>4</sup> cfu/ml verwendet. Für die Sprühinfektion wurde eine Bakteriendichte von 5 x 10<sup>8</sup> cfu/ml benötigt, zusätzlich wurde die Bakteriensuspension mit 0,02 % (v/v) Silwet versetzt und

gleichmäßig auf die Blätter gesprüht. Die Ernte der Blätter erfolgte an den Tagen 0 (4 Blätter), 1, 2 und 4 (jeweils 6 Blätter). Aus jedem Blatt wurden 2 Blattscheiben ausgestochen ( $\varnothing$  0,5 cm) und in 200  $\mu$ l 10 mM  $MgCl_2$  homogenisiert. Jeweils 10  $\mu$ l wurden von unverdünntem Blatt/Bakterien-Extrakt und von verschiedenen Verdünnungen auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und für 24 - 48 h bei 28°C inkubiert. Die Ermittlung des Bakterienwachstums erfolgte anhand der ausgezählten Kolonien. Zur statistischen Auswertung wurde das arithmetische Mittel gebildet, von dem sich dann die jeweilige Standardabweichung ableitet. Die Zahl der unabhängigen Wiederholungen ist bei den jeweiligen Versuchen angegeben.

## 2.9.6 Analyse der Anfälligkeit gegenüber pilzlichen Pathogenen

### 2.9.6.1 Infektion mit *Alternaria brassicicola*

Die für die Applikation auf *A. thaliana* benötigten Sporen wurden wie bereits beschrieben gewonnen (Thomma et al.; 1999). Zur Vermeidung von Positionseffekten wurden die verschiedenen Linien willkürlich im Gewächshaus verteilt. Je Pflanze wurden zwei Blätter mit der Sporenlösung infiziert. Dazu wurden vier bis sechs 5  $\mu$ l-Tropfen pro Blatt aufgetragen. Je nach Aggressivität der Sporenpräparation (Kap. 2.5.5) wurden diese auf  $5 \times 10^5$  Sporen/ml bis  $1 \times 10^6$  Sporen/ml eingestellt. Über einen bestimmten Zeitraum wurden die Pflanzen in feuchter Atmosphäre (abgeklebter Deckel, 100 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert und der Grad der Infektion bonitiert (Kemmerling et al.; 2007). Unterschieden wurde in den Kategorien 1 - 6, wobei 1 gleichzusetzen ist mit „keine Symptome“, 2 = „hellbraune Flecken an betroffenen Stellen“, 3 = „dunkelbraune Flecken an betroffenen Stellen“, 4 = „sich über die betroffene Stelle hinaus ausbreitende Nekrose“, 5 = „Mazerierung des Blattes“ und 6 = „Sporulation“.

Zusätzlich wurde nach sieben Tagen der Läsionsdurchmesser längs der Blattachse gemessen.

Außerdem wurde der Chlorophyllgehalt der einzelnen Linien nach folgender Formel bestimmt (Moran; 1982):

$$\text{Chlorophyll}_{\text{total}} = (7,04 \times A_{664}) + (20,27 \times A_{647})$$

Die „gepoolten“ Blätter (n = 8 - 12) wurden in 8 ml Methanol üN im Kühlraum inkubiert und die Chlorophyllmenge mit dem zuvor gemessenen Frischgewicht in Relation gesetzt.

### 2.9.6.2 Infektion mit *Botrytis cinerea*

Infektionen mit *B. cinerea* wurden mit einer Sporenkonzentration von  $5 \times 10^5$  Sporen/ml in  $\frac{3}{4}$  PDB-Medium durchgeführt. Jeweils zwei Tropfen/Blatt á 5  $\mu$ l wurden benötigt. Eine Inkubation und Auswertung der Pflanzen erfolgte wie in Kap. 2.9.6.1 beschrieben.

### 2.9.6.3 Infektion mit *Hyaloperonospora arabidopsidis*

Am MPI für Züchtungsforschung (Labor von Jane Parker) wurden Infektionsversuche mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* durchgeführt.

Bezeichnung	Wildtyp-Hintergrund	Virulenz
EMWA	Col-0	avirulent
	Ws	virulent
NOCO	Col-0	virulent
	Ws	avirulent
WACO	Col-0	virulent
	Ws	virulent

Tab. 2.16: *Hyaloperonospora arabidopsidis*-Stämme und deren Virulenz

Tab. 2.16 zeigt auf welchem Wildtyp-Hintergrund sich welche Stämme virulent oder avirulent verhalten. EMWA-Infektionen auf Col-0 Hintergrund wurden mit  $4,2 \times 10^5$  Sporen/ml durchgeführt. Trypanblaufärbungen erfolgten 33 h nach Infektion. Weiterhin wurde die Anzahl der toten Zellen/Infektionsstelle quantifiziert. NOCO-Infektionen auf Col-0 Hintergrund wurden mit  $3,9 \times 10^5$  Sporen/ml durchgeführt und die prozentuale Quantifizierung der Sporen erfolgte in den Kategorien „keine“, „wenig“, „mittel“ und „viele“. Trypanblau-Färbungen wurden 30 h bzw. 4 Tage nach Infektion durchgeführt. Trypanblaufärbungen im Ws-Hintergrund wurden mit WACO durchgeführt, Sporenanzahlbestimmungen wurden nach Infektion mit EMWA durchgeführt.

### 2.9.7 Ionenausströmungsmessungen

Für die Messung des Ionenausstroms wurden Bakterien in einer Dichte von  $10^7$  cfu/ml in Blätter infiltriert und nach 24 h geerntet. Pro Pflanze wurden 4 Blätter behandelt, aus denen jeweils eine Blattscheibe (Korkbohrer Größe 3, Ø 0,6 mm) ausgestanzt wurde. Aus 2 Pflanzen wurden 8 Blattscheiben gepoolt und 2 x 25 min in 10 ml ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die 8 Blattscheiben in Gewebekulturschalen in 10 ml Wasser unter leichtem Schütteln inkubiert und die Ionenleitfähigkeit [ $\mu$ S/cm] stündlich ermittelt. Messungen wurden in Triplikaten mit dem „Conductivity Meter Set Qcond2200“ (Art.-Nr.: 620-4722, VWR International GmbH) durchgeführt.

### 2.9.8 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies durch DAB-Färbung

Infizierte Blätter wurden von der Pflanze abgeschnitten und mit 1 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid-Lösung (DAB) (Sigma-Aldrich) für 1 - 2 min vakuuminfiltriert. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und das Blattmaterial auf wassergetränktes Filterpapier in geschlossenen Petrischalen unter Lichtabschluss für 5 h bei RT inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion wurde durch Zugabe von 70 % (v/v) Ethanol

bewirkt und die Entfärbung durch mehrmaliges Waschen mit 70 % (v/v) Ethanol erzielt. Die Auswertung der Proben wurde an einem Durchlichtmikroskop durchgeführt.

### **2.9.9 Trypanblaufärbung zur Bestimmung toter Zellen**

Infizierte Blätter wurden von der Pflanze abgeschnitten und für 30 s in Trypanblaulösung (10 ml Milchsäure, 10 ml Glycerin, 10 ml Aqua-Phenol, 10 ml ddH<sub>2</sub>O, 300 mg Trypanblau, 80 ml Ethanol) in einem kochenden Wasserbad gefärbt. Nach Abnahme der Färbelösung wurde zur Entfärbung der Blätter 1 g/ml Chloralhydratlösung zugegeben. Diese Lösung wurde über mehrere Tage ausgetauscht, um eine optimale Entfärbung zu erzielen. Die Blattproben wurden an einem Durchlichtmikroskop ausgewertet.

### **2.9.10 Kallose-Ablagerungen**

Zum Nachweis der Kallosebildung nach PAMP-Behandlung wurden Anilinblaufärbungen durchgeführt (Gomez-Gomez et al.; 1999, Veit et al.; 2001). *Arabidopsis* Blätter wurden mit 1 µM Flg22 bzw. Elf18 infiltriert und nach 24 h für weitere 24 h in Fixierlösung (1 % (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM Zitronensäure, 90 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4) inkubiert. Nach erfolgter Fixierung wurde die Lösung durch 100 % Ethanol ausgetauscht und für 1 - 2 Tage entfärbt. Nach Chlorophyllverlust wurden die Blätter in 50 % (v/v) Ethanol für 15 - 30 min inkubiert und anschließend weitere 15 - 30 min in 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 12,0 äquilibriert. Kalloseablagerungen wurden mit 0,1 % (w/v) Anilinblau (Wasserblau) in 67 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 12, für 1 h bei RT angefärbt. Gefärbte Blätter wurden in Lösung (70 % (v/v) Glycerin, 30 % (v/v) Färbelösung) auf Objektträger eingebettet und unter UV-Licht untersucht.

### **2.9.11 Hormon- und Camalexinmessungen**

#### **Ethylenbestimmung**

Zur Messung von Ethylenabgabe wurden Blätter klein geschnitten und in ddH<sub>2</sub>O vorinkubiert. Pro Probe wurden mehrere Blattstückchen in ein 5 ml Glasgefäß mit 50 µl Wasser/Fumonisin (Endkonzentration 10 µM) gegeben und mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mit einer Spritze 1 ml der Gasphase entnommen und über quantitative Gaschromatographie (GC-14A, Shimadzu; Chromatopac C\_R4AX Shimadzu) die Ethylenkonzentration ermittelt.

Salicylsäure-, Jasmonsäure, Auxin und Camalexinmessungen

GC-/MS-Analysen zur Bestimmung der Hormonmengen nach Infektion wurden im analytischen Labor von Karl Wurster (Universität Tübingen) durchgeführt. Der Einfluss auf die Hormonmengen wurde nach Infektionen mit *Pto* DC3000 und Fumonisin B1 getestet. *Pto* DC3000 wurde in einer Dichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml infiltriert und nach 48 h geerntet, Fumonisin B1 wurde in einer Konzentration von 10  $\mu$ M infiltriert und die Pflanzen nach 3 Tagen geerntet.

### 2.9.12 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Das Lasermikroskop TCS SP2 der Firma Leica Typ DM-RE7 (SDK) und die vom Hersteller mitgelieferte Software LCS Lite Version 2.61 standen zur Visualisierung der Proben zur Verfügung. Tab. 2.17 fasst die verwendeten Objektive zusammen.

Vergößerung	Objektiv
10 x	10 x/0,3 Plan
20 x	20 x/0,7 PlanApo; Öl, Glyz, H <sub>2</sub> O
63 x	63 x/1,2 PlanApo H <sub>2</sub> O
63 x	63 x/1,4-0,6 PlanApo Öl

Tab. 2.17: Verwendete Objektive

Probenvorbereitung

7 - 9 Tage alte Keimlinge, die unter Langtagbedingungen auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten angezogen wurden, wurden zweimal mit 1 x PBS und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und mittels Zahnstocher in Flüssigmedium umgesetzt (1 ml Medium/well; 24-well-Platte). Ein Teil der Keimlinge wurde in Vollmedium ( $\frac{1}{2}$  MS), der andere Teil in Mangelmedium (Tab. 2.15) für 2 - 7 Tage im Langtag oder auf dem Schüttler (100 rpm) im Dunkeln inkubiert. 6 - 16 h vor der mikroskopischen Analyse wurden die Keimlinge mit entsprechenden Inhibitoren behandelt (Kap. 2.9.13.3). Das gleiche Medium wurde ebenfalls für Färbungen verwendet. Nach der Inkubationszeit im Dunkeln wurde der Inhibitor mit Farbstoff abpipettiert und 2 x mit 500  $\mu$ l 1 x PBS und 1 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Keimlinge wurden auf dem Objektträger in ddH<sub>2</sub>O eingebettet und visualisiert.

Färbemethoden

Monodansylcadaverin (MDC)

Monodansylcadaverin (30432, Fluka) in DMSO wurde in einer Endkonzentration von 0,05 mM eingesetzt ( $M = 335,47$  g/mol) und die Keimlinge für 10 min bei RT in 1 x PBS im Dunkeln inkubiert (Biederbick et al.; 1995). Vor der Visualisierung wurden die Keimlinge zweimal mit 1 x PBS und einmal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Als Kontrollen wurden nur mit

DMSO behandelte Keimlinge untersucht. Die Anregung erfolgte mit dem UV-Laser bei 405 nm und die Emission wurde zwischen 405 - 500 nm detektiert.

Lysotracker Rot DND-99 und Lysotracker Grün DND-26

1 mM Lysotracker Rot DND-99 (L7528) und 1 mM Lysotracker Grün DND-26 (L7526) in DMSO wurde von Invitrogen erhalten. Die Färbung der Keimlinge erfolgte in 1  $\mu$ M Lysotracker Rot DND-99 bzw. Grün DND-26 für 1 h bei RT im Dunkeln. Vor der Visualisierung wurden die Keimlinge ebenfalls 2 x mit 1 x PBS und 1 x mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Als Kontrollen wurden nur mit DMSO behandelte Keimlinge untersucht.

Lysotracker Rot DND-99 hat sein Absorptionsmaximum bei 577 nm und sein Emissionsmaximum bei 590 nm, Lysotracker Grün DND-26 bei 504 nm bzw. 511 nm.

Verwendete Inhibitoren

(2S, 3S)-Trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-3-Methylbutane Ethylester (E8640) (E-64d) und Concanamycin A (C9705) wurde von Sigma-Aldrich in DMSO erhalten.

Concanamycin A

Dieser Inhibitor der vakuolären H<sup>+</sup>-ATPase (V-ATPase) bewirkt eine Akkumulation Autophagosomen-ähnlicher Strukturen in der Vakuole (Drose et al.; 1993, Matsuoka et al.; 1997, Tamura et al.; 2003). Es wurde in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ M bzw. 1  $\mu$ M eingesetzt und 6 - 16 h im Dunkeln bei RT vor der Visualisierung zu dem Pflanzenmaterial hinzugegeben.

E-64d

E-64d wirkt als Cysteinprotease-Inhibitor der Papainfamilie (Moriyasu und Ohsumi; 1996, Takatsuka et al.; 2004) und wurde in einer Endkonzentration von 50  $\mu$ M bzw. 100  $\mu$ M verwendet. Das Pflanzenmaterial wurde für 15 - 16 h bei RT im Dunkeln mit Inhibitor behandelt und anschließend mikroskopisch betrachtet.

### **2.9.13 Statistik**

Die Auswertung der Daten erfolgte, wenn nicht anders angegeben mit Microsoft Office Excel. Arithmetische Mittel wurden durch Mehrfachbestimmungen erhalten (Pflanzen- und Pathogenwachstum; Läsionsdurchmesser; Stomatamessungen, etc.) und die jeweiligen Standardabweichungen bzw. Standardfehler zugeordnet. Zur Ermittlung der p-Werte, die signifikante Unterschiede zwischen den Wertepaaren angeben, wurde der T-Test angewendet. Als signifikant wurde  $p < 0,01$  festgesetzt.



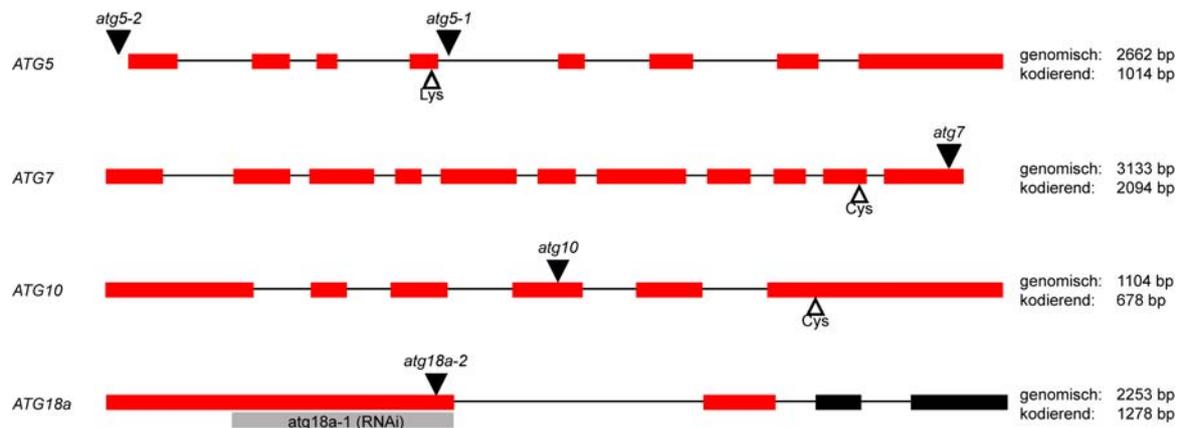
## 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung der Autophagie für das pflanzliche Immunsystem am Beispiel des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* näher zu charakterisieren. Bei Säugetieren spielt die Autophagie bzw. deren fehlerhafte Regulation eine bedeutende Rolle in der Pathogenese, beispielsweise bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer (Komatsu et al.; 2007). Sie ist aber auch in der Immunabwehr gegenüber bakteriellen und viralen Infektionen bedeutsam (Delgado et al.; 2009). Da die genauen regulatorischen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind, ist es sinnvoll, auch in einem pflanzlichen Modellorganismus der Frage der Funktion und Regulation näher zu kommen, zumal der Prozess evolutionär streng konserviert ist (Reggiori und Klionsky; 2002).

### 3.1 Auswahl Autophagie-assoziiierter Gene in *Arabidopsis thaliana*

Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich die Rolle von *ATG6* an der pflanzlichen Immunantwort beschrieben. Da dieses Gen allerdings vielfältige Funktionen erfüllt (Patel und Dinesh-Kumar; 2008), konnte nicht sichergestellt werden, dass die Ursache beobachteter Phänotypen tatsächlich aufgrund von Autophagiedefizienzen hervorgerufen wurde. Außerdem ist die *atg6*-Mutation homozygot letal (Fujiki et al.; 2007, Qin et al.; 2007), weshalb für die Analysen nur eine Knock-Down-Linie zur Verfügung stand (Patel und Dinesh-Kumar; 2008). Da die Rolle weiterer Autophagiegene in der Pathogenabwehr nicht näher charakterisiert war, wurden für spätere Analysen alle verfügbaren T-DNA Insertionslinien für 33 der insgesamt 36 *ATGs* zusammengetragen (Alonso et al.; 2003) und genotypisiert (Übersicht in Tab. 7.2). Ein besonderer Fokus wurde auf Linien der *ATG*-Gene *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a* gelegt. Diese aus Kollaborationen erhaltenen Linien, deren entwicklungsbiologische Funktion bereits aufgeklärt wurde, waren bereits rückgekreuzt und auf das Fehlen von Transkript untersucht worden (Doelling et al.; 2002, Thompson et al.; 2005, Xiong et al.; 2005). Drei dieser näher analysierten *ATGs* (*ATG5*, *ATG7* und *ATG10*) liegen als Einzelkopiegene vor, womit zusätzlich der Nachteil einer möglichen funktionellen Redundanz ausgeschlossen werden konnte. Diese drei essentiellen *ATGs* wirken in ubiquitinähnlichen Konjugationskaskaden mit, die zur Autophagosomenbildung und Expansion beitragen (Kap. 1.5). *ATG18a* wird an späterer Stelle für Recycling- und Lokalisierungsprozesse benötigt (Kap. 1.5), und wurde deshalb trotz möglicher Redundanz in weitere Studien einbezogen. Als Vertreter früher autophagischer Ereignisse wurde *ATG1c* nach Generierung von Knock-Down-Linien ebenfalls untersucht (Kap. 3.10). Als Induktor der Autophagie (Kap. 1.5) spielt dieses für eine Ser/Thr-Kinase kodierende *ATG* eine besondere

Rolle im autophagischen Prozess und wurde bisher in Pflanzen nicht näher charakterisiert. Somit wurden die verschiedenen Teilprozesse der Autophagie durch mindestens ein *ATG*-Gen abgedeckt. Die entsprechende Exon-Intron-Struktur der Gene *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a* und die Insertionsstelle der T-DNAs in den jeweiligen Mutanten ist in Abb. 3.1 dargestellt.



**Abb. 3.1: Genstruktur von *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a***

Die Genstrukturen der *ATGs* sind als Exon-Intron Abfolge (rote-schwarze Balken) dargestellt. Die T-DNA-Insertionsstelle im Genom ist durch das schwarze Dreieck angezeigt. Die Sequenz zur Herstellung der RNAi-Linie *atg18a-1* ist als grauer Balken dargestellt. Die Position wichtiger funktioneller Aminosäuren ist als weißes Dreieck dargestellt. *ATG5* enthält Lys-128, die Bindestelle für *ATG12*; *ATG7* enthält Cys-558, das eine Thiolesterbindung zu *ATG8* bzw. *ATG12* eingeht; *ATG10* enthält Cys-178, das die Thiolesterbindung zu *ATG12* eingeht. Genomische und kodierende Sequenzlängen sind in Basenpaaren (bp) angegeben.

Funktionelle Studien lieferten den Nachweis der Konservierung essentieller AS zwischen Hefe und *Arabidopsis* (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Yoshimoto et al.; 2004), die als ungefüllte Dreiecke in der Genstruktur eingezeichnet sind.

### 3.2 Analyse der T-DNA-Insertionslinien

Zur funktionellen Analyse von *ATG5* standen zwei T-DNA Insertionslinien zur Verfügung. Die charakterisierte Linie *atg5-1* (Sail129\_B07) enthält die T-DNA im vierten Intron, „downstream“ des Lys-128 kodierenden Exons (Thompson et al.; 2005). Die Linie wurde dreimal mit dem Wildtyp Col-0 rückgekreuzt und auf Vorhandensein von Resttranskript untersucht, wobei ein PCR-Produkt ausschließlich für den Bereich vor der Insertion detektiert werden konnte (Thompson et al.; 2005). Die T-DNA der bisher nicht charakterisierten Linie *atg5-2* (Gabi294\_F10) ist im Promotor inseriert. Die T-DNA von *atg7*, die einzige Linie im Ökotyp Wassilewskaja (Ws), inseriert im zehnten und somit letzten Intron mit einer 20 bp-Deletion. Diese Linie wurde ebenfalls dreimal rückgekreuzt und auf Transkriptmengen untersucht (Doelling et al.; 2002). Eine verkürzte mRNA wurde trotz Insertion exprimiert, die sich allerdings in RNA Gelblotanalysen als instabil herausstellte. Ferner war kein *ATG7* Protein in Immunoblotanalysen nachweisbar, was darauf hindeutet, dass die Insertion ausreichend ist, um eine *ATG7* Proteinakkumulation zu verhindern (Doelling et al.; 2002).

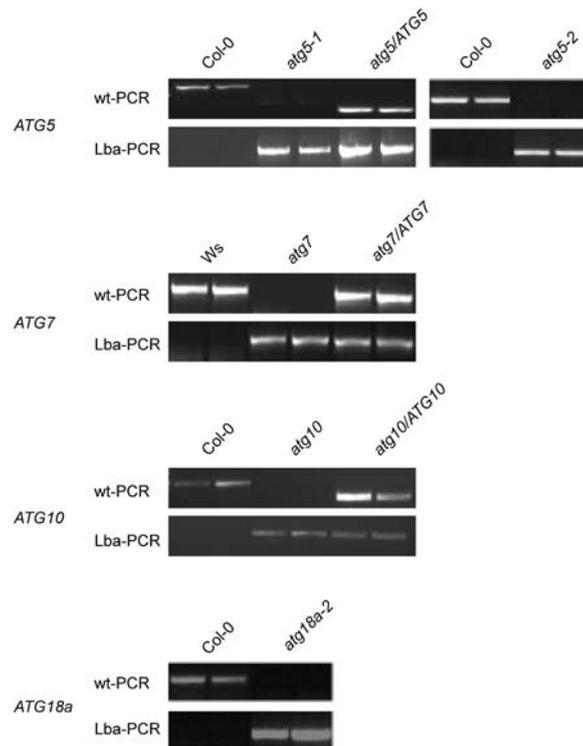
Die ebenfalls homozygote KO Linie N557605 (Alonso et al.; 2003) konnte nach Resttranskriptanalyse nicht als *ATG7*-KO identifiziert werden und wurde deswegen nicht weiter verwendet (Daten nicht gezeigt). Da somit kein weiteres Allel zur Verfügung stand, wurden komplementierte Linien verwendet, wobei *atg7* mit einem genomischen DNA-Fragment unter Kontrolle des nativen *ATG7*-Promotors und *atg5-1* mit einem *ATG5* cDNA-Fragment unter Kontrolle des 35S-Promotors komplementiert wurde (Doelling et al.; 2002, Thompson et al.; 2005). Die *atg10*-Mutante wurde ebenfalls dreimal rückgekreuzt und weist die T-DNA Insertion im vierten Exon auf, wodurch eine Deletion von 28 bp erzeugt wurde (Phillips et al.; 2008). Ebenfalls für *atg10* stand eine mit *ATG10* cDNA komplementierte 35S-Promotor-Linie zur Verfügung. Für *atg18a*-Analysen wurde eine bereits charakterisierte *atg18a*RNAi-Linie (*atg18a-1*) erhalten (Xiong et al.; 2005) und mit einer weiteren bisher uncharakterisierten Gabi-Linie (Gabi651\_D08) gearbeitet, deren T-DNA im ersten Exon inseriert ist (*atg18a-2*). Die Verwendung beider Linien erwies sich als notwendig, da die mehrfach versuchte Komplementation von *atg18a-2* nicht gelang.

### 3.2.1 Genotypisierung

Der Gendefekt einer zu untersuchenden Linie muss homozygot sein, da nicht sichergestellt ist, dass ein dominantes Allel vorliegt.

Daher wurden für alle zu charakterisierenden *ATG*-KO-Linien Genotypisierungen mit geeigneten Primerpaaren (Sequenzen in Kap. 2.7.2.6) durchgeführt.

Ausschließlich isolierte Wildtyp-DNA bzw. DNA der komplementierten Linien ließen eine Amplifikation der genspezifischen Sequenz zu, während in KO-Linien keine Amplifikation des durch die Insertion der T-DNA unterbrochenen Gen-Fragmentes erfolgte. Im Gegensatz dazu konnten in Lba-PCR-Ansätzen nur in KO-Linien und komplementierten Linien Amplifikate erhalten werden, nicht jedoch in entsprechenden Wildtyp-Linien. Abb. 3.2 zeigt, dass alle untersuchten Linien homozygot sind und somit für weitere Analysen verwendet werden konnten.



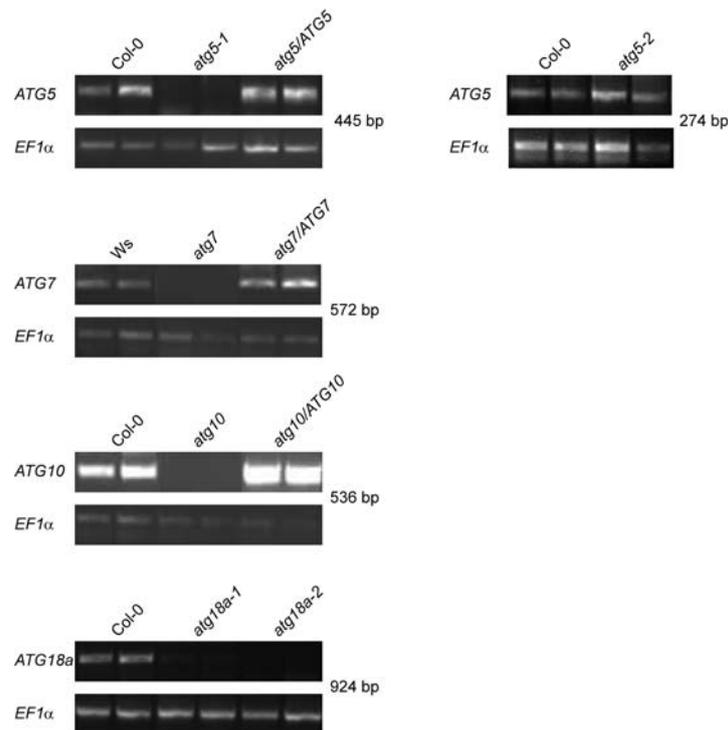
**Abb. 3.2: Genotypisierung der *atg*-Mutanten *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10* und *atg18a-2***

Jeweils 2 Blätter von 6 Wochen alten Pflanzen wurden geerntet und die genomische DNA extrahiert. Als Genotypisierungsprimer wurden für *atg5-1* die Primerpaare *atg5-3* und *atg5-6RP* als wt-PCR sowie *at5g17290R1* und *Sail\_lba* als Lba-PCR verwendet. Für *atg5-2* standen die Primerpaare *N854665 LP* und *N854665 RP* für die wt-PCR sowie *N854665 LP* und *Gabi\_kat\_lba* für die Lba-PCR zur Verfügung. Die wt-PCR für die *atg7*-Linie wurde mit dem Primerpaar *at5g45900F4* und *at5g45900R4* durchgeführt, für die Lba-PCR wurde das Primerpaar *atg7-2* und *lba* verwendet, die *atg10*-Linie wurde mit *atg10-f* und *atg10-r* in der wt-PCR untersucht, sowie für die Lba-PCR die Primer *atg10-f* und *10lba* verwendet; für *atg18a-2* wurden *N62770 LP* und *N62770 RP* in der wt-PCR sowie *N62770 RP* und *Gabi\_kat\_lba* in der Lba-PCR eingesetzt.

### 3.2.2 Transkriptanalyse

Der Nachweis, dass die T-DNA Insertion auch einen Transkriptverlust bewirkt, wurde mittels semiquantitativer RT-PCR (Kap. 2.7.5) erbracht.

Die Primer, deren Sequenzen in Kap. 2.7.2.6 aufgelistet sind, wurden so ausgewählt, dass sie um die Insertionsstelle herum binden konnten und auf diese Weise die Abwesenheit des vollständigen Transkriptes überprüfen. Zur Sicherstellung gleich eingesetzter DNA-Mengen wurde als Kontroll-PCR das konstitutiv exprimierte Gen *EF1 $\alpha$*  verwendet.



**Abb. 3.3: Transkriptanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR**

Aus jeweils 2 Blättern 4 - 5 Wochen alter Pflanzen wurde RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR ermittelt und Wildtyp-Pflanzen, komplementierte Linien und KO-Linien in ihren jeweiligen Transkriptmengen verglichen. Als Kontroll-PCR gleicher cDNA Mengen dienten die Primer eF1 $\alpha$ -s und eF1 $\alpha$ -as des konstitutiv exprimierten Referenzgens *EF1 $\alpha$* . Die KO-Linie *atg5-1* wurde mit den Primern *atg5-3* und *atg5-6RP*, *atg5-2* mit den Primern *atg5-F* und *atg5-6RP* getestet, die *atg7*-Linie wurde mit den Primern *at5g45900F4* und *at5g45900R4-2* überprüft, für *atg10* standen die Primer *atg10f* und *atg10r* zur Verfügung und die beiden *atg18a*-Linien wurden mit dem Primerpaar *at3g62770F1* und *at3g62770R1* untersucht.

Die Abb. 3.3 zeigt deutlich das Fehlen des Transkriptes in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2*. Vorhandensein von Transkript konnte lediglich in der *atg5-2* Linie nachgewiesen werden. RNA-Gelblotanalysen müssten durchgeführt werden, um die Stabilität dieses Transkriptes zu überprüfen. Da allerdings auch eine komplementierte Linie zur Verfügung stand, war diese Linie für Folgeexperimente nicht zwingend notwendig, wurde aber in einigen Versuchen aufgrund von einem anfänglich beobachteten Phänotyp mitgeführt (Kap. 3.3.1). Verschiedene Analysen sollten nun mit diesen Linien durchgeführt werden, um zu klären, welche Folgen diese Gendefekte mit sich bringen.

### 3.2.3 Auswertung der Mikroarraydaten nach bakterieller Infektion und PAMP-Behandlung

Da eine mögliche Beteiligung der Autophagiegene in der Pathogenabwehr zusätzlich zu *ATG6* (Patel und Dinesh-Kumar; 2008) überprüft werden sollte, wurden öffentlich zugängliche Mikroarraydatensätze analysiert. Änderungen des Transkriptspiegels bestimmter Gene könnten auf eine Rolle in Signaltransduktionswegen wie Abwehrkaskaden hindeuten. Im Rahmen der AtGenExpress Initiative ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) wurden *A. thaliana*-Pflanzen verschiedenen Behandlungen unterzogen, RNA-Isolierungen

durchgeführt und Mikroarrays erstellt, deren Ergebnisse in einer Mikroarraydatenbank zur Verfügung gestellt wurden. Zur Einzelgenanalyse diente das Programm Genevestigator ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)).

(A)

	At	h	Induktion		At	h	Induktion
Pto DC3000	ATG1c	24	2,67	Pto avrRpm1	ATG1c	24	2,13
	ATG2	24	2,21		ATG2	24	2,42
	ATG4a	2	6,98		ATG4a	2	3,76
		6	2,13			6	4,11
		24	5,88			24	5,88
	ATG7	24	3,94		ATG7	24	2,55
	ATG8a	24	3,82		ATG8a	24	2,48
	ATG8b	24	2,69		ATG8b	2	2,7
	ATG8h	24	15,41			6	2,7
	ATG9	24	2,9		ATG9	6	1,68
	ATG12a	24	2,74			24	2,12
	ATG18a	24	1,72				
	ATG18f	24	2,81		ATG18f	24	2,1
	ATG18h	24	1,97				
	Pto hrcC	ATG2	24		2,21	Pph	ATG2
ATG4a		2	2,7	ATG4a	2		6,3
ATG8a		24	1,79	ATG8a	24		2,54

(B)

	At	h	Induktion
Fig22	ATG2	1	1,86
	ATG4	4	2,13
HrpZ	ATG2	1	1,54
	ATG4	4	2,2
	ATG8h	4	2,21
LPS	ATG18e	1	2,56
		4	2,72
NLP <sub>Pp</sub>	ATG4	4	2,36

**Tab. 3.1: Mikroarray-Daten nach Behandlung mit *Pseudomonas*-Stämmen und verschiedenen PAMPs**

*A. thaliana* Pflanzen wurden entweder mit den *Pseudomonas*-Stämmen *Pto* DC3000, *Pto* DC3000 avrRpm1, *Pto* DC3000 hrcC und *Pph* in einer Dichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml infiltriert (A) oder mit PAMPs (1  $\mu$ M Flg22, 10  $\mu$ M HrpZ, 100  $\mu$ g/ml LPS und 1  $\mu$ M NLP<sub>Pp</sub>) behandelt (B). Nach Infiltration wurde das Pflanzenmaterial zu den Zeitpunkten 0, 2, 6 und 24 h (A) bzw. zu den Zeitpunkten 1 h und 4 h (B) geerntet und RNA isoliert. Als Teil der AtGenExpress Initiative wurden aus der isolierten RNA die hier gezeigten Mikroarray-Daten für die ATG-Gene erstellt. Gezeigt ist eine Zusammenfassung aller ATGs, die eine Induktion  $\geq 1,5$  in ihrer Expression zum entsprechenden Zeitpunkt [h] nach Infektion bzw. PAMP-Behandlung zeigten. Die Signalstärken wurden auf die Kontroll-Signalstärken bezogen und somit Werte für die relative Geninduktion erhalten.

Wie aus den Tabellen 3.1 (A) und (B) deutlich wird, ergaben die Datenbankanalysen, dass 13 der zu diesem Zeitpunkt verfügbaren 33 ATGs nach Pathogen- bzw. PAMP-Applikation eine verstärkte Expression zeigten.

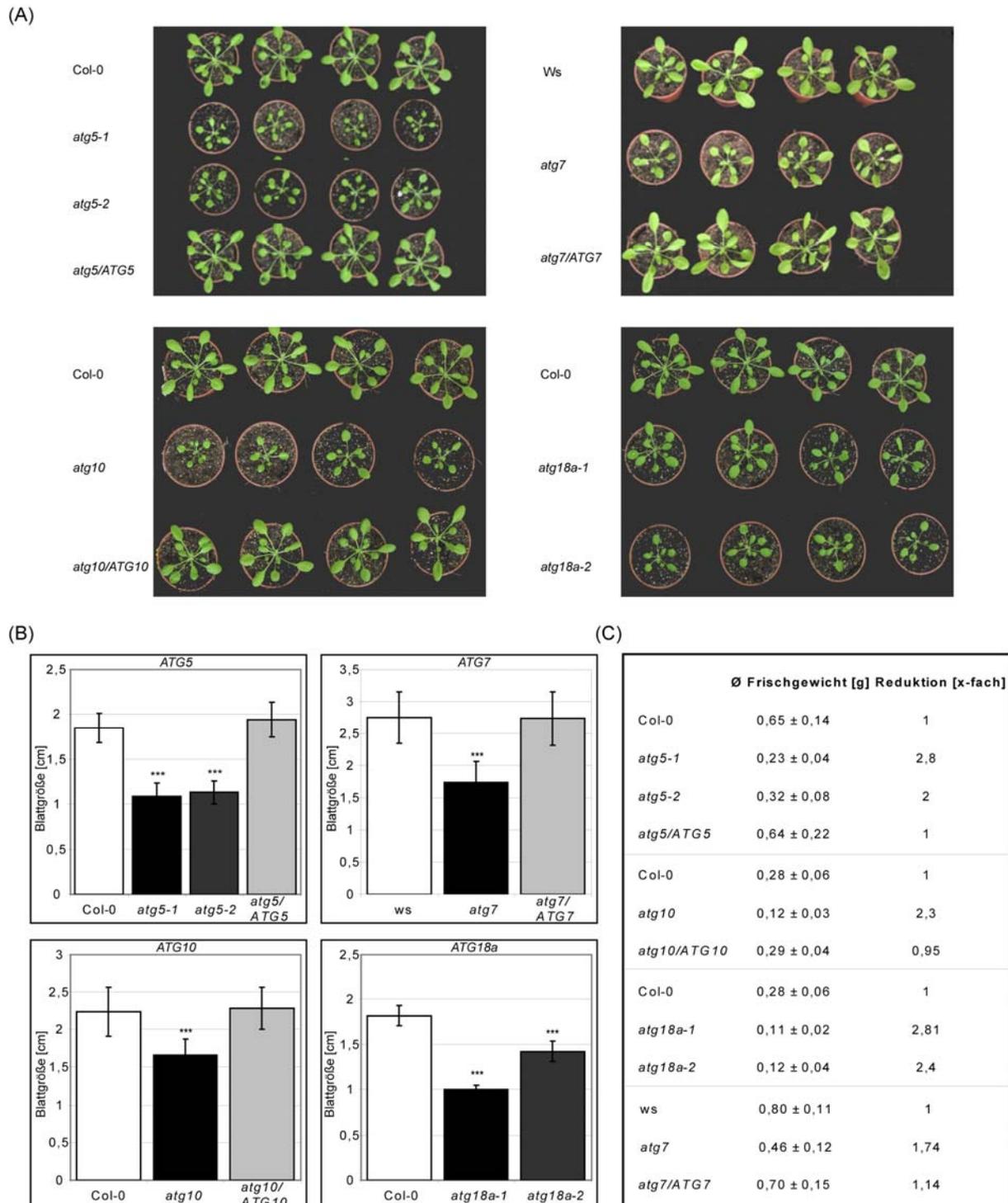
Da mit nahezu 40 % der analysierten ATGs ein substantieller Teil des Autophagieapparates einer transkriptionellen Kontrolle nach Pathogen bzw. PAMP-Behandlung zu unterliegen scheint, und bereits für nahezu 30 % eine erhöhte Expression nach Zelltodbehandlungen beschrieben wurde (Seay et al.; 2006), gilt die Vermutung einer Autophagie-Beteiligung an Abwehrprozessen als wahrscheinlich. Diese sollte in Folgeexperimenten näher untersucht werden.

### 3.3 Phänotypische Analysen der Autophagiegene *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a*

Die meisten untersuchten Autophagie-defizienten Pflanzen zeigten unter normalen Wachstumsbedingungen keinen drastischen Phänotyp, nur für *ATG6* (*Beclin1*) sind bisher weitere ungewöhnliche Entwicklungsphänotypen beschrieben worden (Patel und Dinesh-Kumar; 2008). Wurden die KO-Pflanzen allerdings Mangelbedingungen, wie Stickstoff- oder Kohlenstoffentzug ausgesetzt, zeichneten sich zwischen Wildtyp- und KO-Pflanzen deutliche Unterschiede in der Überlebensrate ab (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002). Ferner seneszierten Autophagiemutanten schneller und wiesen geringere Größen auf (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Surpin et al.; 2003, Xiong et al.; 2005, Phillips et al.; 2008). Zur Überprüfung des allgemein angenommenen Seneszenzphänotyps der *atg*-Mutanten und für die Festlegung geeigneter Infektionszeitpunkte wurde der Seneszenzverlauf an Blättern und Pflanzen im Folgenden für die Mutanten *atg5-1*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* analysiert. Da in früheren Studien außerdem ein geringeres Blattwachstum in *atg*-Mutanten nur erwähnt wurde, wurden Blattgrößen und Frischgewicht quantifiziert.

#### 3.3.1 Blattgrößen und Frischgewichte

Zur Bestimmung der Blattlänge wurden pro Linie 20 Blätter von 10 verschiedenen Pflanzen gemessen (Kap. 2.9.1) und die Größe gemittelt. Abb. 3.4 weist auf eine deutlich sichtbare (A) und messbare (B) Verzögerung des Blattlängenwachstums aller Autophagiemutanten hin. Vor allem Pflanzen der *atg5*-Linien zeigten einen deutlichen Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp. Die Aufnahmen und Messungen der Blattlängen wurden nach 3 - 4 Wochen durchgeführt, zu späteren Zeitpunkten war der Unterschied nicht mehr signifikant. Einhergehend mit diesem Befund konnten geringere Frischgewichte in den *atg*-Mutanten festgestellt werden. Bezieht man sich auf den jeweiligen Wildtyp der einzelnen Datensätze, so wurde zu frühen Zeitpunkten eine durchschnittlich zweifache Gewichtsreduktion in den *atg*-Mutanten festgestellt.



**Abb. 3.4: Blattgrößen und Frischgewichte der *atg*-Mutanten**

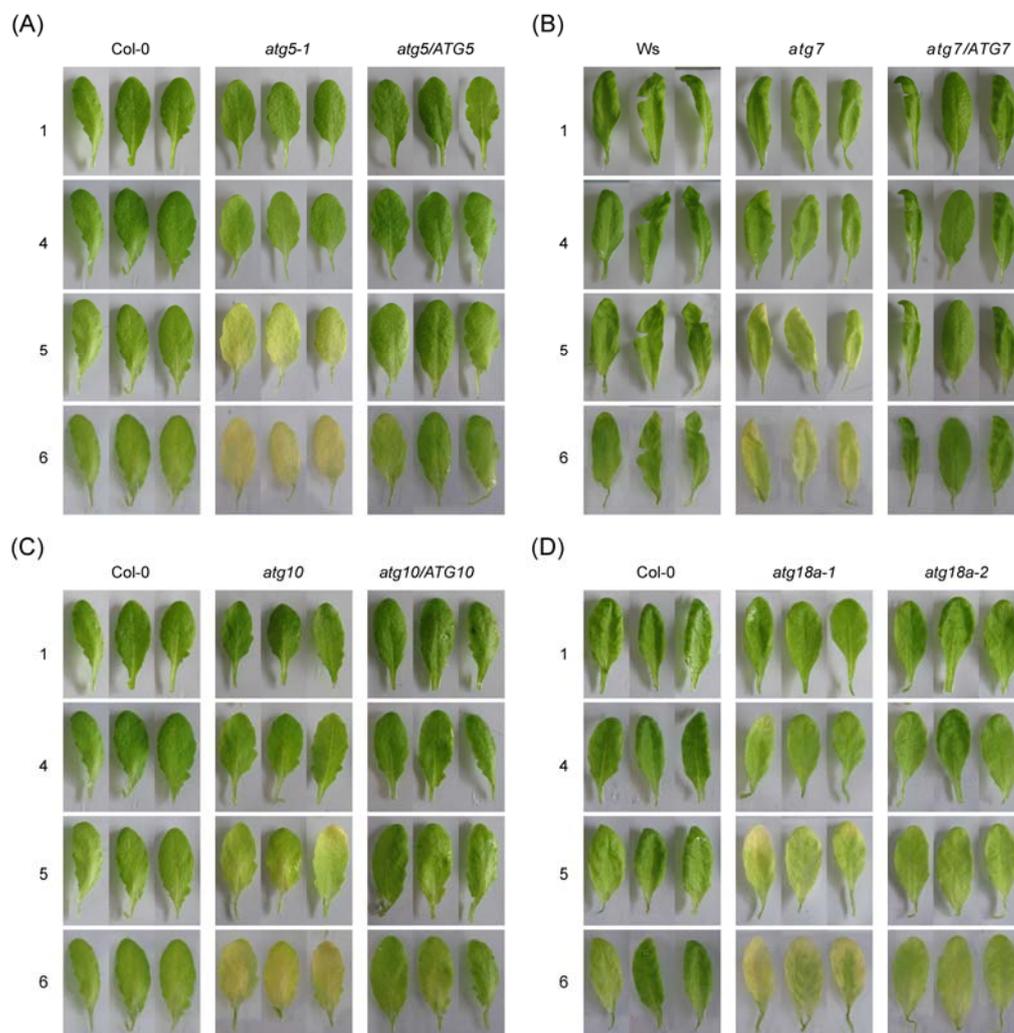
(A) Repräsentative Bilder 3 Wochen alter Wildtyp-, *atg*- und komplementierter Linien

(B) Je Datensatz und Linie wurden von 10 Pflanzen jeweils 2 Blätter der Länge nach gemessen, die Messungen wurden je Datensatz für *atg5*, *atg7*, *atg10* und *atg18a* mehrfach durchgeführt (n = 5; 3; 3; 3). Mittels „Student T-Test“ wurden signifikante Unterschiede für alle *atg*-Linien im Vergleich zu entsprechenden Wildtypen und komplementierten Linien mit  $p < 0,01$  ermittelt. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes dar.

(C) Von jeweils 10 Pflanzen wurden nach 3 (*atg10*, *atg18a-1*, *atg18a-2*) bzw. 4 Wochen (*atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*) Rosetten abgeschnitten und das Frischgewicht bestimmt.

### 3.3.2 Seneszenz

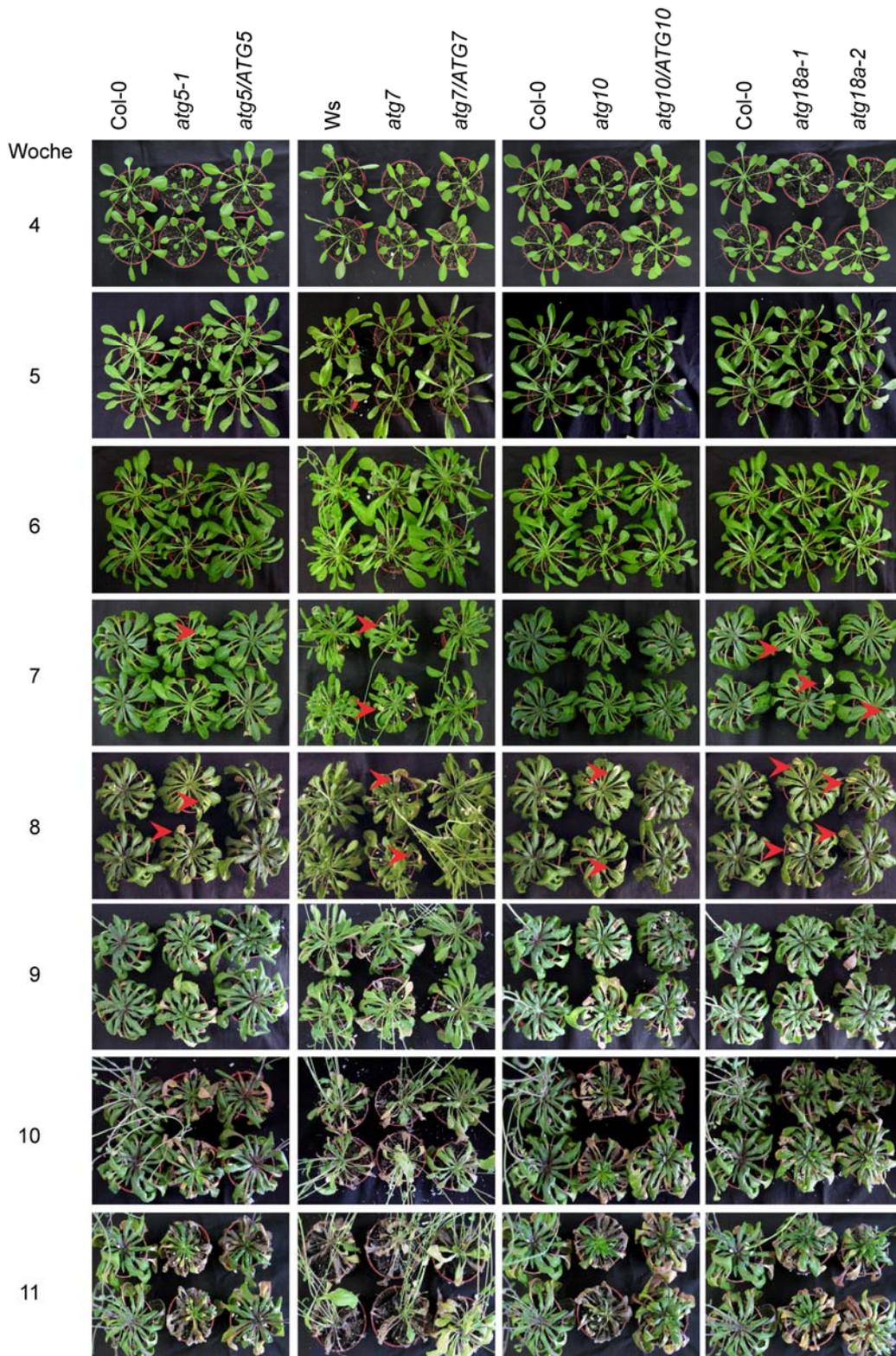
Zur Überprüfung des Seneszenzphänotyps wurden alle *atg*-Linien über eine kurze Zeitspanne einem durch Dunkelheit induzierten Seneszenzassay ausgesetzt. Wie die Abb. 3.5 zeigt, konnten bereits nach 5 Tagen Dunkelinkubation erste Anzeichen der Seneszenz in den Linien *atg5-1*, *atg7*, *atg10* und den beiden *atg18a*-Linien beobachtet werden, wogegen beim Wildtyp und den komplementierten Linien noch kein sichtbarer Chlorophyllverlust festzustellen war. Vergleicht man die *atg*-Mutanten untereinander, so zeigten sich vor allem für *atg5-1* und *atg10* drastischere Phänotypen, als im Fall von *atg7* oder den beiden *atg18a*-Linien, wogegen der Initiationszeitpunkt der einsetzenden Seneszenz keine Unterscheidung zwischen den *atg*-Mutanten zuließ.



**Abb. 3.5: Seneszenzassay an abgeschnittenen Blättern**

4 Wochen alte Blätter der Linien *atg5* (A), *atg7* (B), *atg10* (C) *atg18a-1* und *atg18a-2* (D) mit ihren entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien wurden abgeschnitten und im Dunkeln in ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Aufnahmen wurden nach 1, 4, 5 und 6 Tagen gemacht. Die gezeigten Datensätze sind repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Ansätze.

Bei längerer Beobachtung aller Linien unter Kurztagbedingungen wurde bei allen *atg*-Linien eine nach 7 - 8 Wochen einsetzende Seneszenz festgestellt, die bei Wildtyp- und komplementierten Linien erst viel später und nicht so ausgeprägt einsetzte (Abb. 3.6).



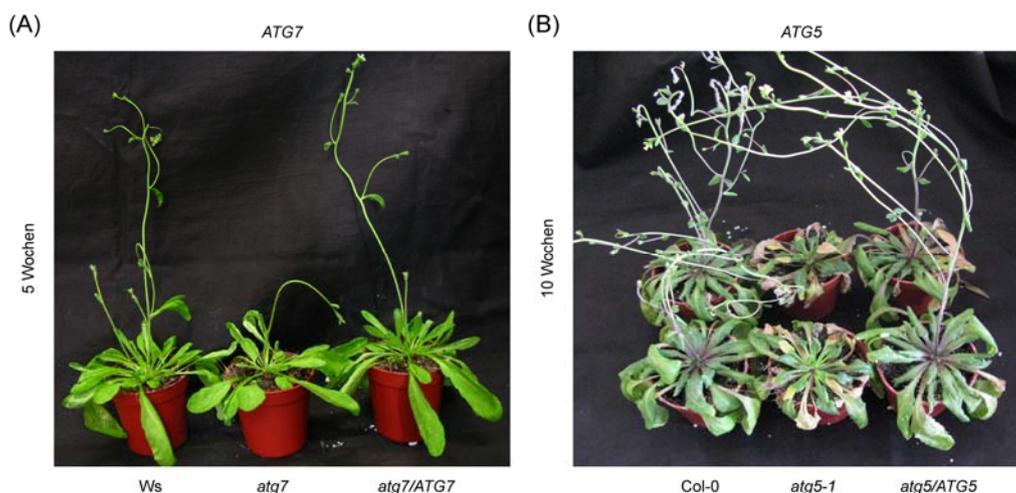
**Abb. 3.6: Seneszenzverlauf der *atg*-Linien**

Je 2 Pflanzen der KO-Linien *atg5-1*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* wurden zusammen mit ihren entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien in einem Zeitraum von 4 - 11 Wochen fotografiert. In einem Zeitraum von 4 - 6 Wochen sind alle untersuchten Linien makroskopisch gesund und ohne erkennbare Seneszenzerscheinungen. Nach 7 Wochen setzen nur in den *atg*-Mutanten die ersten Seneszenzerscheinungen ein (rote Pfeile). Nach 8 Wochen wurden anhand der Anzahl gelber äußerer Rosettenblätter (rote Pfeile) Unterschiede zu den entsprechenden Wildtyplinien und komplementierten Linien deutlich.

Somit wurde durch dieses Experiment deutlich, dass 4 - 6 Wochen alte Pflanzen für weitere Untersuchungen optimal sind, da möglicherweise beobachtete Infektions-Phänotypen in diesem Zeitfenster nicht durch Seneszenzprogramme beeinflusst werden bzw. sich mit Seneszenzerscheinungen überlagern.

### 3.3.3 Entwicklungsphänotypen

Nicht nur die *atg6*-Mutante zeigte Entwicklungsphänotypen, wie beispielsweise dünnere Blütenstände mit weniger Blüten (Patel und Dinesh-Kumar; 2008), sondern Ähnliches konnte auch für *atg7*- und *atg5*-Mutanten gefunden werden, wie aus Abb. 3.7 ersichtlich wird. Beide *atg*-Mutanten wiesen auch eine verspätete Ausbildung der Blütenstände auf, was in dieser Form nicht für *atg10* oder *atg18a* beobachtet werden konnte. Alle *atg*-Mutanten waren trotzdem befähigt, Schoten mit intakten Samen auszubilden. Da Defekte im Reproduktionsapparat keinen Einfluss auf Infektionen und die Immunität haben sollten, konnten die Pflanzen somit weiterverwendet werden.



**Abb. 3.7: Verspätete Ausbildung von Blütenständen in den *atg*-Mutanten *atg5-1* und *atg7***

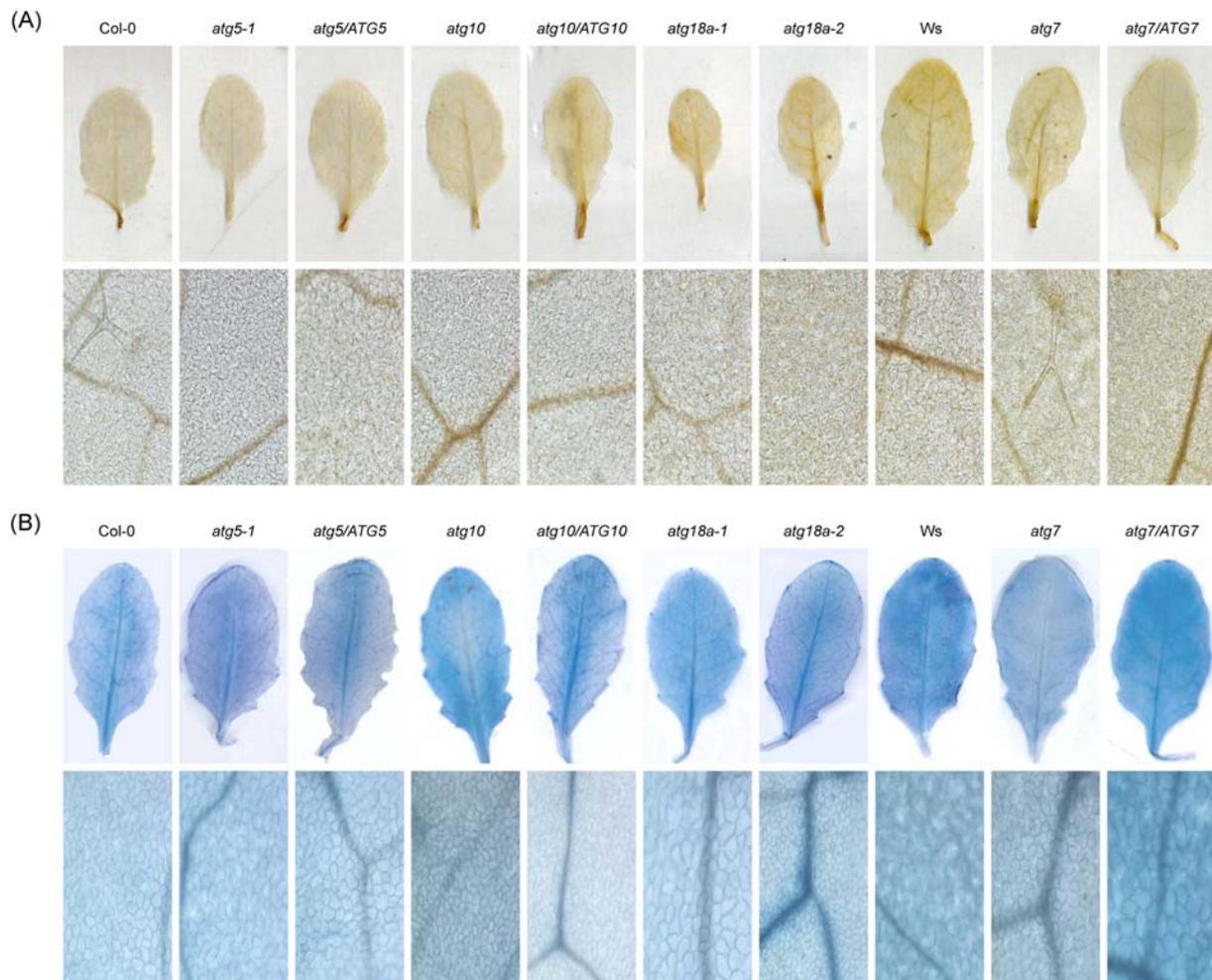
(A) Bereits nach 5 Wochen wurden unter Kurztagbedingungen im Ws-Ökotyp Blütenstände generiert, die Wachstumsgeschwindigkeit dieser Blütenstände war in der *atg7*-Linie deutlich reduziert.

(B) Zu einem späteren Zeitpunkt (10 Wochen) konnte die verzögerte Blütenstengelbildung auch in den bereits seneszenten *atg5-1*-Pflanzen, die ebenfalls unter Kurztagbedingungen angezogen wurden, beobachtet werden.

### 3.3.4 Analyse der Autophagiemutanten auf spontanen Zelltod und ROS-Produktion

Da gezeigt werden konnte, dass die *atg*-Mutanten *atg2* und *atg5* auch im unbehandelten Zustand nach 8 Wochen eine spontane Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aufwiesen (Yoshimoto et al.; 2009), wurde die ROS-Menge in den 4-6 Wochen alten Versuchspflanzen kontrolliert und die Pflanzen zusätzlich auf spontanen Zelltod untersucht. Dazu wurden 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid- (DAB) und Trypanblaufärbungen durchgeführt (Kap. 2.9.8 und Kap. 2.9.9). In allen untersuchten Linien konnte kein Hinweis

auf eine erhöhte ROS-Akkumulation oder spontanen Zelltod im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp gefunden werden (Abb. 3.8). Somit konnte festgestellt werden, dass auch Pflanzen in einem Alter von 4 - 6 Wochen für Infektionsversuche optimal waren, da sie makroskopisch und mikroskopisch gesund erschienen und somit das Risiko minimiert wurde, dass Abwehr-assoziierte Signalwege bereits vor Versuchsbeginn aktiviert wurden.



**Abb. 3.8: DAB und Trypanblaufärbungen als Indikatoren für ROS-Produktion und Zelltod**

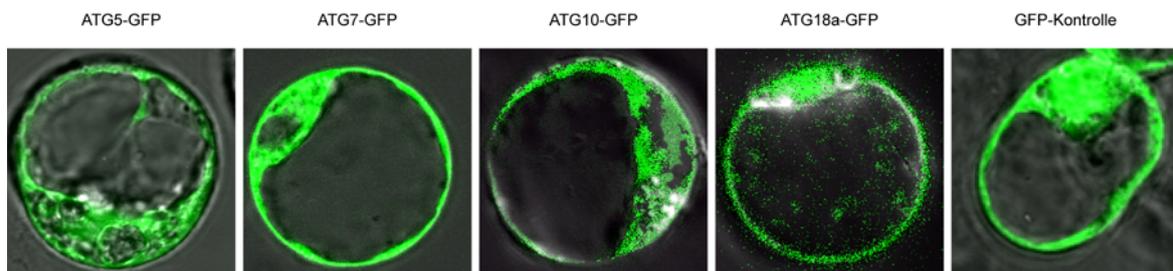
Unbehandelte Blätter der Autophagiemutanten *atg5-1*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* und ihre entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien wurden von 5 Wochen alten Pflanzen abgeschnitten und entweder  $H_2O_2$  mit DAB (A) oder Zelltod mit Trypanblau (B) angefärbt. Dargestellt sind jeweils ein ganzes Blatt und ein vergrößerter Blattausschnitt. In keinem der gefärbten Blätter konnte zu diesem Wachstumsstadium makroskopisch eine ROS-Akkumulation oder auftretender Zelltod nachgewiesen werden. Mikroskopische Analysen deuteten ebenfalls auf keinerlei Zelltod oder ROS-Produktion hin, da keinerlei blau bzw. braun gefärbte Zellansammlungen als Indikator beobachtet werden konnten.

## 3.4 Lokalisation von ATG5, ATG7, ATG10 und ATG18a

### 3.4.1 Protoplastensystem

Das Protoplastensystem wurde genutzt, um die Lokalisation der zu untersuchenden ATGs zu bestimmen. Basierend auf der Vorhersage des „Bio-Array resource for plant functional genomics“-Programms (BAR; Cell eFP Browser) finden sich ATG5, ATG7, ATG10 und

ATG18a im Zytosol. Für ATG5, ATG7 und ATG18a wurde außerdem eine nukleäre Lokalisation vorhergesagt, während für ATG18a ebenfalls eine Chloroplastenlokalisierung beschrieben wurde. Für Lokalisationsstudien wurden die ATG-Sequenzen ohne Stop-Codon in den Gateway-Vektor pK7FWG2.0 kloniert (Primer in Tab. 7.1). In diesem Vektor steht die zu exprimierende Sequenz unter Kontrolle des 35S:Promotors und wird C-terminal mit dem Fluoreszenzprotein eGFP („enhanced green fluorescence protein“) fusioniert. Die Konstrukte wurden in *Arabidopsis* Protoplasten transient exprimiert (Kap. 2.6.4) und die Fluoreszenz unter dem Mikroskop visualisiert.



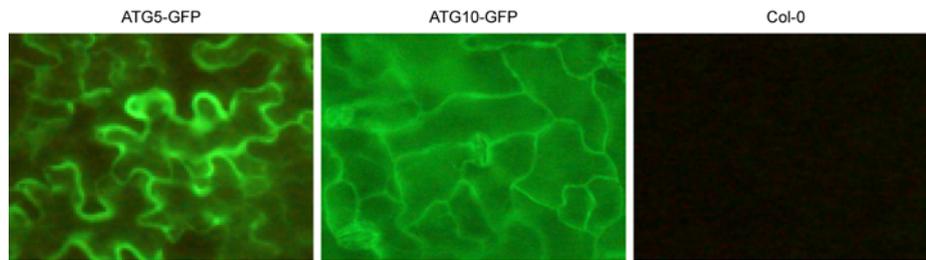
**Abb. 3.9: Protoplastenlokalisierung von ATG5-GFP, ATG7-GFP, ATG10-GFP und ATG18a-GFP**

Protoplasten wurden mit den Konstrukten *ATG5*-pK7FWG2.0, *ATG7*-pK7FWG2.0, *ATG10*-pK7FWG2.0 und *ATG18a*-pK7FWG2.0 transient transformiert und nach 24 h mikroskopiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Argon/Krypton Laser bei 488 nm, die Emission des Lichts wurde zwischen 500 – 600 nm gemessen. Das Durchlichtbild wurde mit dem Fluoreszenzsignal überlagert.

Für alle vier ATG-GFP Fusionsproteine konnte eine deutliche Lokalisation im Zytoplasma, ähnlich der von GFP alleine, bestätigt werden (Abb. 3.9). Die Kernlokalisierung müsste zukünftig durch DAPI-Färbung bestätigt werden, während die Chloroplastenlokalisierung von ATG18a durch das Fehlen der Chloroplasten in diesem verwendeten Protoplastensystem nicht kontrolliert werden konnte.

### 3.4.2 Stabile Transformationen

Neben transienten Expressionen in Protoplasten sollten für spätere Versuche ebenfalls Überexpressionslinien zur Verfügung stehen, weshalb stabile Transformationen in *A. thaliana* mit den entsprechenden GFP-Fusionen durchgeführt wurden. Mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation wurden die in Kap. 3.4.1 beschriebenen Konstrukte in *A. thaliana* eingebracht, um einerseits die *in vivo* Lokalisation zu überprüfen und andererseits Überexpressionslinien für spätere Experimente verfügbar zu haben. Nach erfolgter Antibiotikaselektion und Anzucht resistenter Pflanzen konnte jedoch für 35S:*ATG7*-eGFP und 35S:*ATG18a*-eGFP trotz starkem 35S:Promotor keine eGFP Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die zytoplasmatische Lokalisation wurde aber für 35S:*ATG5*-eGFP und 35S:*ATG10*-eGFP bestätigt (Abb. 3.10).

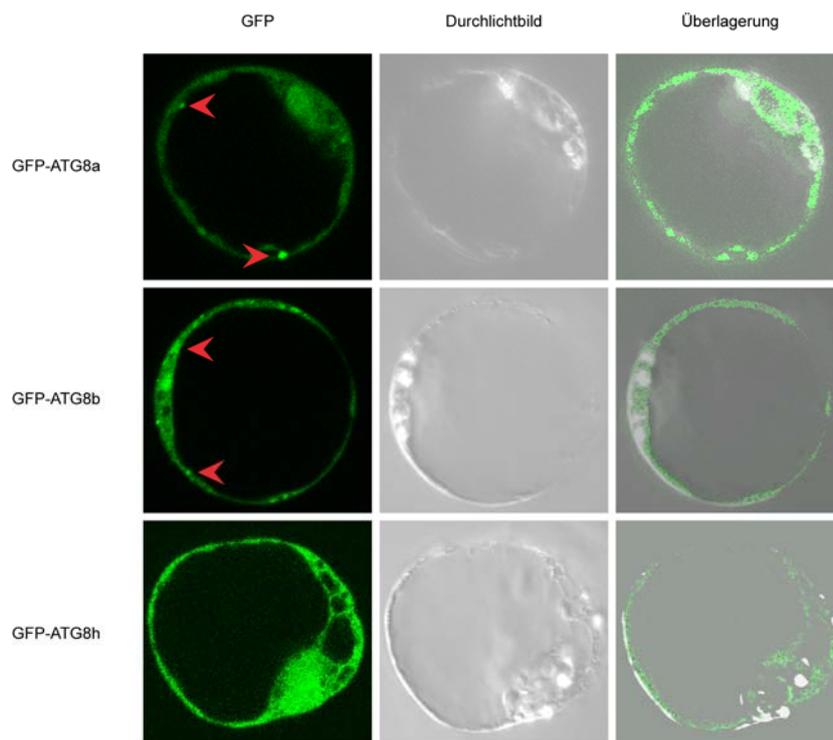


**Abb. 3.10: Lokalisation von ATG5-GFP und ATG10-GFP in Blättern von *A. thaliana***

*A. thaliana* Pflanzen wurden mit den Konstrukten *ATG5*-pK7FWG2.0 und *ATG10*-pK7FWG2.0 mittels *A. tumefaciens* stabil transformiert, mit Hilfe von Antibiotikaresistenz selektioniert und auf GFP-Fluoreszenz überprüft. Gezeigt ist ein Ausschnitt des Blattgewebes 4 Wochen alter Pflanzen. Die GFP-markierten Proteine wurden in beiden Linien ubiquitär exprimiert und weisen auf eine zytoplasmatische Lokalisation hin. Als Negativkontrolle wurden Col-0 Pflanzen unter gleichen Anregungswellenlängen analysiert.

### 3.5 Experimente zur Visualisierung von Autophagosomen

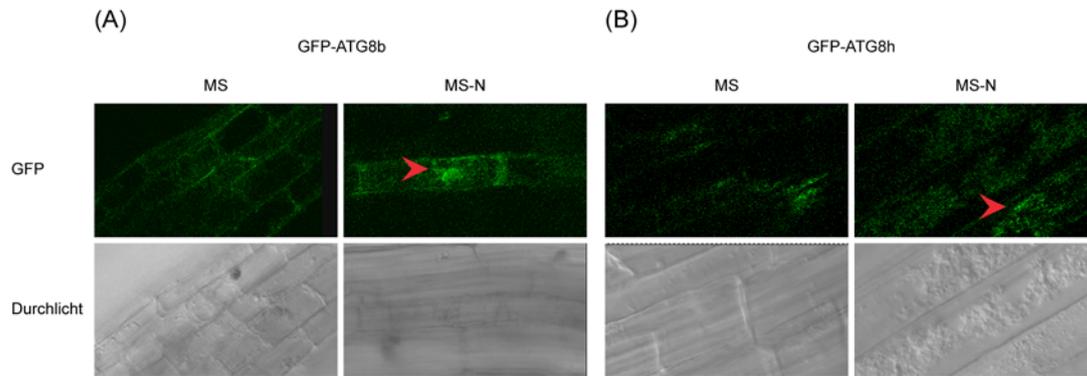
Ein Aspekt dieser Arbeit war es, den autophagischen Prozess während durchgeführter Infektionsversuche visualisieren zu können. Da *ATG8* das bisher einzige bekannte *ATG* ist, welches durchgehend sowohl während der Bildung der präautophagosomalen Struktur (PAS) als auch bei Ausbildung des reifen Autophagosoms mit der Membran assoziiert bleibt (Ichimura et al.; 2000, Kirisako et al.; 2000, Yoshimoto et al.; 2004), wurde dieses als Markergen der Autophagie gewählt. In *A. thaliana* kommen 9 Isoformen vor, von denen mindestens 7 exprimiert werden (Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Slavikova et al.; 2005). Drei Mitglieder dieser Multigenfamilie (*ATG8a*, *ATG8b* und *ATG8h*) sind pathogeninduziert (Tab. 3.1). Da ihre Expression in allen Geweben nachgewiesen werden konnte (Thompson et al.; 2005), wurden diese drei Gene in den Vektor pK7WGF2.0, der eine N-terminale eGFP-Expressionskassette besitzt, kloniert. Wie in Abb. 3.11 zu sehen ist, weisen alle drei GFP-*ATG8*-Fusionen eine zytoplasmatische Lokalisation in *Arabidopsis* Protoplasten auf. Für die Vektoren pK7WGF2.0-*ATG8a* und pK7WGF2.0-*ATG8b* konnten vesikelähnliche Strukturen beobachtet werden. Wie bereits erfolgreich in Hefe und Säugetierzellen gezeigt werden konnte (Suzuki et al.; 2001, Mizushima et al.; 2004), eigneten sich diese drei erzeugten GFP-*ATG8*-Fusionen somit auch für die *in vivo*-Visualisierung von möglichen autophagischen Vesikeln im *Arabidopsis*-System. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass, vor allem unter starken Expressionsbedingungen, GFP-*ATG8* zusätzlich zu Autophagosomen auch mit Aggregaten assoziieren kann, und somit falsch positiv angefärbte Strukturen erzeugt (Kuma et al.; 2007). Daher ist eine Kombination aus verschiedenen Autophagiemarkern unabdingbar, da es bis jetzt noch keinen Marker gibt, der uneingeschränkte Akzeptanz findet (Klionsky et al.; 2008).



**Abb. 3.11: Lokalisation von GFP-ATG8a, GFP-ATG8b und GFP-ATG8h in Protoplasten**

Die Konstrukte pK7WGF2.0-ATG8a, pK7WGF2.0-ATG8b, pK7WGF2.0-ATG8h wurden transient in *Arabidopsis*-Protoplasten transformiert und nach 24 h mikroskopisch visualisiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Argon/Krypton Laser bei 488 nm, die Emission des Lichts wurde zwischen 500 – 600 nm gemessen. Vesikuläre Strukturen (rote Pfeile) wurden in den Linien GFP-8a und GFP-8b zusätzlich zu dem Zytoplasma GFP-markiert.

Die GFP-ATG8-Konstrukte wurden mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation in *Arabidopsis* transformiert und über drei Generationen nach Antibiotikaresistenz und Fluoreszenz gescreent, um diese Linien für spätere Infektions- und Visualisierungsversuche verwenden zu können. Abb. 3.12 zeigt Wurzeln von Pflanzen der T3-Generation, die mit den pK7WGF2.0-ATG8-Konstrukten transformiert wurden. Trotz versuchter Induktion durch Mangelbedingungen und Verwendung von Inhibitoren (Concanamycin A bzw. E-64d), die den Abbau der Vesikel verhindern sollten (Kap. 2.9.12), war in allen Linien die detektierte GFP-Fluoreszenz sehr schwach, womit ihre Verwendung als Markerlinien schwierig war. Besonders kompliziert waren Fluoreszenznachweise in Blättern (Daten nicht gezeigt), da die Autofluoreszenz der Chlorophylle das Suchen nach vesikulären Strukturen deutlich erschwerte.

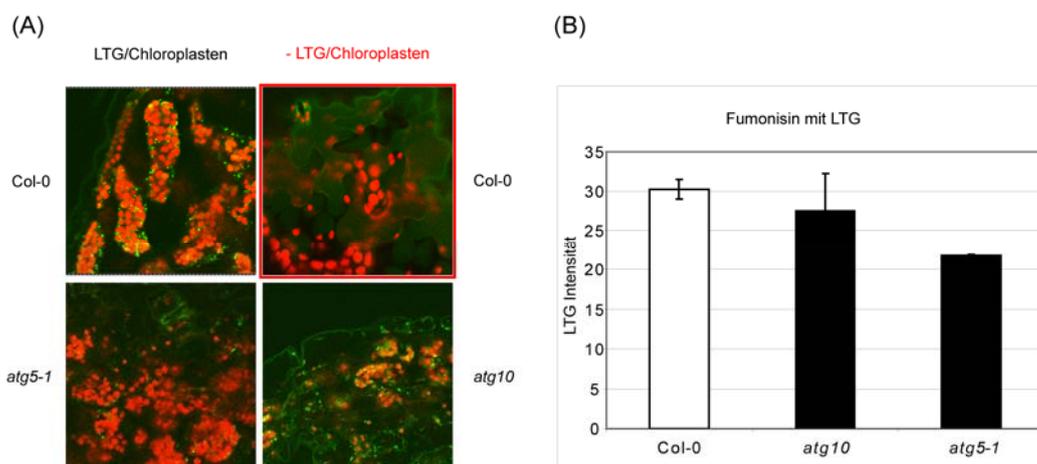


**Abb.3.12: GFP-ATG8-Pflanzen als mögliche Markerlinien für Autophagie**

Keimlinge der GFP-8b-Linie (A) oder GFP-8h-Linie (B) wurden 16 h bzw. 14 h mit 1  $\mu$ M Concanamycin A behandelt, während Keimlinge der Linie GFP-8e (C) 6 h mit 100  $\mu$ M E-64d behandelt wurden. Gezeigt sind Wurzelabschnitte, in denen die GFP-Fluoreszenz in allen drei Markerlinien sehr schwach visualisierbar war (rote Pfeile). Diese Linien wurden von Karina Kober getestet.

Weitere Möglichkeiten, den Nachweis der Autophagie-Induktion unter Mangelbedingungen zu untersuchen, waren in der Verwendung zahlreicher Farbstoffe (Monodansylcadaverin, LysoTracker-Rot, LysoTracker-Grün) in Kombination mit Inhibitoren gegeben. Die Ergebnisse dieser Versuche waren jedoch nicht eindeutig, da auch in den zur Autophagosomenbildung defizienten *atg*-Linien Vesikel detektierbar waren (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer untersuchter möglicher Induktor war das zelltodauslösende Toxin Fumonisin B1 (FB1), das allerdings ebenso eine verstärkte Vesikelakkumulation nicht nur in Blättern des Wildtyps auslöste, sondern auch in den *atg*-Mutanten *atg5-1* und *atg10* (Abb. 3.13 (A)). Vergleicht man den Mittelwert der Intensitäten (mit Hilfe von Adobe Photoshop), so tritt zwischen Col-0 und *atg10* kein signifikanter Unterschied auf, wogegen *atg5-1* eine geringere Fluoreszenzintensität nach LysoTracker-Grün-Färbung aufweist (Abb. 3.13 (B)). Das Blattgewebe reagiert auf das Toxin somit mit Vesikelbildung, wobei die genaue Membranstruktur der Vesikel in EM-Analysen noch nicht aufgeklärt werden konnte. Durch das kaum verminderte Auftreten der Vesikel in den *atg*-Mutanten ist es allerdings unwahrscheinlich, dass es sich hierbei um Autophagosomen handelt.



**Abb. 3.13: Bildung vesikelähnlicher Strukturen nach Fumonisin B1-Behandlung**

7 Tage alte Keimlinge der Linien Col-0, *atg5* und *atg10* wurden für 3 Tage in 10  $\mu$ M FB1 inkubiert und autophagosomenähnliche Vesikel durch Färbung mit Lysotracker-Grün (LGT) visualisiert (A). Die Fluoreszenzintensität der LGT-angefärbten Vesikel in den Blattzellen wurde mit Adobe Photoshop bestimmt und als Intensitätsmittel in (B) dargestellt. Dabei wurden aus je drei Blattausschnitten mit je 9 Quadraten die Intensitäten ermittelt und die daraus gewonnenen Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

Aufgrund der in der Mikroskopie liegenden Problematik wurde eine weitere Möglichkeit gesucht, die Induktion der Autophagie nachzuweisen. Da *ATG*-Gene bei einsetzender Autophagie transkriptionell aktiviert werden (Rose et al.; 2006), wurden die endogenen Promotoren von *ATG5*, *ATG7* und *ATG10* kloniert (Ende vorheriges Gen bis Start-Kodon des jeweiligen *ATGs*) und mit einer GFP/GUS-Kassette fusioniert. Nach *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation konnten Antibiotika resistente Pflanzen identifiziert werden. Resistente Pflanzen wurden mit verschiedenen PAMPs, wie auch den *Pseudomonas*-Stämmen *Pto* DC3000, *Pto* DC3000 avrRpm1 und *Pto* DC3000 hrcC<sup>-</sup> infiziert und einer GUS-Färbung unterzogen. Keine der getesteten Linien konnte aber makroskopisch und mikroskopisch eine Färbung aufweisen (Daten nicht gezeigt), die auf eine Autophagieinduktion hingewiesen hätte. Jedoch ist ungeklärt, ob noch weitere „Enhancer“-Elemente zusätzlich zur verwendeten Gensequenz notwendig sind.

### 3.6 Einfluss der Autophagie-Mutationen auf Infektion mit nekrotrophen Pathogenen

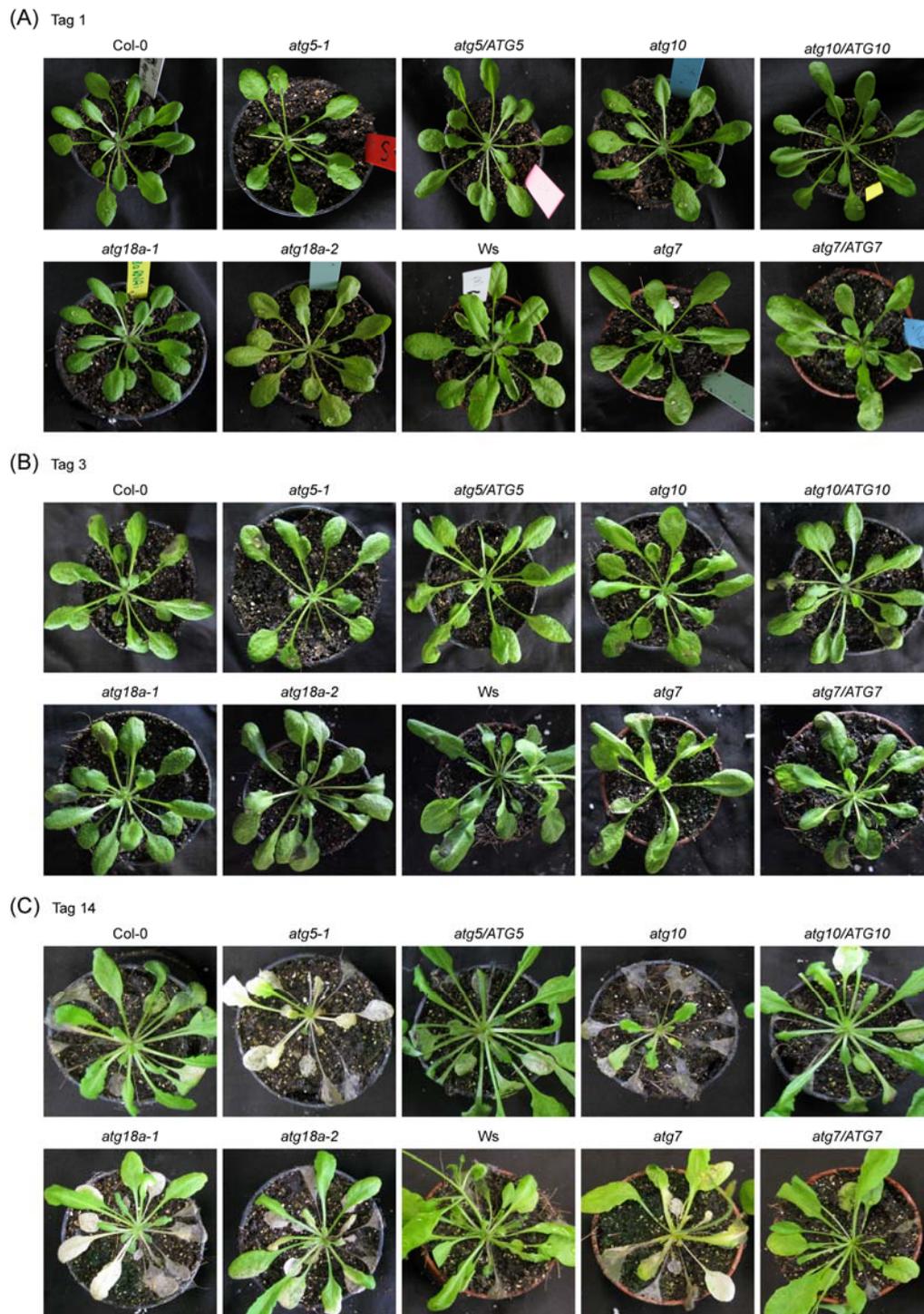
Nach Auswahl, Verifizierung und allgemeiner Charakterisierung geeigneter KO-Linien konnten diese weiteren Analysen unterzogen werden. Zunächst sollte festgestellt werden, ob das Fehlen bestimmter Autophagiegene zu einer veränderten Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen führt. Dazu standen mit *Botrytis cinerea* aus der Familie Sclerotiniaceae und *Alternaria brassicicola* aus der Familie Pleosporaceae zwei Pilze der Klasse Ascomycota zur Verfügung.

### 3.6.1 Infektionen mit *Botrytis cinerea*

Da *Botrytis cinerea* häufig ein sehr aggressives Krankheitsbild aufweist, wurden pro Pflanze nur 2 Blätter mit jeweils 5 µl Sporensuspension infiziert und bei annähernd 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert, um nach bestimmten Zeitabständen die Symptomstärke festzuhalten (Kap. 2.9.6.2). Abb. 3.14 zeigt den Infektionsverlauf bis zu 14 Tage. Nach einem Tag waren noch keine Veränderungen im Pflanzengewebe zu beobachten, wogegen bereits nach drei Tagen gleichmäßig um die Auftropfstelle der Sporen herum das Blattmaterial nahezu zersetzt war. Zwischen den einzelnen Linien konnte zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied in der Ausbreitung des Pilzes festgestellt werden. Nach 14 Tagen waren die *Botrytis*-infizierten Blätter nekrotisch und von einem grauen Flaum des neu gebildeten Mycel umgeben.

Mit Ausnahme der *atg10*-Linie, bei der es zu einer starken Ausbreitung des Pilzes gekommen war, wiesen die anderen Mutanten eher Ähnlichkeiten mit einem verfrühten Seneszenzphänotyp auf, der für die Wildtyp-Linien und komplementierten Linien nicht so augenfällig war.

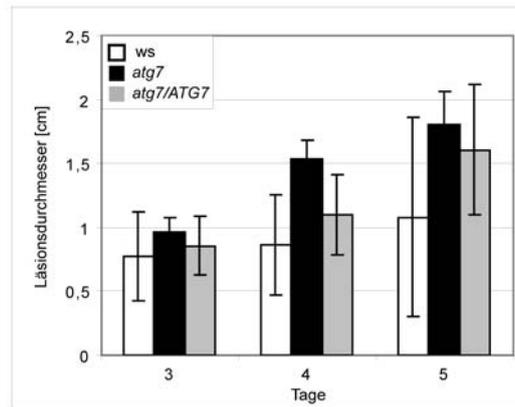
Zu diesem Pflanzenalter tritt, wie in Abb. 3.6 gezeigt, allerdings noch keine verfrühte Seneszenz auf, womit hier möglicherweise ein Sekundäreffekt durch die Pilzinfektion hervorgerufen wurde.



**Abb. 3.14: Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea***

Für die Infektion mit *Botrytis cinerea* wurden 5 Wochen alte Pflanzen der zu untersuchenden Linien verwendet. Eine Sporensuspension von  $5 \times 10^5$  Sporen/ml in  $\frac{1}{4}$  PDB-Medium wurden zu je 5  $\mu$ l auf eine Blatthälfte aufgetropft und pro Pflanze 2 Blätter infiziert. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach einem Tag (A), 3 Tagen (B) und 14 Tagen (C) wurden die infizierten Pflanzen fotografiert.

Die Messung der Läsionsdurchmesser ließ keine deutliche Unterscheidung zwischen Wildtyp-, komplementierten- und *atg*-KO-Pflanzen zu, wenngleich wie in Abb. 3.15 beispielhaft für *atg7* gezeigt, die Läsionsdurchmesser minimal größer erschienen.



**Abb. 3.15: Läsionsdurchmesser der *atg7*-KO-Linie nach Infektion mit *Botrytis cinerea***

5 Wochen alte Pflanzen der Linien *Ws*, *atg7* und *atg7/ATG7* wurden mit *Botrytis cinerea* infiziert. Dazu wurden 5 µl Sporen ( $5 \times 10^5$  Sporen/ml in  $\frac{1}{4}$  PDB-Medium) auf eine Blatthälfte aufgetropft und der Infektionsverlauf über die Messung des Läsionsdurchmessers nach 3, 4 und 5 Tagen an jeweils 8 Pflanzen pro Linie ermittelt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwerts dar.

Die Ergebnisse gaben aber einen Hinweis darauf, dass die *atg*-Mutanten nach Infektion mit einem nekrotrophen Pilz möglicherweise ein verändertes Verhalten zeigen, weswegen im Weiteren auf den weniger aggressiven Pilz *Alternaria brassicicola* zurückgegriffen wurde, der in seinen Infektionsverläufen zudem weniger Variabilität aufweist.

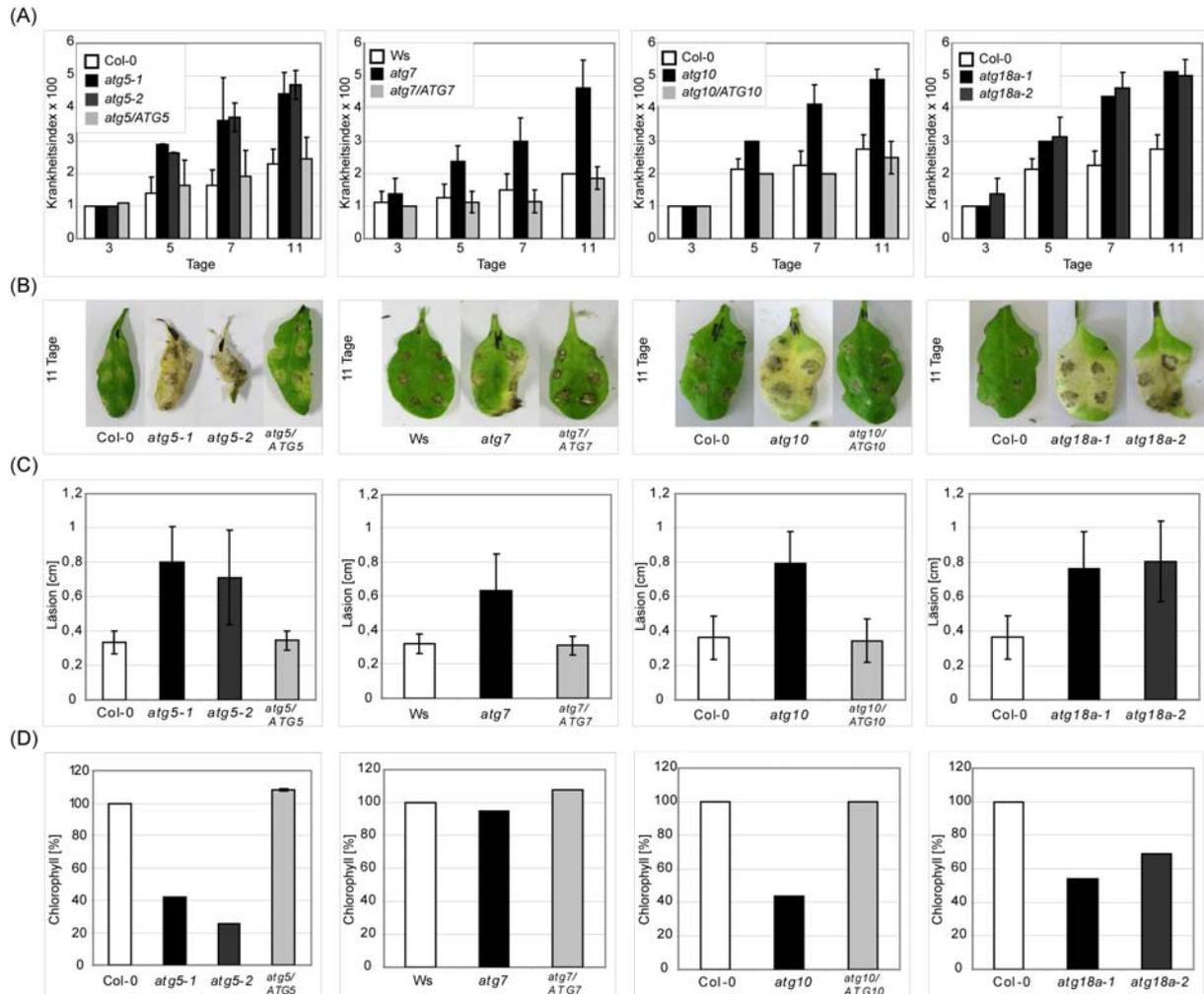
### 3.6.2 Infektionen mit *Alternaria brassicicola*

*Alternaria* Infektionen wurden an 5 Wochen alten Pflanzen durchgeführt. Zur Durchführung von Kategorisierungen (1 = leicht infiziert, 6 = schwere Chlorosen und Sporenbildung) und verschiedenen Färbungen wurden je Pflanze 2 Blätter mit je 6 Auftropfstellen (5 µl) mit einer Sporensuspension von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml infiziert. Für Läsionsmessungen wurden für deutlichere Unterscheidungen des einzelnen Infektionsortes nur 2 - 4 Tropfen pro Blatt aufgetropft. Die Pflanzen wurden unter Kurztagbedingungen und annähernd 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert (Kap. 2.9.6.1).

#### 3.6.2.1 Bonitur, Chlorophyllgehalt und Läsionsdurchmesser

Die Bonitur der infizierten Blätter erfolgte nach 1, 3, 5, 7 und 11 Tagen. Wie in Abb. 3.16 (A) deutlich zu erkennen ist, zeigten alle getesteten *atg*-Linien schwerere Krankheitssymptome als ihre entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien. Makroskopisch wurden die Unterschiede besonders nach 11 Tagen sichtbar, wie aus der Abb. 3.16 (B) zu entnehmen ist. Die Blätter der KO-Linien *atg5-1* und *atg5-2* sind bereits nahezu nekrotisch, während Blätter der Linien *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* schwer chlorotisch sind. Ähnliche Ergebnisse, wenn auch in schwächerer Ausprägung ergaben sich auch für die *atg7*-Mutante. Wurden die Läsionsdurchmesser nach 7 Tagen gemessen, so erkannte man in den *atg5-1*-, *atg5-2*-, *atg10*-, *atg18a-1* und *atg18a-2*-Linien im Col-0 Hintergrund nahezu eine

Verdoppelung der Läsionsausprägung im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abb.3.16 (C)). Ebenfalls größere Läsionen wurden auch in der *atg7*-Linie gefunden, die aber lediglich um ca. 1/3 größer waren. Die Unterschiede der KO-Linien zu den Kontroll-Linien ließen sich ebenfalls durch den in den *atg*-Mutanten erhöhten Chlorophyllverlust (Abb. 3.16, (D)) verdeutlichen.



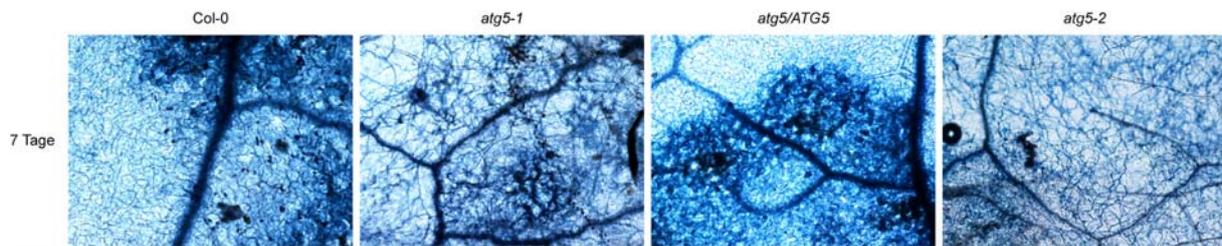
**Abb. 3.16: Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola***

(A) Sporensuspensionen von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml wurden hergestellt und jeweils 6 Tropfen/Blatt auf 5 Wochen alte Pflanzen aufgebracht, um nach bestimmten Zeitabständen (1 - 11 Tage) den Krankheitsindex (1= leicht infiziert; 6 = schwere Chlorosen und Sporenbildung) zu bestimmen. Dieser Versuch wurde je Datensatz für *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* mehrfach durchgeführt (n = 9; 12; 3; 8). (B) zeigt den makroskopischen Phänotyp nach 11 Tagen Infektion. (C) 7 Tage nach Pathogenbehandlung wurden Läsionsdurchmesser an Blättern mit nur 2 - 4 Tropfen Sporensuspension und damit besserer Läsionsabgrenzung gemessen. (D) 10 infizierte Blätter wurden „gepoolt“, das Chlorophyll in Methanol extrahiert und die Chlorophyllkonzentration gemessen. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des jeweiligen Mittelwertes dar.

### 3.6.2.2 Trypanblaufärbung als Zelltodindikator

Zur Aufklärung der erhöhten Anfälligkeit der *atg*-Mutanten gegenüber *Alternaria brassicicola* wurden Reaktionen der Pflanzen näher untersucht. An den Infektionsstellen wurde zunächst die Zelltodausprägung mittels Trypanblaufärbung analysiert (Kap. 2.9.9). Während der Zelltod im Wildtyp und den komplementierten Linien auf die Infektionsstelle beschränkt blieb, kam es in den *atg*-Linien zu einer intensiveren Färbung und Ausbreitung über die

Infektionsstelle hinaus. Häufig war diese Ausbreitung auch von einem vermehrten Hyphenwachstum begleitet, wie exemplarisch für die *atg5*-KO-Linien gezeigt ist (Abb. 3.17).



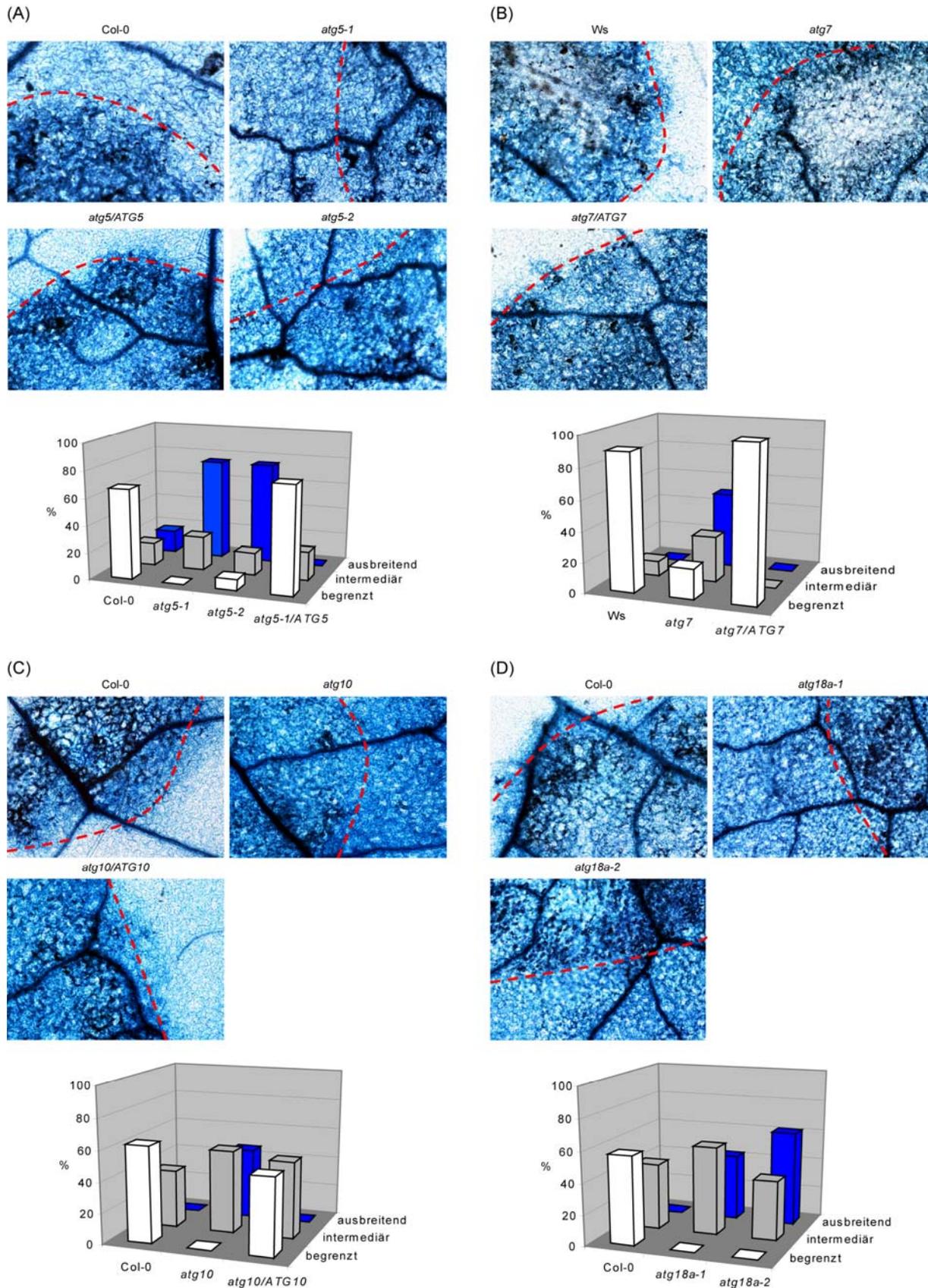
**Abb. 3.17: Trypanblaufärbungen nach Infektion mit *Alternaria brassicicola***

Sporensuspensionen von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml wurden hergestellt und jeweils 6 Tropfen/Blatt auf 5 Wochen alte Pflanzen aufgebracht, um nach 7 Tagen Trypanblaufärbungen als Indikator für Zelltod durchzuführen. Pilzhypen wurden ebenfalls mittels Trypanblau gefärbt, die zu diesem Stadium nur in den Linien *atg5-1* und *atg5-2* gefunden werden konnten, nicht jedoch im Wildtyp bzw. der komplementierten Linie.

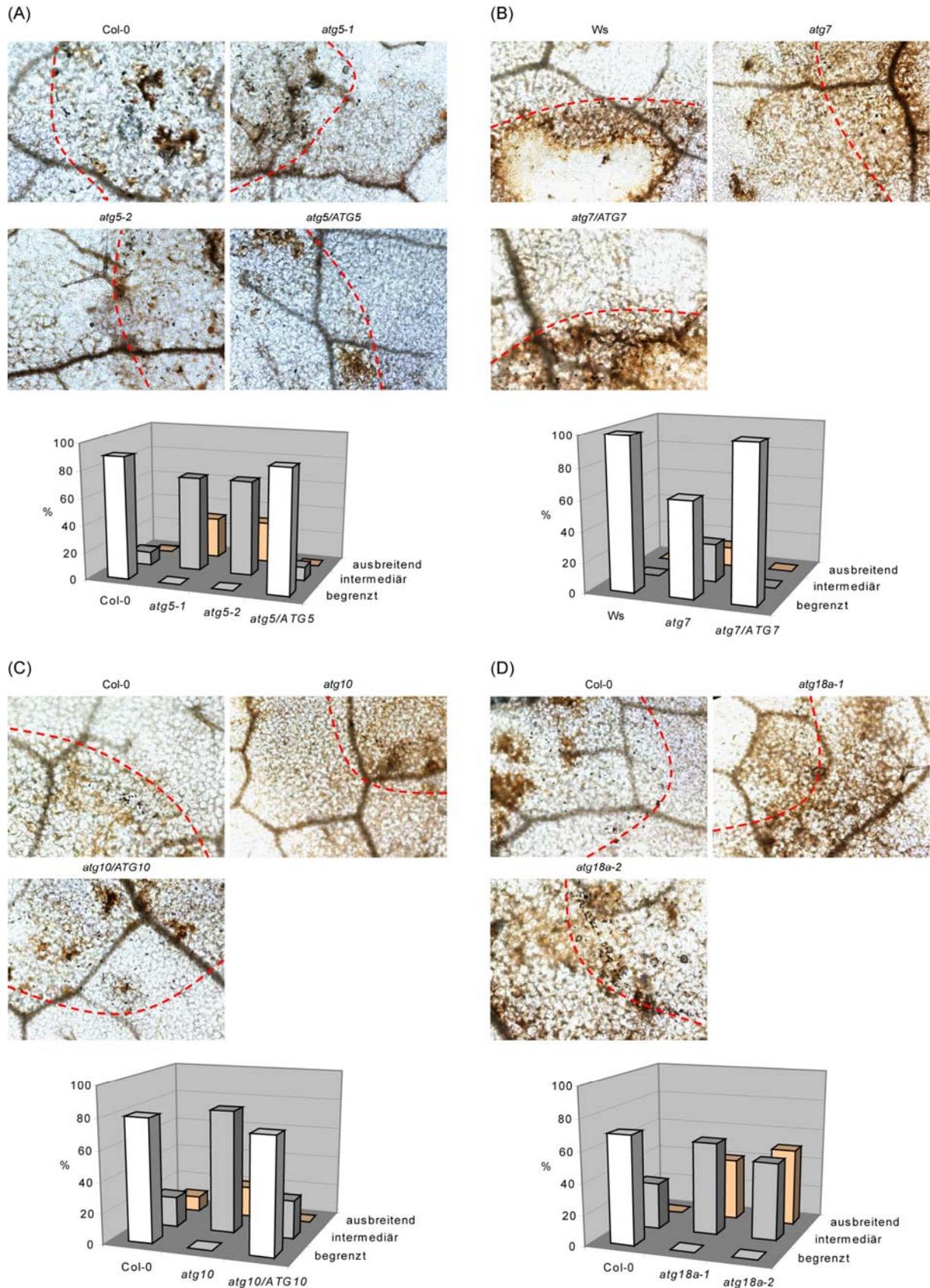
Kategorisiert man zwischen „begrenzt“, „intermediär“ und „ausbreitend“, so konnte nach Analyse dreier unabhängiger Experimente mit insgesamt 16 Blättern beobachtet werden, dass alle *atg*-Linien in maximal 20 % der Fälle (*atg7*) eingegrenzten Zelltod zeigten, wogegen dies bei mindestens 50 % der Wildtyp und komplementierten Linien der Fall war. Ausbreitenden Zelltod zeigten 70 % der *atg5*-Linien, über 60 % der *atg7*-Linien und ca. 40 % der *atg10*- und *atg18a*-Linien. Dieser unkontrollierte Zelltod zeigte sich nur in maximal 20 % der Fälle in den Kontrolllinien. Abb. 3.18 gibt diese Daten in Diagrammen wieder. Die Mutanten *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* weisen somit drastische Probleme in der Begrenzung des Zelltodes nach Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* auf.

### 3.6.2.3 DAB-Färbung als ROS-Nachweis

Begleitend zur Zelltodanalyse wurde auch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) untersucht. Dazu wurden DAB-Färbungen durchgeführt (Kap. 2.9.8). Betrachtet man Abb. 3.19 (A), so lässt sich mikroskopisch eine erhöhte ROS-Produktion beider *atg5*-Linien feststellen, was aber lediglich in ca. 30 % der Fälle deutlich auftritt. Wenngleich die prozentuale Erhöhung niedrig erscheint, so konnte für Col-0- und *atg5/ATG5*-Pflanzen keinerlei erhöhte bzw. sich um die Infektionsstelle herum ausbreitende ROS-Produktion beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für die weiteren *atg*-Linien gefunden (Abb. 3.19 (B), (C), (D)). Betrachtet man die Diagramme, eine Summe dreier unabhängiger Experimente mit insgesamt jeweils  $n \geq 8$  Blättern, so wurden Unterschiede zwischen *ATG*-defizienten Linien und Wildtyp- und komplementierten Linien zwar deutlich, die Ausprägung der Unterschiede war allerdings schwächer als es für Trypanblaufärbungen als Zelltodnachweis der Fall war.



**Abb. 3.18: Trypanblaufärbungen als Indikator für den Zelltod nach Infektion mit *Alternaria brassicicola***  
 Sporensuspensionen von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml wurden hergestellt und jeweils 6 Tropfen/Blatt auf 5 Wochen alte Pflanzen aufgebracht, um nach 7 Tagen Trypanblaufärbungen als Indikator für Zelltod durchzuführen. Rot-gestrichelte Linien umschließen die Infektionsstelle. Insgesamt wurden  $n = 16$  Blätter der Linien *atg5-1*, *atg5-2* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D) aus drei unabhängigen Infektionsversuchen untersucht und ihre Zelltodausprägung in „begrenzt“, „intermediär“ und „ausbreitend“ kategorisiert.



**Abb. 3.19: DAB-Färbungen als Indikator für ROS-Produktion nach Infektion mit *Alternaria brassicicola***

Zur Überprüfung von ROS-Bildung wurden Sporensuspensionen von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml zu je 6 Tropfen/Blatt auf 5 Wochen alte Pflanzen aufgebracht, um nach 7 Tagen DAB-Färbungen durchzuführen. Rot-gestrichelte Linien umschließen die Infektionsstelle. Insgesamt wurden  $n = 10$  Blätter der Linien *atg5-1*, *atg5-2* (A), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D) und  $n = 8$  Blätter für *atg7* (B) aus drei unabhängigen Infektionsversuchen untersucht und ihre Zelltodausrprägung in „begrenzt“, „intermediär“ und „ausbreitend“ kategorisiert.

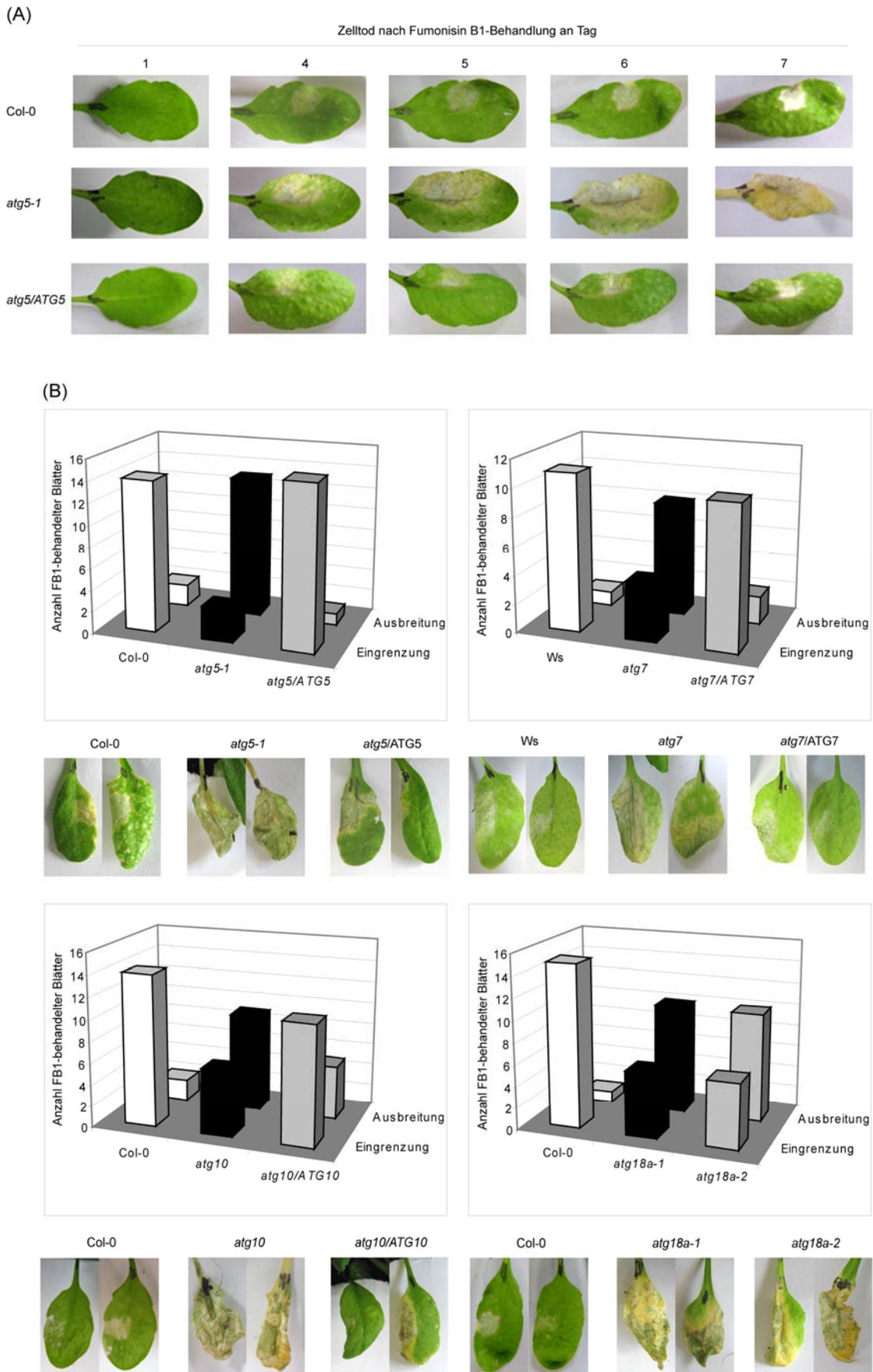
Dass es sich hierbei nicht um spontane Zelltodreaktionen handelt, wurde durch Untersuchung nicht-infizierter Blätter ausgeschlossen (Abb. 3.8). Ausschließlich Blätter der ATG-defizienten Linien, die mit dem nekrotrophen Pilz infiziert wurden, zeigten erhöhte Zelltodraten und eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.

### 3.7 Toxinbehandlung: Fumonisin B1 und NLP<sub>pp</sub>

Da nekrotrophe Pilze Toxine synthetisieren, wurden diese direkt appliziert, um deren Beteiligung an dem nach *Alternaria* Infektion festgestellten unkontrollierten Zelltod zu überprüfen. Zur Induktion des Zelltodes kann man sich eine Reihe phytotoxischer Substanzen zu Nutze machen. FB1 (Kap. 3.5), ein Mykotoxin der Gruppe der Sphinganinanaloga wird von *Alternaria* und *Fusarium* spp. gebildet. Sowohl in Pflanzen als auch in Tieren bewirkt es die Auslösung einer apoptotischen Form des programmierten Zelltodes in Gewebe-Zellkulturen (Tolleson et al.; 1996, Wang et al.; 1996a, Wang et al.; 1996b, Yoo et al.; 1996, Gilchrist; 1997, Stone et al.; 2000). Vermutlich inhibiert FB1 die Ceramid-Synthase, ein Schlüsselenzym der Sphingolipidbiosynthese (Wang et al.; 1991, Abbas et al.; 1994, Gilchrist et al.; 1995, Yoo et al.; 1996). Dieses kommerziell erhältliche Toxin wurde nun im Vergleich zu einem weiteren Toxin, dem NLP<sub>pp</sub> des hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora parasitica* an *Arabidopsis* Blättern getestet. NLP<sub>pp</sub> löst im Gegensatz zu FB1 keinen HR-ähnlichen Zelltod aus, sondern verursacht Zellschäden, in dessen Folge es zur Bildung von DAMPs (Kap. 1.1) kommt, die immunstimulierend wirken.

#### 3.7.1 Behandlung mit Fumonisin B1

FB1 wurde in einem Acetonitril/Wasser-Gemisch erhalten, welches als Kontrolle in Blätter infiltriert wurde und in allen getesteten Linien keinerlei makroskopische Symptome verursachte (Daten nicht gezeigt). Daher konnten 10 µM des Toxins in jeweils eine Blatthälfte aller Linien infiltriert (Fläche des Spritzenkopfes) und die durch das Toxin hervorgerufene Symptomatik insgesamt sieben Tage beobachtet werden. Wie die Abb. 3.20 (A) anhand von *atg5-1* darstellt, sind vier Tage nach Fumonisinbehandlung deutliche Läsionen des Blattgewebes in Wildtyp-, komplementierter- und KO-Linie zu beobachten. Diese Nekrosen wurden bereits zuvor auch in Wildtyp-Pflanzen von *Arabidopsis* und Tomate beschrieben (Gilchrist et al.; 1992, Stone et al.; 2000). Während nach fünf Tagen der Zelltod in der Wildtyp- und komplementierten Linie noch auf die Infiltrationsstelle begrenzt blieb, konnte man bereits eine Zelltodausbreitung in der *atg5-1*-Mutante feststellen. Nach sechs Tagen war der Zelltod über die Blattader hinaus auf die andere Blatthälfte ausgebreitet, während nach sieben Tagen in der Mutante kein gesundes Gewebe mehr erhalten war.



**Abb. 3.20: Toxinbehandlung mit Fumonisin B1 aus *Fusarium moniliforme* als Zelltodverursacher**

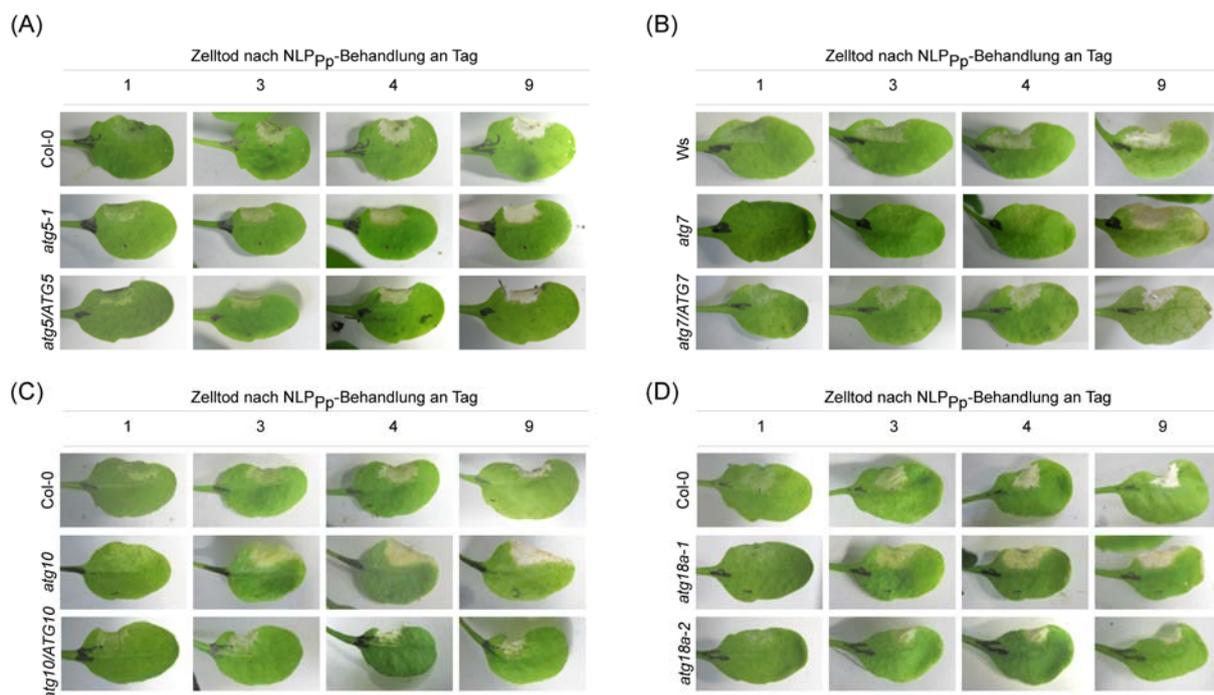
(A) 5 Wochen alte Blätter, exemplarisch gezeigt für die *atg5-1*-Linie, wurden mit 10  $\mu$ M Fumonisin B1 halbseitig infiltriert und die Symptomatik nach 1, 4, 5, 6 und 7 Tagen verfolgt. (B) Insgesamt wurden für *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* 16 Blätter, für *atg7* 12 Blätter untersucht und in Zelltodausbreitung bzw. Eingrenzung kategorisiert. Gezeigt sind Blattaufnahmen nach 7 Tagen Infektion.

Auch die anderen *atg*-Linien wiesen unkontrollierten Zelltod auf (Abb. 3.20 (B)). Wenngleich einige Blätter sich wie Wildtyp- und komplementierte Linie verhielten (Abb. 3.20, Diagramme), zeigte doch die Mehrheit den sich unkontrolliert ausbreitenden Zelltod-Phänotyp.

Schlußfolgernd lässt sich festhalten, dass *atg*-Mutanten in der Regulation des Zelltodes nach FB1-Behandlung gestört sind.

### 3.7.2 Behandlung mit NLP<sub>Pp</sub>

Als weiteres Toxin fand das aus dem hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora parasitica* gewonnene Toxin NLP<sub>Pp</sub> Verwendung. Nach bereits drei Tagen war, wie in Abb. 3.21 gezeigt, eine deutliche Läsion an der Infiltrationsstelle zu beobachten. Dies zeigt, dass der nekrotische Zelltod somit in den *atg*-Mutanten nicht verändert zu sein scheint. Im Gegensatz zu FB1, welches PCD induziert, blieb die Läsion auch nach neun Tagen in allen Linien auf den Applikationsort beschränkt.



**Abb. 3.21: Toxinbehandlung mit NLP<sub>Pp</sub> aus *Phytophthora parasitica***

5 Wochen alte Blätter der Linien *atg5-1* (A), *atg7* (B), *atg10* (C) *atg18a-1* und *atg18a-2* (D) mit ihren entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien wurden mit 2  $\mu$ M NLP<sub>Pp</sub> halbseitig infiltriert (n = 7 Blätter) und der Zelltod an der Infiltrationsstelle über 9 Tage auf Ausbreitung oder Begrenzung analysiert. Dieser Versuch wurde mit ähnlichen Ergebnissen einmal wiederholt und zeigt jeweils ein repräsentatives Blatt.

Diese Ergebnisse zeigen somit, dass die ATG-defizienten Linien in der Zelltodregulation nach Infektion nekrotropher Pilze oder derer Toxine gestört sind. Jedoch ist dies nicht der Fall für Nekrose auslösende Toxine, die aus hemibiotrophen Pilzen isoliert wurden. Dieser

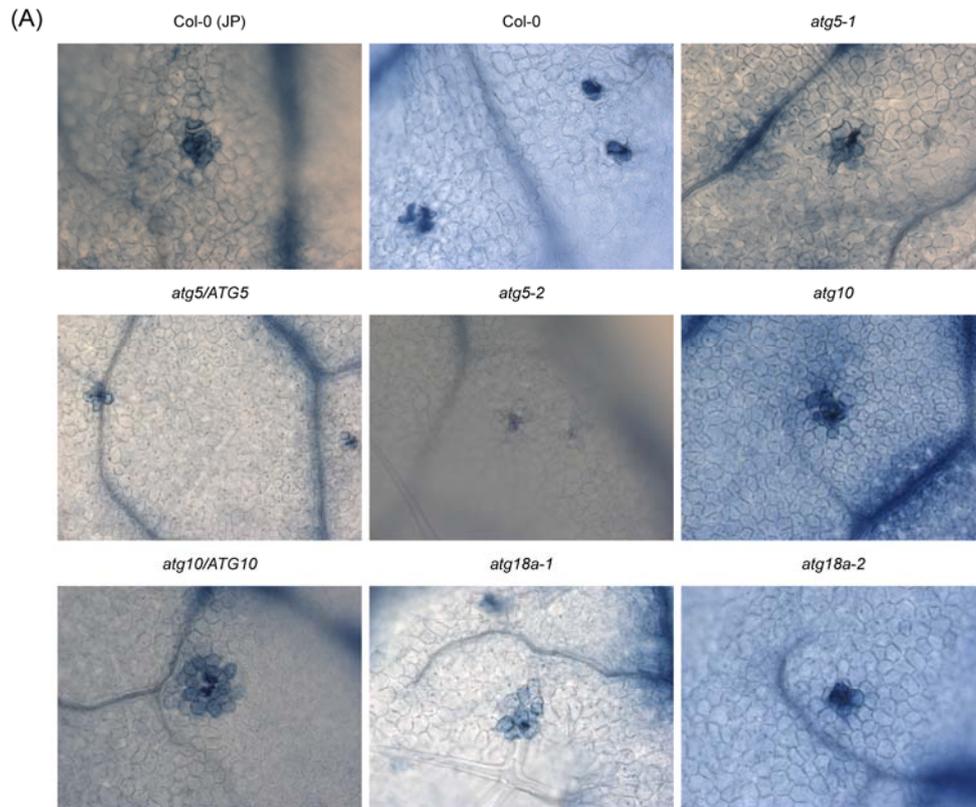
Befund gibt einen Hinweis darauf, dass abhängig von der Ernährungsweise des Phytopathogens, eine mögliche Spezifität der Zelltodregulation existiert.

### **3.8 Einfluss der Autophagie-Mutationen auf Infektion mit biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen**

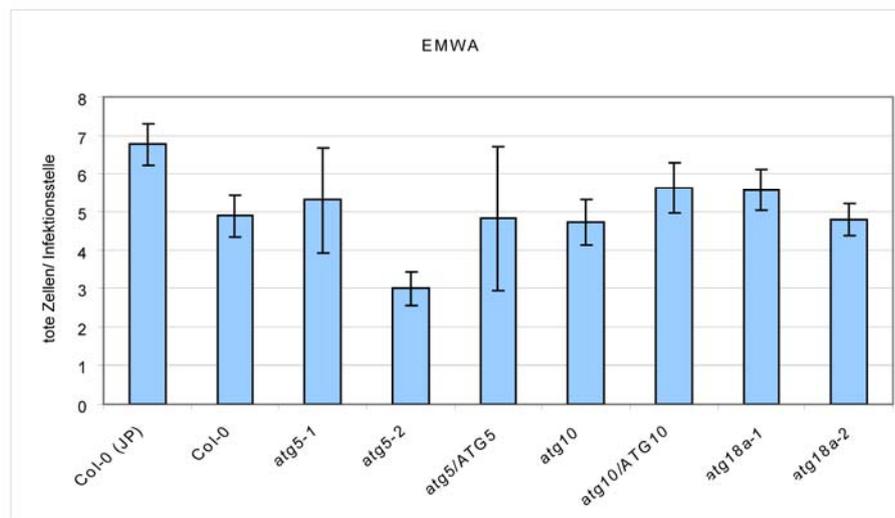
Nach Analyse nekrotropher Pathogene sollte ebenfalls der Einfluss der Autophagie-Mutationen auf Befall mit biotrophen bzw. hemibiotrophen Pathogenen analysiert werden. Dazu wurden einerseits in Kollaboration mit J. Parker (MPI für Pflanzenzüchtung) Infektionen mit *Hyaloperonospora arabidopsidis* (*Ha*) und andererseits Infektionen mit *Pseudomonas syringae* durchgeführt. Somit wurde jeweils ein Vertreter biotropher Oomyceten und hemibiotropher Bakterien für Infektionsversuche ausgewählt.

#### **3.8.1 Infektionen mit *Hyaloperonospora arabidopsidis***

Für Infektionen wurden sowohl virulente als auch avirulente Stämme des Oomyceten *Ha* verwendet. Da die *atg*-Linie *atg7* im Ws-Hintergrund ist, während die anderen Linien einen Col-0 Hintergrund aufweisen, mussten unterschiedliche Stämme verwendet werden. Der Stamm EMWA ist im Ökotyp Col-0 avirulent, wogegen dieser Stamm im Ws-Hintergrund virulent ist. Im Gegensatz dazu verhält sich der *Ha*-Stamm NOCO2 virulent auf Col-0 und avirulent auf Ws. Als dritter Stamm wurde WACO verwendet, der auf beiden Wildtyp-Hintergründen virulent ist. Abb. 3.22 zeigt eine Infektion mit Sporen des avirulenten Stammes EMWA auf den *atg*-Mutanten *atg5-1*, *atg5-2*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2*. Die Analyse der Trypanblaufärbungen 33 h nach Infektion ließ keinerlei Unterscheidung in der Ausprägung des Zelltodes zwischen den Linien zu (Abb. 3.22 (A)). Die Quantifizierung toter Zellen pro Infektionsstelle ergab ebenfalls keinerlei signifikanten Unterschiede in Wildtyp-, komplementierten- oder KO-Linien (Abb. 3.22(B)).



(B)

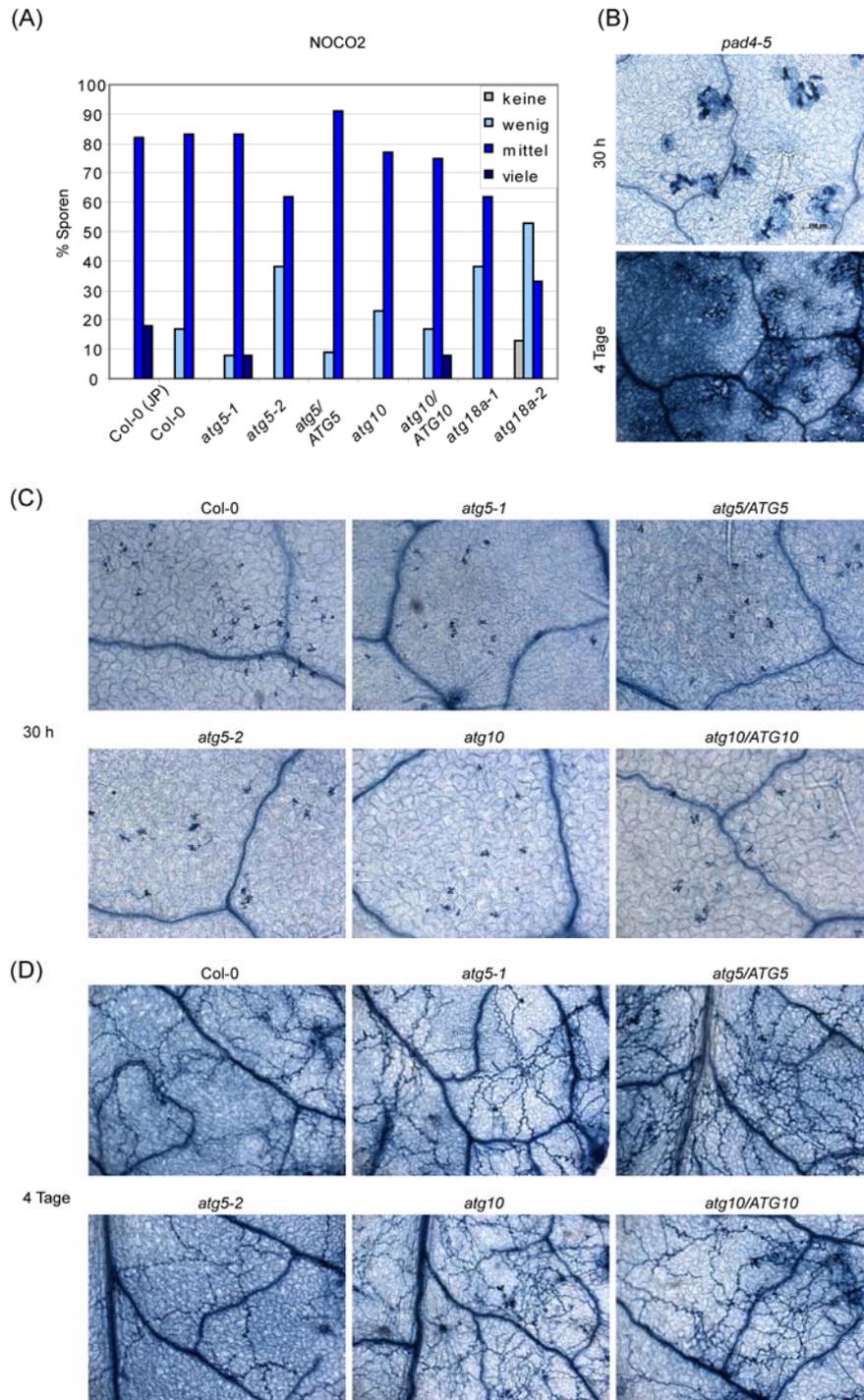


**Abb. 3.22: Infektion mit dem avirulenten Stamm *Hyaloperonospora arabidopsidis* EMWA**

(A) Pflanzen der Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* wurden mit  $4,2 \times 10^5$  Sporen/ml infiziert und Trypanblaufärbungen nach 33 h durchgeführt. Tote Zellen wurden blau angefärbt, wobei keine Unterschiede in der Ausprägung des Zelltods zwischen den KO-Linien und den Wildtyp- und komplementierten Linien festgestellt werden konnten.

(B) Die Anzahl der toten Zellen/Infektionsstelle wurde in allen Linien quantifiziert und eigene Col-0 Pflanzen aus Jane Parkers Gruppe verglichen (Col-0 (JP)). Diese unterschiedlichen Col-0 Linien zeigten Schwankungen im Bereich von 5 - 7 toten Zellen/Infektionsstelle. Generell lagen die ermittelten Werte in allen Linien zwischen 3 - 7 toten Zellen/Infektionsstelle, wobei in 3 unabhängigen Experimenten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden konnten.

Auch Infektionen mit dem im Col-0 Hintergrund virulenten Stamm NOCO2 ergaben keine Unterschiede (Abb. 3.23). Die Sporenbildung wurde an den jeweiligen Infektionsorten überprüft (Abb. 3.23 (A)) und Trypanblaufärbungen zu frühen (30 h; Abb. 3.23 (C)) und späten Infektionszeitpunkten (4 Tage; Abb. 3.23 (D)) durchgeführt.



**Abb. 3.23: Infektion mit dem virulenten Stamm *Hyaloperonospora arabidopsidis* NOCO2**

(A) 3 Wochen alte Pflanzen der Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* wurden mit  $3,9 \times 10^5$  Sporen/ml infiziert und die Sporenanzahl nach 4 Tagen in „keine, wenig, mittel und viele“ kategorisiert. Die Auszählung erfolgte in J. Parkers Labor in zwei unabhängigen Experimenten, wobei keine Unterschiede in der Sporenanzahl zwischen allen untersuchten Linien festgestellt werden konnten.

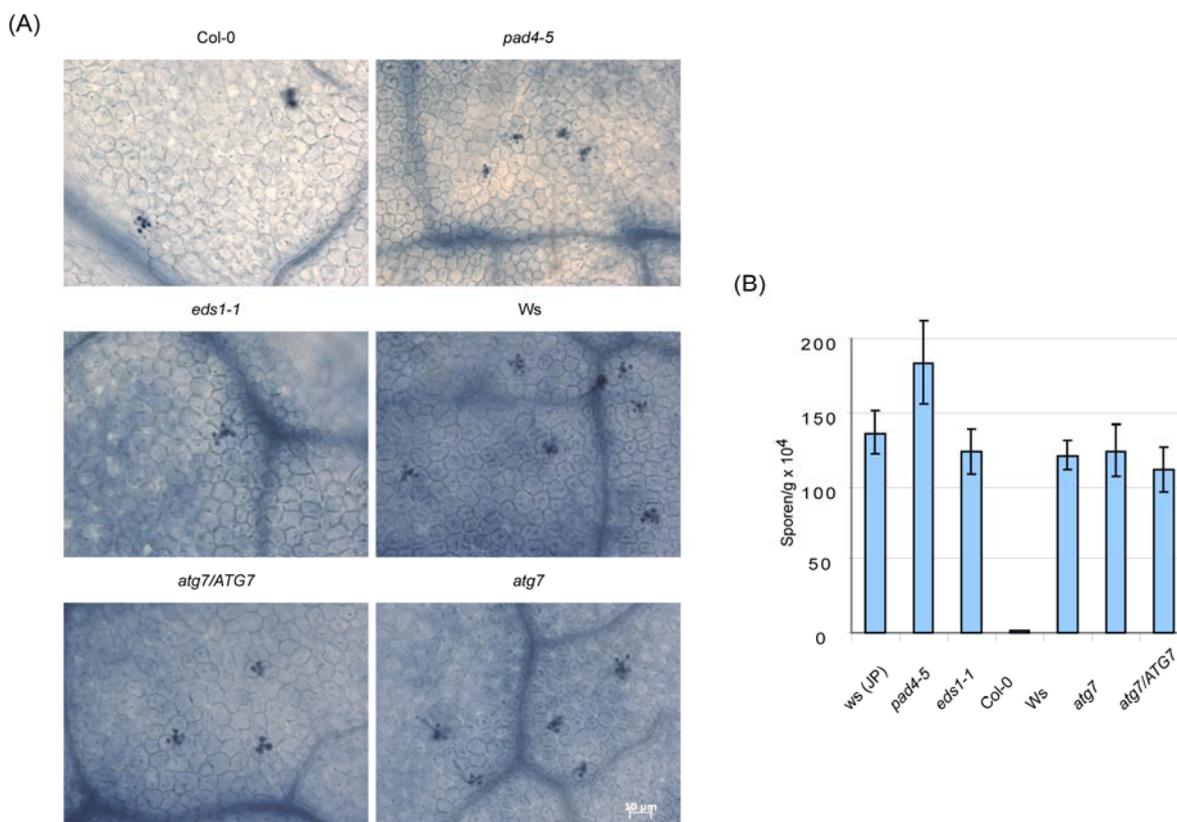
(B), (C) und (D) zeigen Trypanblaufärbungen, welche nicht nur tote Zellen sondern auch Pilzstrukturen anfärben.

(B) Als Positivkontrolle einer erfolgreichen Infektion wurden *pad4-5* Pflanzen in das Experiment mit eingeschlossen. Diese in der Bildung von Phytoalexinen gestörte Linie ist gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen in ihrer Resistenz beeinträchtigt, wie sich bereits nach 30 h, vor allem aber nach 4 Tagen zeigte. (C) und (D) zeigen Infektionsstadien nach 30 h bzw. 4 Tagen. Trotz starkem Hyphenwachstum blieb in allen Linien die Zelltodreaktion ausgeschaltet.

Zu frühen Zeitpunkten ließ sich die Ausbildung von Haustorien feststellen, die ebenfalls von dem Farbstoff angefärbt wurden, während bereits nach 4 Tagen starkes Hyphenwachstum zu beobachten war. Trotz starker Besiedelung des pflanzlichen Gewebes, konnte keine

Zelltodauslösung festgestellt werden. Da *PAD4* für die Resistenz gegenüber *Ha* benötigt wird (Slusarenko und Schlaich; 2003), wurden als Positivkontrolle für erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Ha*-Infektionen *pad4-5* („phytoalexin-deficient“)-Mutanten in die Experimente eingeschlossen.

Die Abb. 3.24 zeigt, anders als von Hofius et al. (2009) beschrieben, ebenfalls keinen Unterschied zwischen *atg7* und *Ws* bzw. *atg7/ATG7* nach virulentem *H. arabidopsidis* Befall. Trypanblaufärbungen sowie die Bestimmung der Sporenanzahl gaben keinen Hinweis auf verstärkten Zelltod. Der Autophagie-Defekt der hier untersuchten Linien beeinflusste somit weder positiv noch negativ die Immunität bzw. Suszeptibilität gegenüber dem obligat biotrophen Oomyceten *Ha*. Als Positivkontrolle für erhöhte Anfälligkeit wurden auch hier *pad4-5* Linien, als Negativkontrolle *eds1-1* („enhanced disease susceptibility“) (Aarts et al.; 1998) in das Experiment eingeschlossen.



**Abb. 3.24: Infektion mit den virulenten *Hyaloperonospora arabidopsidis* EMWA und WACO-Stämmen**

Die beiden im *Ws*-Hintergrund virulenten Stämme EMWA und WACO wurden in Infektionsversuchen für die einzige im *Ws*-Hintergrund befindliche Linie *atg7* mit ihrer entsprechenden komplementierten Linie und Wildtyp-Linie verwendet. (A) Trypanblaufärbungen wurden nach Infektion mit WACO durchgeführt, zeigten allerdings in keiner der Linien eine Akkumulation toter Zellen an der Applikationsstelle.

(B) Für die Sporenzählung wurde EMWA verwendet und die Menge der Sporen 5 Tage nach Applikation bestimmt. Der Vergleich gebildeter Sporenmengen ließ keine Unterscheidung der Linien untereinander zu. Als Positivkontrolle für Anfälligkeit wurde die *pad4-5* Linie verwendet, als Negativkontrolle *eds1-1* einbezogen.

### 3.8.2 Infektionen mit *Pseudomonas syringae*

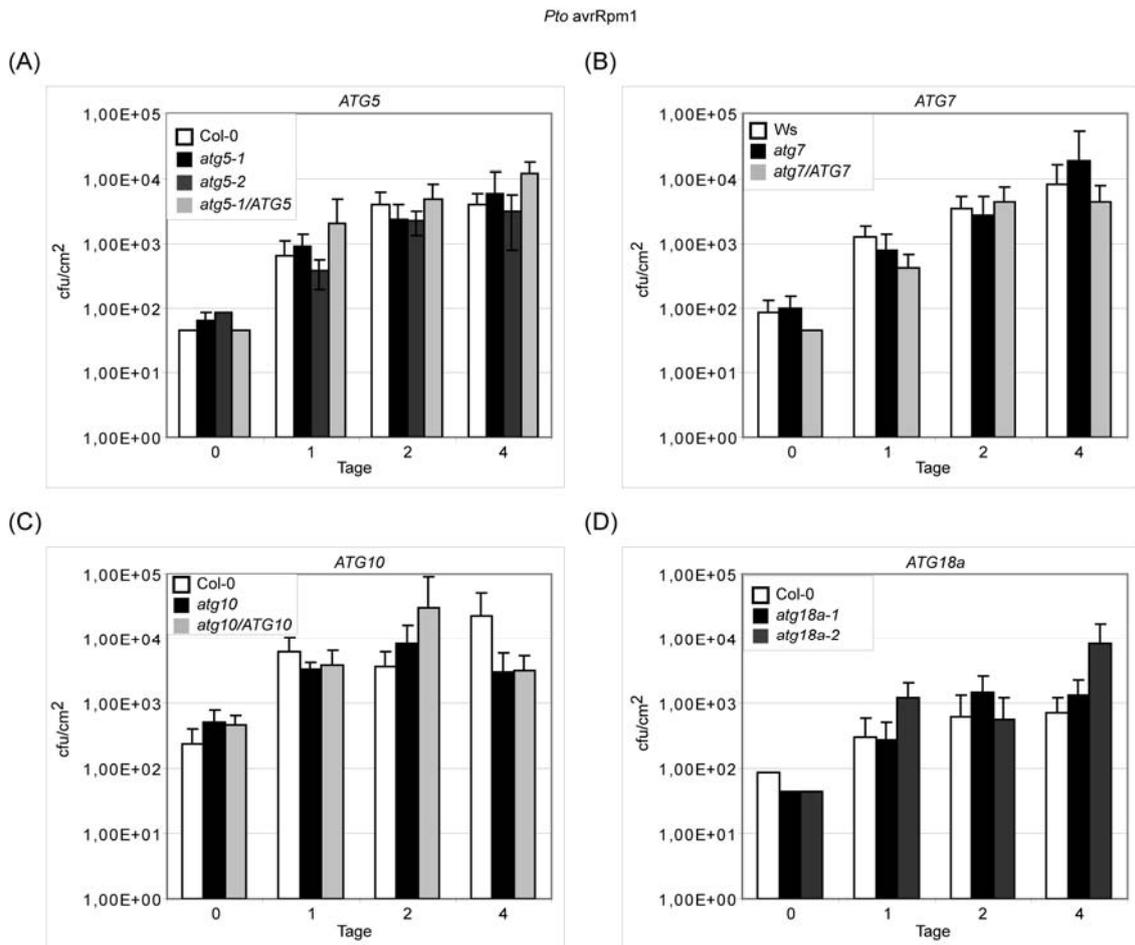
Nachdem festgestellt werden konnte, dass die Autophagie nicht an der Abwehr gegenüber obligat biotrophen Oomyceten beteiligt zu sein scheint, sollte getestet werden, ob dies ebenso für hemibiotrophe Pathogene gilt. Deshalb wurde als ein weiteres Pathogen das Bakterium *P. syringae* pv. *tomato* (*Pto*) näher analysiert. Ein möglicher Hinweis auf die Notwendigkeit des autophagischen Prozesses in der Immunität lieferten Mikroarraydaten (Tab. 3.1), da nach Infektion dieses Bakteriums eine erhöhte Expression zweier hier näher untersuchter *ATGs*, *ATG7* und *ATG18a*, beschrieben wurde.

#### 3.8.2.1 Bakterielle Wachstumskurven

Bakterielle Wachstumskurven wurden mit verschiedenen Bakterienstämmen unterschiedlicher Pathogenizität durchgeführt. Zur Verfügung standen das virulente Pathogen *Pto* DC3000, der avirulente Stamm *Pto* DC3000 *avrRpm1* (*Pto* *avrRpm1*), die Typ III-Sekretionssystem-defiziente Mutante (T3SS) *Pto* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> (*Pto* *hrcC*<sup>-</sup>), der nicht-virulente Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*), sowie die beiden Coronatin-defizienten Mutanten *Pto* DC3661 und *Pto* DC3000  $\Delta$ *cmaA/cfa6* (*Pto*  $\Delta$ *cmaA/cfa6*) (Kap. 2.2, Tab. 2.1). Nach 0, 1, 2 und 4 Tagen wurde das bakterielle Wachstum nach Infektion mit dem jeweiligen Pathogen quantifiziert (Kap. 2.9.5), um mögliche Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen, KOs und komplementierten Pflanzen feststellen zu können.

Da für die *atg6*-Mutante gezeigt werden konnte, dass der Zelltod nach Infektion mit *Pto* *avrRpm1* in seiner Regulation gestört war (Liu et al.; 2005, Patel und Dinesh-Kumar; 2008), wurde dieser Stamm in den Versuchsansatz integriert und in den vier verschiedenen *ATG*-Genotypen analysiert.

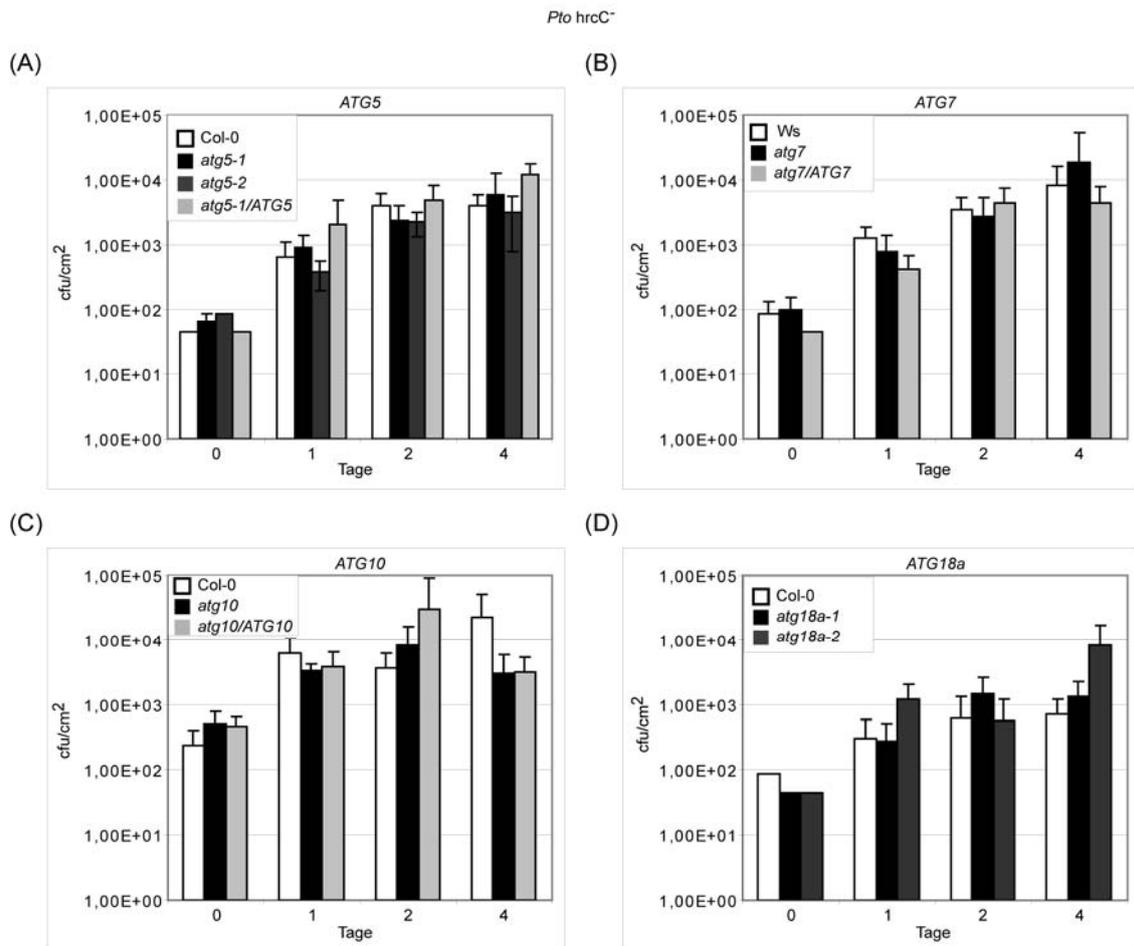
Vergleicht man das bakterielle Wachstum von *Pto* *avrRpm1* zwischen Wildtyp-, komplementierten und Autophagie-defizienten Pflanzen, so kann man erkennen, dass nach einem Tag bei allen Linien eine Zunahme des bakteriellen Wachstums um den Faktor 100 erfolgte (Abb. 3.25). Eine weitere deutliche Wachstumszunahme über die Folgetage bzw. Unterschiede waren indes nicht festzustellen, was belegt, dass der avirulente Stamm nicht zu einer erfolgreichen Besiedelung der Pflanzen fähig war und dass auch die Störung des Autophagie-Prozesses darauf keinen Einfluss hatte.



**Abb. 3.25: Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit dem avirulenten Pathogen *Pto* avrRpm1**

Die Diagramme zeigen das bakterielle Wachstum in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1*, *atg5-2* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D). 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension der Dichte  $1 \times 10^5$  cfu/ml inokuliert und das bakterielle Wachstum über 4 Tage quantifiziert. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte dar und wurden aus jeweils 6 Replikaten ermittelt. Dieser Datensatz ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

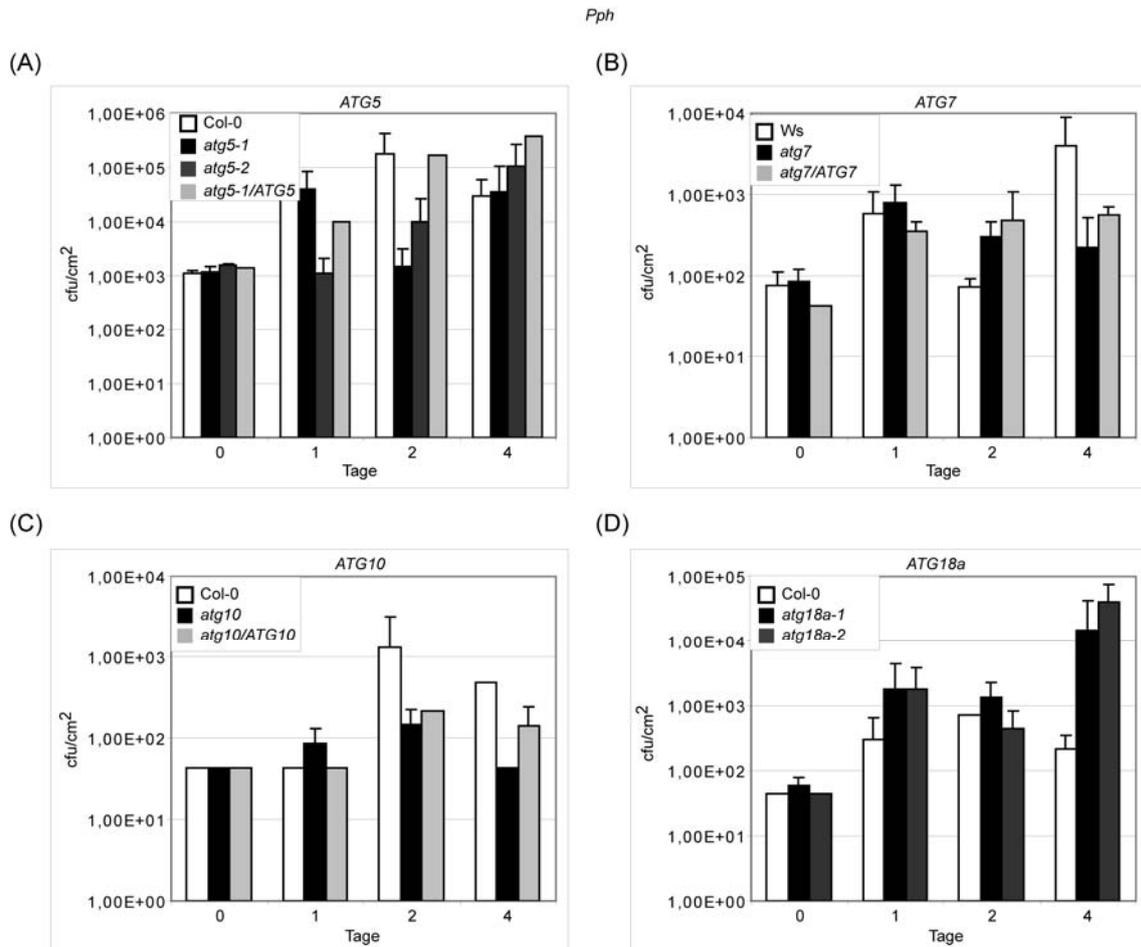
Auch die im T3SS-gestörte Mutante *Pto* *hrcC*<sup>-</sup> konnte in ihrem Wachstum in keiner der sechs getesteten *atg*-Mutanten einen signifikanten Unterschied zu Wildtyp-Pflanzen oder komplementierten Linien zeigen (Abb. 3.26). Erneut wurde nur eine sehr geringe Zunahme der Zellzahl um den Faktor 100 bis maximal 1000 mit anschließender Stagnation festgestellt.



**Abb. 3.26: Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit der T3SS-defizienten Mutante *Pto hrcC<sup>-</sup>***

Die Diagramme zeigen das bakterielle Wachstum in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1*, *atg5-2* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D). 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension der Dichte  $1 \times 10^4$  cfu/ml inokuliert und das bakterielle Wachstum über 4 Tage ermittelt. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte dar und wurden aus jeweils 6 Replikaten ermittelt. Dieser Datensatz ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

Auch Infektionen mit dem nicht an den Wirt *Arabidopsis* adaptierten Pathogen *Pph* konnten keinen Unterschied im Wachstum zwischen Wildtyp-, komplementierten- und KO-Linien hervorrufen (Abb. 3.27). Die für die Autophagiemutanten *atg18a-1* und *atg18a-2* gezeigte höhere Anfälligkeit kehrte sich im Folgeexperiment zu erhöhter Resistenz um, und ließ deshalb keine klare Aussage zu. Generell konnte sich das Nichtwirtspathogen nur sehr schwach im Blattmaterial vermehren.

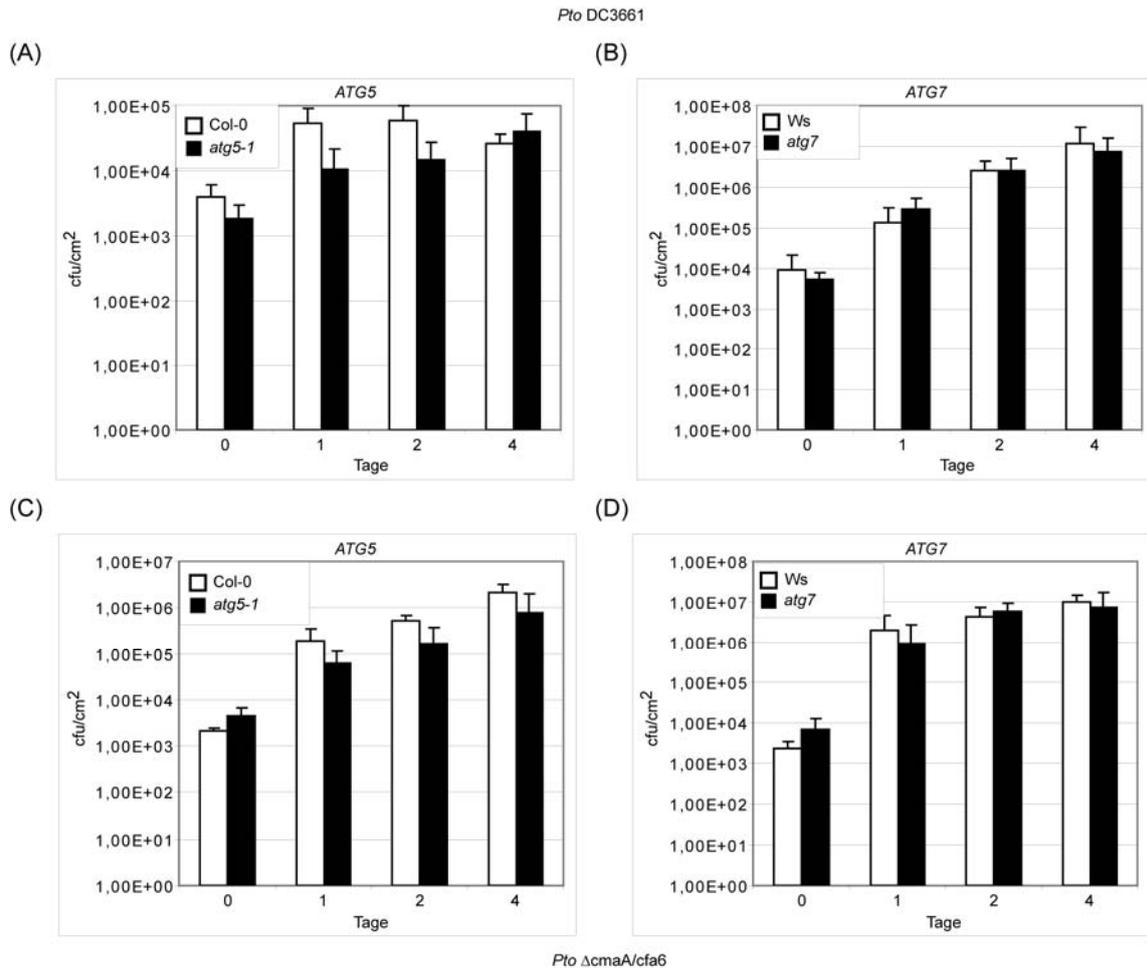


**Abb. 3.27: Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit dem nicht-virulenten Stamm *Pph***

Die Diagramme zeigen das bakterielle Wachstum in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D). 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension der Dichte  $1 \times 10^7$  cfu/ml inokuliert und das bakterielle Wachstum über 4 Tage ermittelt. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte dar und wurden aus jeweils 6 Replikaten ermittelt. Dieser Datensatz ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängig durchgeführte Versuche.

Die beiden Coronatin-defizienten Mutanten *Pto* DC3661 und *Pto*  $\Delta$ cmaA/cfa6 wurden verwendet, um herauszufinden, ob das Fehlen des Virulenzfaktors Coronatin (Rangaswamy et al.; 1998) Änderungen im Resistenzverhalten zwischen den *atg*-Linien oder Wildtyp-Linien hervorruft. Coronatin ist mit dem Pflanzenhormon Jasmonsäure strukturell verwandt und bewirkt eine Öffnung geschlossener Stomata (Melotto et al.; 2006). Auf diese Weise erleichtert es das Eindringen des Bakteriums. Es wurden *atg5*- und *atg7*-Linien getestet, die aber kein unterschiedliches Bakterienwachstum im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zeigten (Abb. 3.28).

Somit zeigt keine der getesteten *atg*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp oder zu den komplementierten Linien einen Wachstumsphänotyp nach Infektion verschiedener nicht-virulenter *Pto*-Stämme.

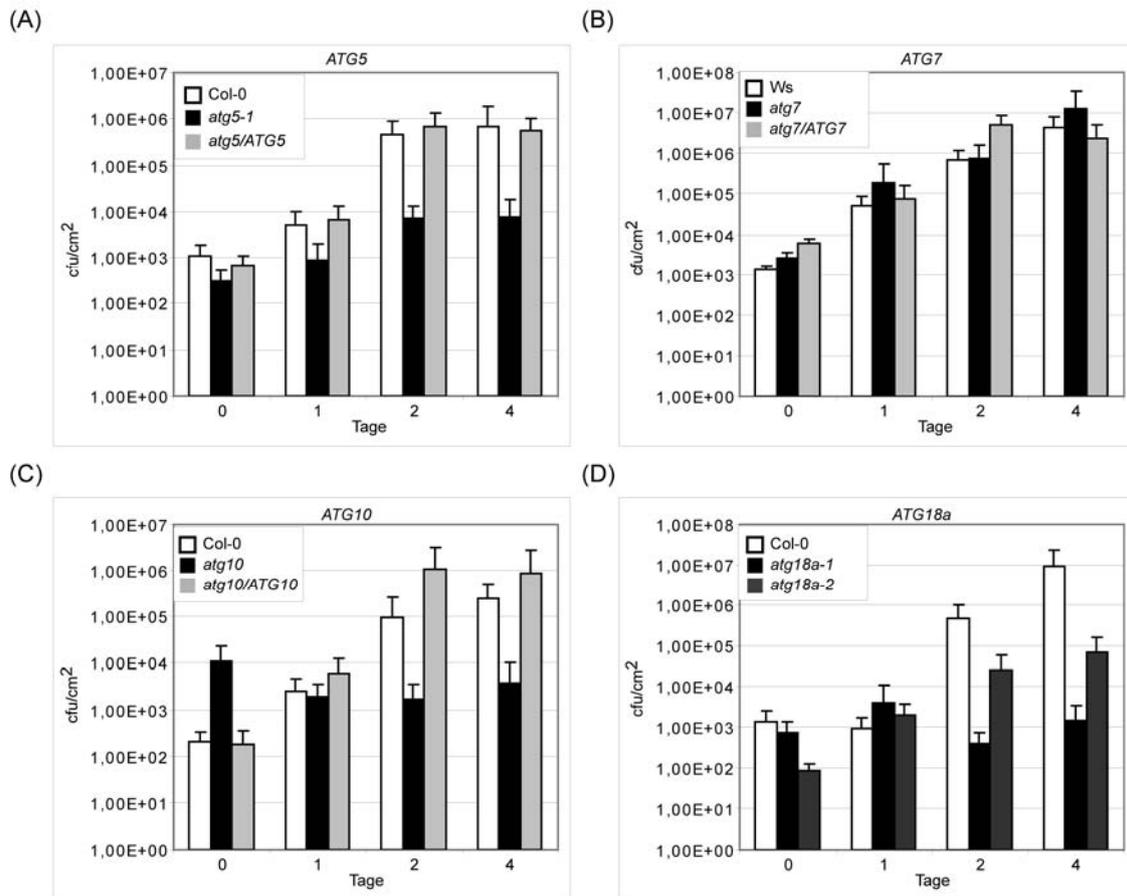


**Abb. 3.28: Bakterielle Wachstumskurven nach Infektion mit den Coronatin-defizienten Stämmen *Pto* DC3661 und *Pto* Δ*cmaA/cfa6***

Die Diagramme zeigen das bakterielle Wachstum in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1* und *atg7* nach Infektion mit *Pto* DC3661 (A) bzw. mit *Pto* Δ*cmaA/cfa6* (B). 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension der Dichte  $1 \times 10^4$  cfu/ml inokuliert und das bakterielle Wachstum über 4 Tage ermittelt. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte dar und wurden aus jeweils 6 Replikaten ermittelt. Die Experimente wurden mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Betrachtet man dagegen die Wachstumskurven des virulenten Stammes *Pto* DC3000, so lassen sich signifikante Unterschiede in den Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* im Vergleich zum Wildtyp und den komplementierten Linien feststellen (Abb. 3.29). In den Wildtyp- und komplementierten Pflanzen zeigte sich ein starkes Bakterienwachstum um den Faktor 1000-100.000 zum Ursprungswert am Tag 0. Die *atg*-Mutanten dagegen zeigten nur eine bakterielle Zunahme um den Faktor 100. Somit treten Unterschiede um den Faktor 100-1000 zwischen Wildtyp- und komplementierten Linien versus *atg*-Linien auf. Interessanterweise konnte für *atg7* kein solcher Wachstumsphänotyp festgestellt werden. Ein Grund hierfür könnte sein, dass *atg7* als einzige der hier untersuchten *atg*-Linien einen anderen genetischen Hintergrund (*Ws*) aufweist und die erhöhte Anfälligkeit von *atg*-Mutanten gegenüber *Pto* DC3000-Infektion ein spezifisches Merkmal für den *Col-0* Hintergrund ist. Im Vergleich zu *Ha* konnte somit nach Infektion mit dem hemibiotrophen Bakterium *Pto* DC3000 eine erhöhte Resistenz in den *atg*-KOs festgestellt werden.

Pto DC3000



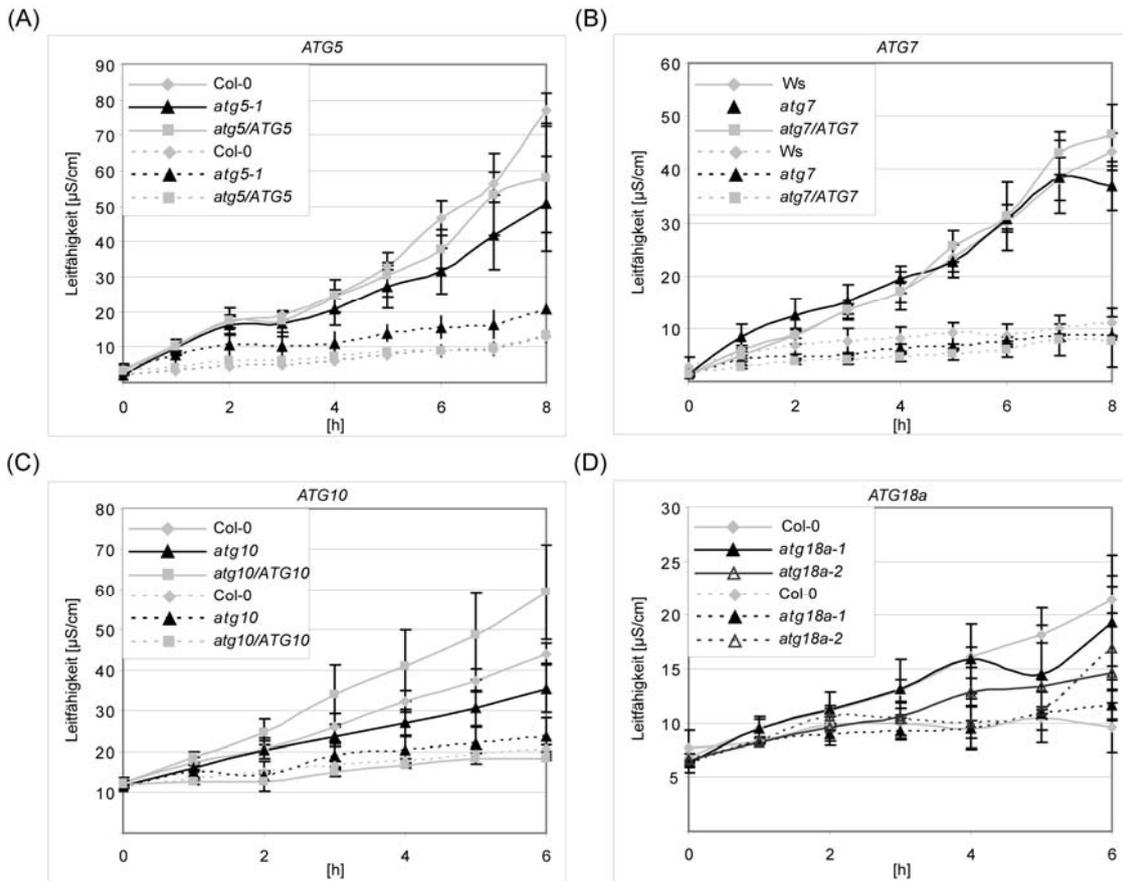
**Abb. 3.29: Bakterielle Wachstumskurven mit dem virulenten Pathogen *Pto* DC3000**

Die Diagramme zeigen das bakterielle Wachstum in den Autophagie-defizienten Linien *atg5-1* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D). 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension der Dichte  $5 \times 10^8$  cfu/ml mit 0,02 % (v/v) Silwet L-77 besprüht und das bakterielle Wachstum über 4 Tage ermittelt. Fehlerbalken stellen die jeweilige Standardabweichung der Mittelwerte dar und wurden aus jeweils 6 Replikaten ermittelt. Die gezeigten Diagramme stellen je ein repräsentatives Ergebnis aus mehreren Experimenten (*atg5-1*: n = 7, *atg7*: n = 5, *atg10*: n = 4, *atg18a-1* und -2: n = 7) dar.

Die Ursache dieser erhöhten Resistenz in den Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* gegenüber *Pto* DC3000 sollte in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

### 3.8.2.2 Ionenleitfähigkeitsmessungen

Eine erhöhte Zelltodrate nach Infektion könnte die Vermehrungs- bzw. Überlebensfähigkeit von *Pto* DC3000 insbesondere in der biotrophen Wachstumsphase einschränken, weswegen darin eine mögliche Erklärung des beobachteten Phänotyps gegeben wäre. Da in Zelltodprozessen durch Membranschäden Ionen freigesetzt werden, wurden Ionenleitfähigkeitsmessungen (Kap. 2.9.7) genutzt, um mögliche Unterschiede im Zelltodverhalten zu quantifizieren. Blätter wurden dazu mit dem virulenten Pathogen *Pto* DC3000 infiziert, Blattscheiben nach 24 h ausgestanzt und deren Ionenleitfähigkeit über mehrere Stunden gemessen (Abb. 3.30).



**Abb. 3.30: Ionenleitfähigkeitsmessungen nach *Pto* DC3000 Infektion**

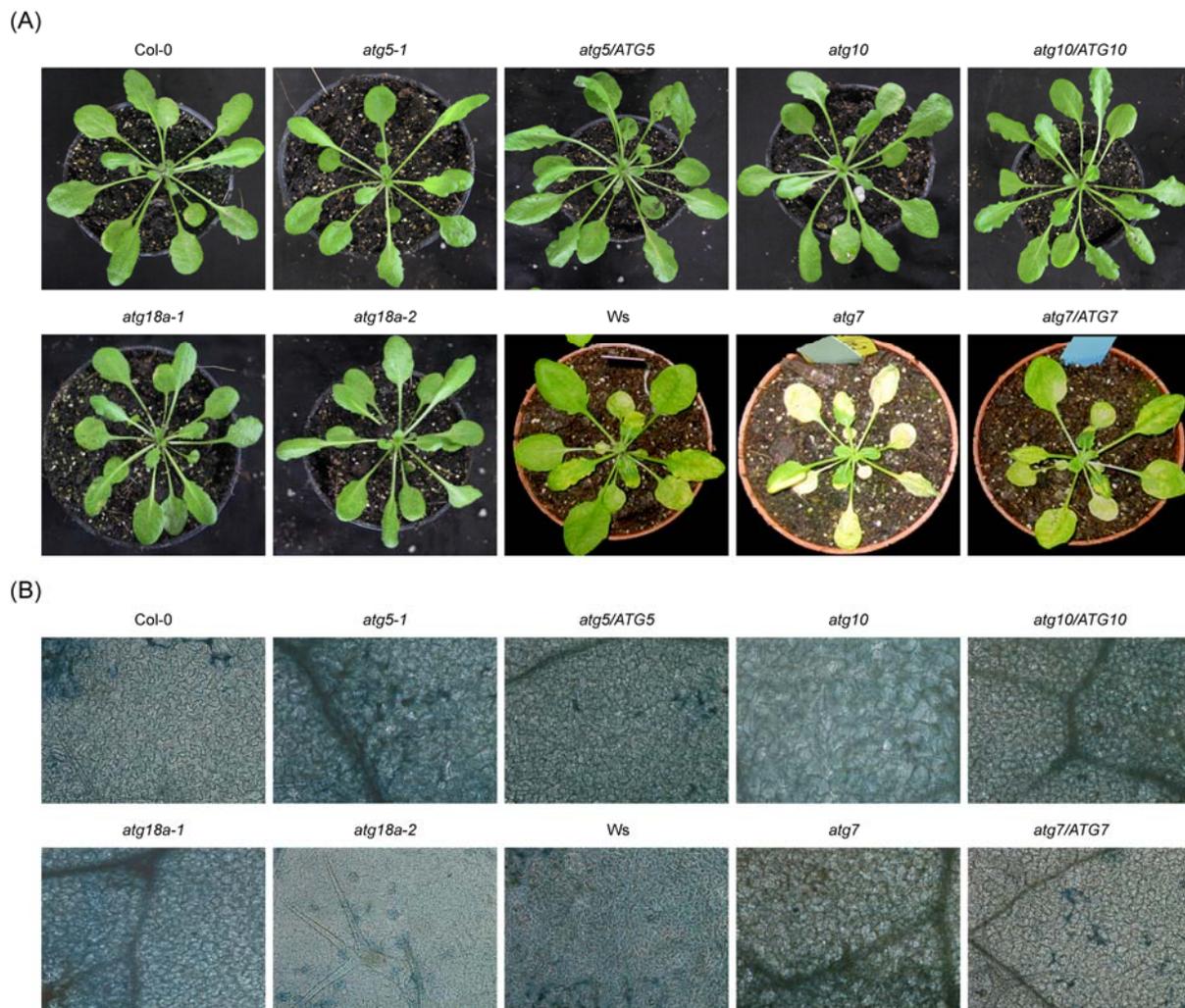
Der virulente Stamm *Pto* DC3000 (durchgezogene Linie) bzw. als Kontrolle 10 mM MgCl<sub>2</sub> (gestrichelte Linie) wurde in Blätter infiltriert und aus diesen nach 24 h Blattscheiben ausgestanzt und in Wasser inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen (1 - 6 bzw. 8 h), um die Leitfähigkeit als Zelltodindikator zu messen. Pro Messung wurden 8 Blattscheiben verwendet; pro Linie und Behandlung wurden Triplikate gemessen. Die Abbildung ist repräsentativ für je eines von insgesamt 3 (*atg7*, *atg18a*) bzw. 4 (*atg5-1*, *atg10*) unabhängig durchgeführten Experimenten.

Für keine der getesteten Linien konnten zu frühen Zeitpunkten (0 - 6 bzw. 8 h) signifikante Unterschiede festgestellt werden, wenngleich die Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* tendenziell, aber nicht signifikant, geringere Leitfähigkeiten aufwiesen, was sogar für weniger Zelltod sprechen würde. Die Ionenmessung zu späteren Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) erwies sich methodisch als schwierig, da die auftretenden Schwankungen innerhalb der gemessenen Triplikate erheblich zunahm (Daten nicht gezeigt).

### 3.8.2.3 Trypanblaufärbung als Zelltodindikator

Eine Methode zur Bestimmung des Zelltodes von infiziertem Blattmaterial zu späteren Zeitpunkten ist die Trypanblaufärbung (Kap. 2.9.9). Pflanzen der Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* wiesen 4 Tage nach Infektion sowohl makroskopisch (Abb. 3.31 (A)) als auch mikroskopisch (Abb. 3.31 (B)) nach Trypanblaufärbung keine erkennbaren Unterschiede zum Col-0 Wildtyp und den komplementierten Linien auf. In den gefärbten Blättern traten nur sehr wenige blau gefärbte Areale auf. Dies deutete auf eine sehr

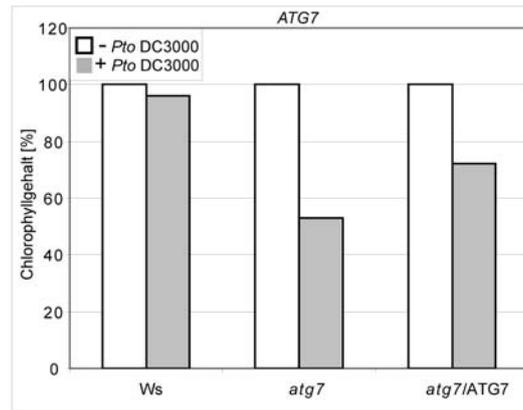
schwache Ausprägung von Zelltod hin. Das makroskopisch erkennbare chlorotische Krankheitsbild der *ATG7*-defizienten Pflanzen trat jedoch deutlich hervor.



**Abb. 3.31: Makroskopische und mikroskopische Analyse *Pto* DC3000-infizierter Pflanzen**

(A) 5 Wochen alte Pflanzen wurden mit *Pto* DC3000 in einer Bakteriensuspension der Dichte  $5 \times 10^8$  cfu/ml mit 0,02 % (v/v) Silwett L-77 besprüht und ein Bild nach 4 Tagen festgehalten. (B) Trypanblaufärbungen an abgeschnittenen und wie in (A) behandelten infizierten Blättern wurden ebenfalls durchgeführt und die Blattunterseite mikroskopiert.

Zur Quantifizierung dieses chlorotischen Phänotyps wurde das Chlorophyll aus den Blättern extrahiert und der Chlorophyllgehalt infizierter und nicht-infizierter Pflanzen der Linien *Ws*, *atg7* und *atg7/ATG7* nach der Formel von Moran (1982) bestimmt (Kap. 2.9.6.1). Wie in Abb. 3.32 deutlich zu sehen ist, kommt es vor allem in der Autophagie-defizienten *atg7*-Linie nach Infektion mit *Pto* DC3000 zu einer starken Chlorophyllabnahme.



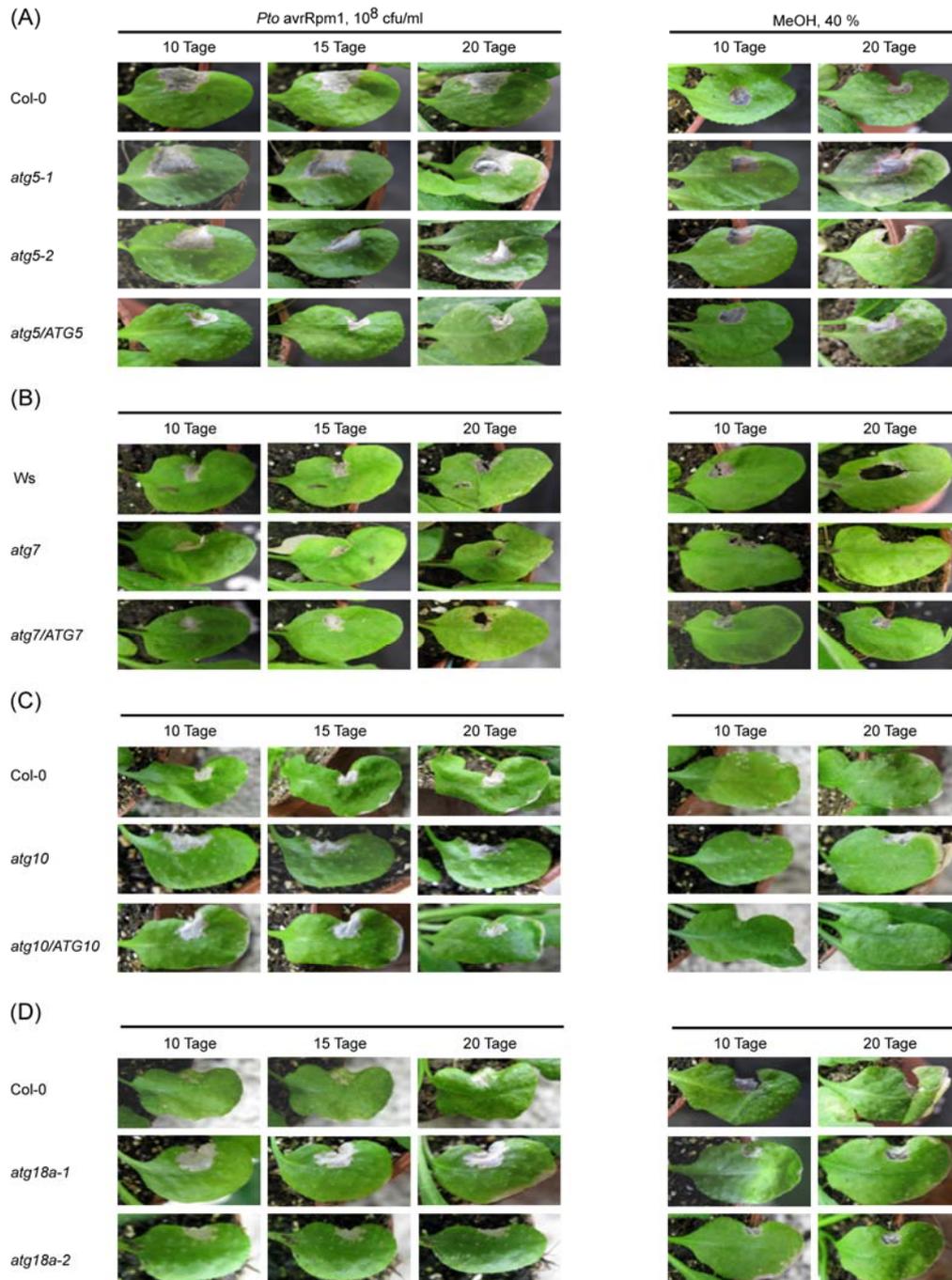
**Abb. 3.32: Chlorophyllverlust nach *Pto* DC3000-Infektion in *atg7*-KO Pflanzen**

Rosetten wurden abgeschnitten und das Frischgewicht nach 4 Tagen in den *Pto* DC3000 infizierten Blättern bestimmt. Anschließend wurde das Chlorophyll in Methanol extrahiert und spektrophotometrisch bei 664 nm und 647 nm nach folgender Formel bestimmt: Chlorophyll in  $\mu\text{g/ml} = 7,04 \times (A_{664}) + 20,27 \times (A_{647})$ . Die Chlorophyllmengen wurden auf die jeweiligen unbehandelten Linien normalisiert.

Da aber keine Unterschiede im bakteriellen Wachstum in der *atg7*-Mutante quantifiziert wurden, scheint der in *atg7* beobachtete Chlorosephänotyp keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum zu haben.

#### 3.8.2.4 Zelltodentwicklung nach *Pto* avrRpm1-Infektion

Da für *atg6*-defiziente Linien 15 Tage nach Infektion mit dem avirulenten Stamm *Pto* avrRpm1 eine Zelltodausbreitung gezeigt werden konnte, wurden ähnliche Experimente in den Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* durchgeführt, um mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten in deren Reaktion auf Befall durch avirulente Pathogene analysieren zu können. Wie in Abb. 3.33 deutlich zu erkennen ist, verhielten sich die hier untersuchten Linien gegensätzlich zu *atg6*-defizienten Linien, was auf eine besondere Funktion dieses bestimmten ATGs hinweisen könnte. In keiner der untersuchten Linien kam es zu einer Ausbreitung des Zelltodes über die Infiltrationsstelle hinaus. Als Kontrolle für eine Zelltodausprägung mit vorhandener Zelltodregulation nach unspezifischem Stress, wurden Methanolinfiltrationen in das Experiment mit eingeschlossen. Trotz Störung der Autophagie ist die Zelltodregulation und Immunantwort (Abb. 3.25) in den *atg*-Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* nach Infektion mit dem avirulenten Pathogen weiterhin funktionell.



**Abb. 3.33: Läsionsentwicklung nach Infektion mit dem avirulenten Stamm *Pto avrRpm1***

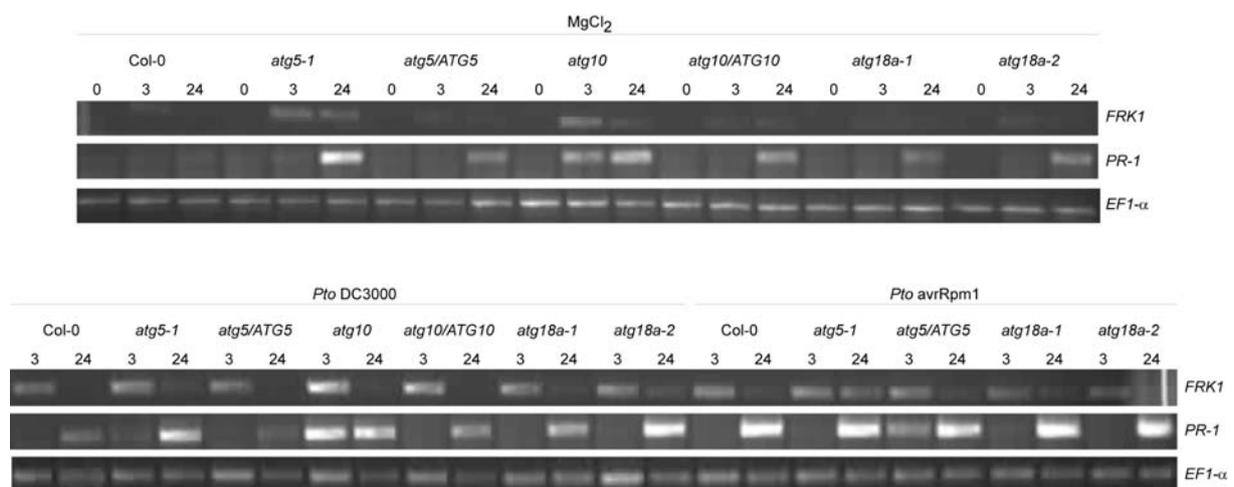
Blätter der Linien *atg5-1*, *atg5-2* (A), *atg7* (B), *atg10* (C), *atg18a-1* und *atg18a-2* (D) wurden an einer Blatthälfte lokal mit  $1 \times 10^8$  cfu/ml *Pto avrRpm1* infiltriert. Fotografische Aufnahmen wurden nach 10, 15 und 20 Tagen durchgeführt. Als Kontrolle wurde 40 % (v/v) Methanol infiltriert, welches einen nicht-induzierten Zelltod am Infiltrationsort auslöst. Läsionen wurden auf Ausbreitung untersucht, welche jedoch in keiner der verwendeten Linien stattfand, auch nicht nach einer Infektionsdauer von 20 Tagen.

### 3.9 Analyse von Immunitäts-assoziierten Abwehrreaktionen in *atg*-Mutanten

Da sich die erhöhte Resistenz der Mutanten *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *Pto* DC3000 nicht durch verstärkten Zelltod erklären ließ (Abb. 3.30 und Abb. 3.31), wurde nach weiteren Ursachen dieses Resistenzphänotyps gesucht. Eine weitere Erklärung wäre z.B. eine konstitutive Infektions/PAMP-induzierte Stimulierung verschiedener Immunitäts-assoziiierter Abwehrreaktionen in den *atg*-Mutanten. Einige dieser Abwehrreaktionen, wie die Expression Abwehr-assoziiierter Gene, die Schließung von Stomata, die Ablagerung von Kallose, die Aktivierung von MAPK, die Bildung von Ethylen oder die erhöhte Bildung weiterer Phytohormone, sowie des Phytoalexins Camalexin (Kap. 1.1), wurden im Folgenden näher analysiert.

#### 3.9.1 Markergenexpressionen nach Infektion mit *Pto* DC3000

*PR-1* („pathogenesis-related 1“) und *FRK1* („flagellin responsive kinase 1“) wurden als zu untersuchende Abwehrgene gewählt. Die Expression von *PR-1* wird von einer Vielzahl von Pathogenen in vielen Pflanzenspezies induziert (Maleck et al.; 2000, Schenk et al.; 2000, Glazebrook; 2001). *FRK1*, welches bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Infektion durch *Pto* DC3000 induziert wird, kodiert für eine LRR Rezeptorkinase (Asai et al.; 2002). Aus diesem Grund kann es auch als Markergen verwendet werden.

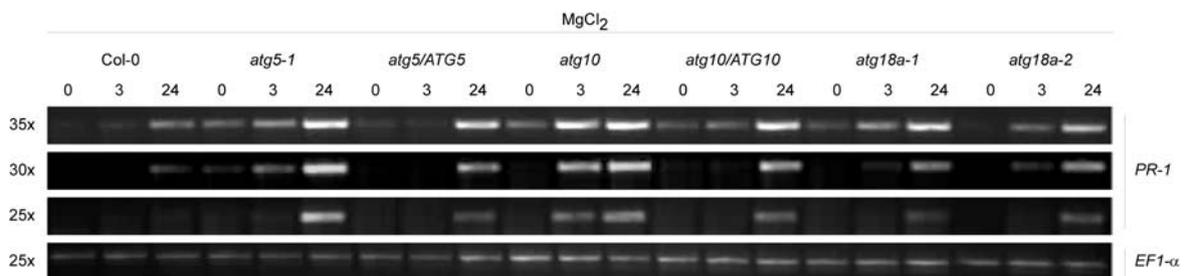


**Abb. 3.34: Expression der Markergene *PR-1* und *FRK1* nach Infektion mit *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1**

Jeweils 2 Blätter 4 Wochen alter Pflanzen der *atg*-Mutanten *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* mit entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien wurden pro Behandlung und Zeitpunkt mit *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1 in einer Dichte von  $1 \times 10^8$  cfu/ml bzw. als Kontrolle mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiziert, „gepoolt“, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Das Markergen *PR-1* wurde mit den Primern PR-1 F und PR-1 R, das Markergen *FRK1* mit den Primern Sirk5 und Sirk3 amplifiziert (Sequenzen in Tab. 7.1, 25 Zyklen). Als Kontroll-PCR gleich eingesetzter cDNA Mengen dienten die Primer eF1 $\alpha$ -s und eF1 $\alpha$ -as des konstitutiv exprimierten Referenzgens *EF1 $\alpha$* .

Abb. 3.34 zeigt die Expressionsmuster der Abwehrgene *PR-1* und *FRK1* nach *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1-Infektion. Erwartungsgemäß erfolgt die stärkste Expression von *PR-1* nach 24 h, während die *FRK1*-Expression bereits nach 3 h nachweisbar war (Abb. 3.35). Im Fall von *FRK1* konnten für die *atg*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp- und komplementierten Linien keine signifikant veränderten Expressionsmuster nach der Infektion festgestellt werden. Die Expression von *PR-1* dagegen ist in den *atg*-Mutanten *atg5-1* und *atg10* nach der Infektion leicht verstärkt.

Betrachtet man die Expression der  $MgCl_2$ -behandelten Blätter in den *atg*-Mutanten, so ließ sich im Gegensatz zu Col-0 bereits nach 24 h mit einer geringen PCR-Zyklus-Zahl eine Expression von *FRK1* und *PR-1* in der *atg5-1*-Mutante und *atg10*-Mutante (Abb. 3.34, Abb. 3.35) ohne Pathogenbehandlung nachweisen. Nach Verlängerung der PCR um weitere 10 Zyklen, wurde die Expression sogar zum Zeitpunkt 0 h besonders für *atg5-1* im Gegensatz zu Col-0 und der komplementierten Linie deutlich (Abb. 3.35).



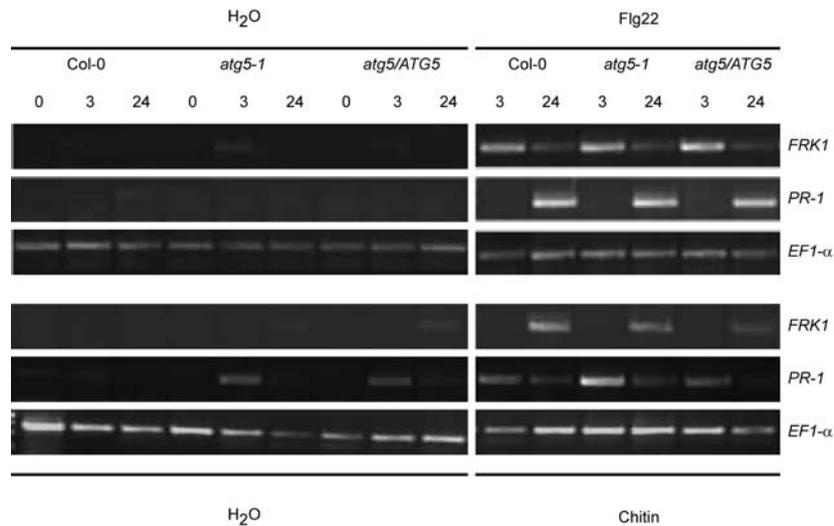
**Abb. 3.35: Expression des Markergens *PR-1* in  $MgCl_2$ -behandelten Blättern**

Jeweils 2 Blätter 5 Wochen alter KO-Pflanzen, sowie Wildtyp- und komplementierte Pflanzen wurden mit 10 mM  $MgCl_2$  infiltriert, „gepoolt“, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer PCR ermittelt. Das Markergen *PR-1* wurde mit den Primern PR-1 F und PR-1 R, das Markergen *FRK1* mit den Primern Sirk5 und Sirk3 amplifiziert (Sequenzen in Tab. 7.1). Als Kontroll-PCR gleich eingesetzter cDNA Mengen dienten die Primer  $eF1\alpha$ -s und  $eF1\alpha$ -as des konstitutiv exprimierten Referenzgens *EF1α*.

Möglicherweise haben derart geringe Veränderungen im Expressionsmuster bereits Auswirkungen auf die Immunität und liefern daher einen Erklärungsansatz für den Resistenzphänotyp der *atg*-Mutanten nach *Pto* DC3000-Infektion.

### 3.9.2 Markergenexpressionen nach PAMP-Behandlung

Die Markergenexpression von *PR-1* und *FRK1* wurden auch nach PAMP-Behandlung mit Chitin und Flg22 untersucht. Exemplarisch für die *atg5-1*-Linie gezeigt (Abb. 3.36), konnten jedoch keine deutlichen Unterschiede in den Expressionsmengen der beiden Markergene festgestellt werden.

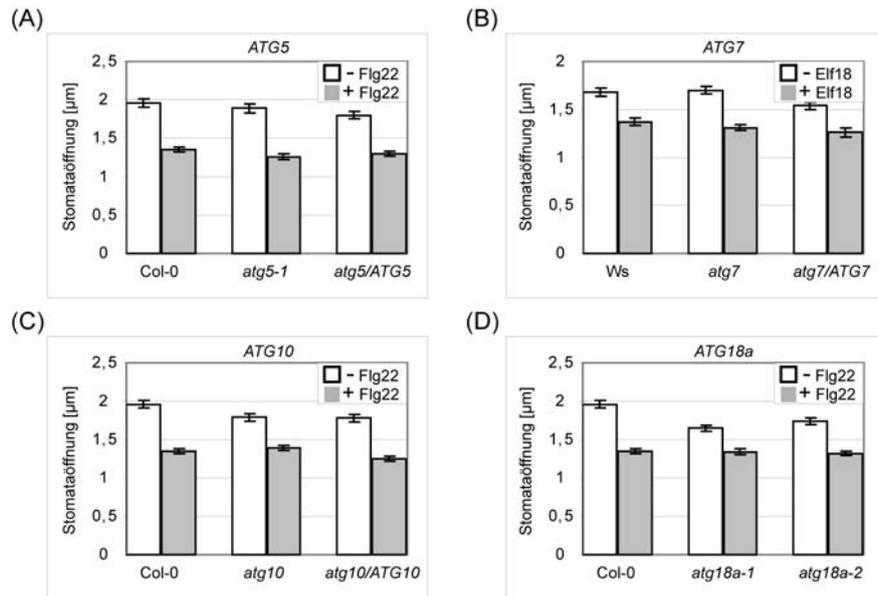


**Abb. 3.36: Expression der Markergene *FRK1* und *PR-1* nach PAMP-Behandlung**

Jeweils 2 Blätter der zu untersuchenden 5 Wochen alten Linien wurden pro Behandlung und Zeitpunkt mit den jeweiligen PAMPs Flg22 und Chitin bzw. H<sub>2</sub>O infiltriert, „gepolt“, die RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR bestimmt. Das Markergen *PR-1* wurde mit den Primern PR-1 F und PR-1 R amplifiziert, *FRK1* wurde mit den Primern Sirk5 und Sirk3 amplifiziert (Sequenzen in Tab. 7.1) Als Kontroll-PCR gleich eingesetzter cDNA Mengen dienten die Primer eF1α-s und eF1α-as des konstitutiv exprimierten Referenzgens *EF1α*.

### 3.9.3 Stomata-Assay

Abgeschnittene Blätter wurden für 2 h in MES-Puffer mit oder ohne 5 µM Flg22 inkubiert und anschließend mittels „Uhu hart“ ein reliefartiger Abdruck der Blattunterseite hergestellt, womit der „Ist“-Zustand der Blätter unmittelbar nach dem Abschneiden konserviert wurde. Die Erkennung des PAMPs Flg22 verursacht eine Schließung der Stomata (Melotto et al.; 2006). So lag der Öffnungszustand der Stomata unbehandelter Blätter der Linien Col-0, *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2*, sowie der komplementierten Linien bei 1,5- 2 µm, wogegen Flg22 behandelte Blätter einen Öffnungszustand von 1- 1,5 µm aufwiesen (Abb. 3.37).



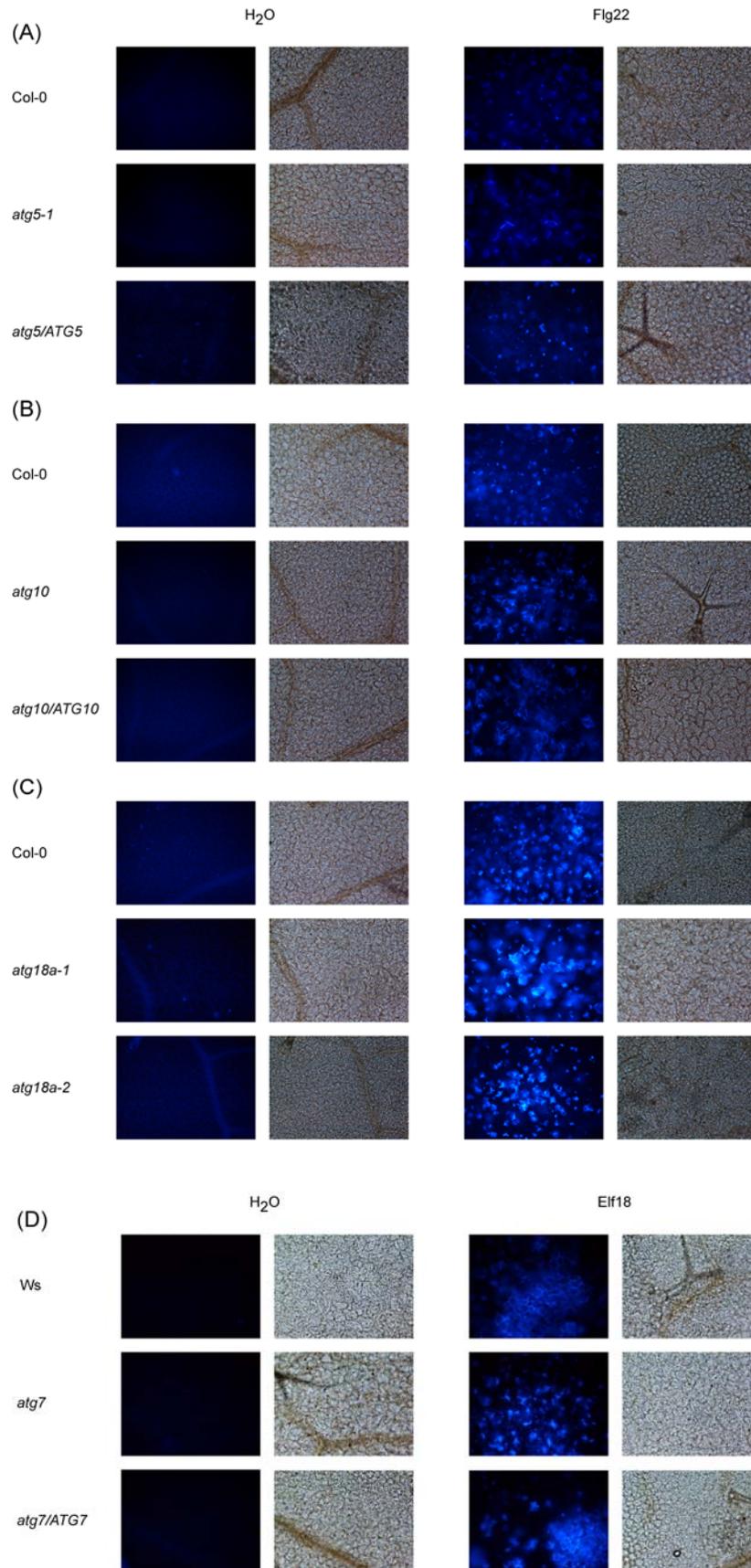
#### Abb. 3.37: Öffnungszustand der Stomata nach PAMP-Behandlung

Blätter 5 Wochen alter Pflanzen wurden 2 h in MES-Puffer (weiße Balken) oder in 5 µM Flg22 (für *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2*) bzw. 5 µM Eif18 (für *atg7*) in MES-Puffer (graue Balken) inkubiert und anschließend Blattabdrücke mit „Uhu hart“ hergestellt. Abdrücke wurden anschließend mikroskopiert (Nikon Digital Sight DS-U1) und die Öffnungszustände mit dem Programm Lucia Image (Nikon DS-U1 Version 5) gemessen. Dabei wurden pro Ansatz mindestens 100 Stomata aus 2 Blättern verschiedener Pflanzen ausgemessen. Als Fehlerbalken ist der gemittelte Standardfehler abgebildet. Jeder Versuch wurde unabhängig ein weiteres Mal mit ähnlichem Ergebnis wiederholt.

Da *atg7* durch seinen Ws-Hintergrund flagellin-insensitiv ist, wurde Eif18 als weiteres PAMP verwendet. Diese Behandlung führte ebenfalls zu einem Schließen der Stomata. Unbehandelte Blätter wiesen Stomata-Öffnungszustände von > 1,5 µm auf, wogegen Eif18 behandelte Blätter einen Öffnungszustand von ca. 1,25 µm zeigten (Abb. 3.37 (B)). Zusammengefasst lässt sich sagen, dass keine der Autophagie-defizienten Linien in der Stomataschließung konstitutiv oder induzierbar verändert ist. Die PAMP-induzierte Schließung wurde in gleichem Ausmaß wie für die entsprechenden Wildtyp- und komplementierten Linien erzielt.

#### 3.9.4 Kallose-Assay

Die Bildung und Ablagerung von Kallose als physische Barriere gegen unterschiedliche Arten von Pathogenen gilt als ein wirksamer Abwehrmechanismus der Pflanze (Hauck et al.; 2003). Kallose lässt sich über den Farbstoff Anilinblau anfärben, der sich in die helikale Struktur des Polysaccharids einlagert und unter UV-Licht durch Fluoreszenz detektierbar ist.



**Abb. 3.38: Bildung von Kallose nach PAMP-Behandlung**

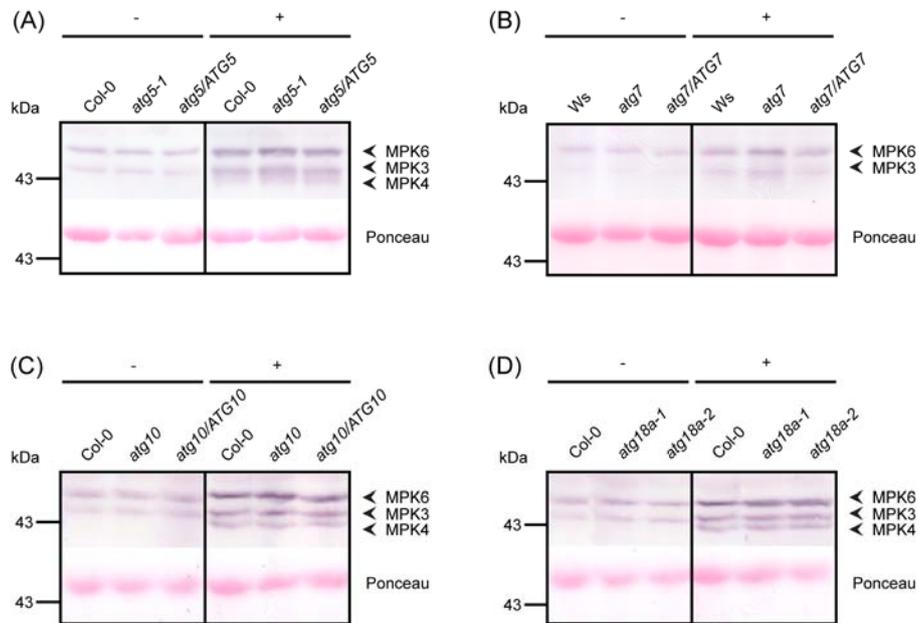
5 Wochen alte Blätter der Linien *atg5-1* (A), *atg10* (B), *atg18a-1*, *atg18a-2* (C) und *atg7* (D) mit entsprechenden Wildtypen und komplementierten Linien wurden mit 1  $\mu$ M Flg22 (A, B, C) bzw. Elf18 (D) infiltriert und nach 24 h geerntet, mit Anilinblau gefärbt, fixiert, entfärbt und anschließend unter UV-Licht mikroskopiert. Dargestellt sind Ausschnitte des Blattgewebes unter UV-Licht mit entsprechendem Durchlichtbild. Blau angefärbte Bereiche zeigen Kalloseablagerungen.

Die Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1*, *atg18a-2* und *atg7* wurden daraufhin auf Kallosebildung nach Behandlung mit 1  $\mu$ M Flg22 (*atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *-2*) bzw. 1  $\mu$ M Eif18 (*atg7*) am Mikroskop untersucht (Kap. 2.9.10).

Eine deutliche Kalloseablagerung, die an der blauen Fluoreszenz zu erkennen ist, ließ sich nach PAMP-Behandlung für alle Linien in nicht-unterscheidbarem Ausmaß beobachten. Es trat somit keine konstitutive oder nach PAMP-Behandlung zum Wildtyp verstärkte Kallosebildung in den *atg*-Mutanten auf.

### 3.9.5 MAP-Kinase-Assay

Nach PAMP-Behandlung mit Flg22 und der Erkennung über FLS2 kommt es nach Aktivierung einer MAPK-Kaskade zu einer Aktivierung der MPK3 und MPK6 (Asai et al.; 2002). Das PAMP Eif18 wird über den EFR Rezeptor erkannt (Zipfel et al.; 2006) und sorgt ebenfalls für MAPK-Aktivierungen. Die stressinduzierte MAPK transloziert in den Zellkern und phosphoryliert bestimmte Transkriptionsfaktoren. Dies führt wiederum zu einer verstärkten Transkription verschiedener Abwehrgene (Ahlfors et al.; 2004, Lee et al.; 2004, Feilner et al.; 2005). Mit dem ursprünglich gegen Tiere gerichteten Anti-Phospho-p44/42-MAPK-Antikörper, der nur an das phosphorylierte T<sub>P</sub>EY<sub>P</sub>-Motiv aktivierter MAPK bindet, wurden Western-Blots durchgeführt, um zu zeigen, ob in den Flg22 bzw. Eif18-behandelten *atg*-Linien die Induktion der MAPK-Kaskade beeinträchtigt bzw. verstärkt ist. Es konnte bereits festgestellt werden, dass der verwendete Antikörper im pflanzlichen System geeignet ist, und dass die MPK6 die größte (~ 45 kDa), MPK3 (~ 42,9 kDa) die mittelgroße und MPK4 (~ 42,7 kDa) die kleinste der drei detektierten MAPK-Banden ist (Saijo et al.; 2009). Nach PAMP-Behandlung der Linien *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1*, *atg18a-2* und *atg7* wurde nach 10 min Blattmaterial geerntet und eine Proteinextraktion mit anschließender Western-Blot-Analyse durchgeführt (Kap. 2.8.6). Der Einsatz gleicher Proteinmengen wurde mittels Ponceau-S-Rot-Färbung auf der Membran sichergestellt.



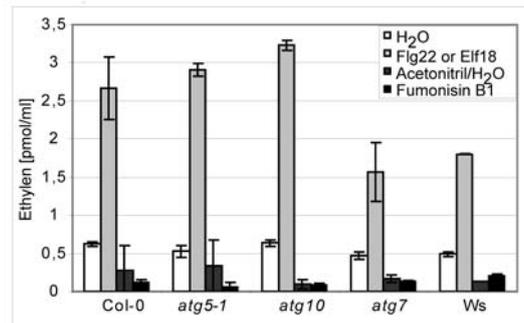
**Abb. 3.39: Aktivierung der MPK6, MPK3 und MPK4 nach PAMP-Behandlung**

Blätter 5 Wochen alter Pflanzen der *atg*- bzw. Wildtyp- und komplementierten Linien wurden infiltriert („-“ gekennzeichnete Proben sind als Kontrolle mit Wasser infiltriert worden, die mit „+“ gekennzeichneten Proben mit 1  $\mu$ M Flg22 (A), (C), (D) bzw. 1  $\mu$ M Elf18 (B)) und nach 10 min geerntet. Aus Blättern isolierte Proteinextrakte wurden auf eine SDS-PAGE aufgetragen und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran geblottet. Als Ladekontrolle diente die Ponceau-S-Rotfärbung. Die Membran wurde  $\ddot{u}$ N mit dem primären Antikörper Antiphospho-p44/p42-MAPK (1:3000) inkubiert und nach 1-stündiger Inkubation mit dem sekundären Antikörper, an den die Alkalische Phosphatase gekoppelt ist, die NBT/BCIP-Farbreaktion durchgeführt. Pfeilspitzen geben die Positionen von MPK3, MPK4 und MPK6 an. In allen Linien ist eine deutliche MAPK-Aktivierung nach PAMP-Behandlung zu detektieren.

Wie in den Western Blots aus Abb. 3.39 zu erkennen ist, werden die MAPKs nach 10-minütiger PAMP-Behandlung aktiviert. Für die im Col-0 Hintergrund befindlichen Linien wurde eine verstärkte Aktivierung aller drei MAPK festgestellt, wogegen für *atg7* im Ws-Hintergrund nur eine Aktivierung der MPK6 und MPK3 zu detektieren war. Im Vergleich aller getesteten Linien konnte jedoch keine verstärkte Aktivierung in den *atg*-Mutanten festgestellt werden. Die Resistenz der *atg*-Mutanten gegenüber *Pto* DC3000 ist also nicht durch eine veränderte MAPK-Aktivierung erklärbar.

### 3.9.6 Ethylenbestimmung

Die Produktion des Hormons Ethylen ist eine wichtige Reaktion der Pflanze auf Pathogenbefall und vermittelt die Ausprägung bestimmter Krankheitssymptome (Lund et al.; 1998). Die Menge des nach Toxinbehandlung (FB1) oder PAMP-Behandlung (Flg22/Elf18) gebildeten Hormons in *atg*-Mutanten und Wildtypen wurde von Eric Melzer (ZMBP, Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen) quantifiziert (Abb. 3.40).



**Abb. 3.40: Ethylenmessungen nach FB1- und PAMP-Behandlung**

Für Ethylenmessungen wurden 5 x 5 mm große Blattstückchen geschnitten und in Wasser üN vorinkubiert. Anschließend wurden 3 Blattstückchen von 3 verschiedenen Pflanzen pro Röhrchen in 500 µl Wasser mit oder ohne Behandlung für 3 h bei 170 U/min verschlossen geschüttelt (1 µM Flg22 für *atg5-1*, *atg10* und Col-0; 1 µM Elf18 für *atg7* und Ws und 10 µM Fumonisin B1 für alle Linien). Mit einer Spritze wurde 1 ml Luft in den Gaschromatographen eingespritzt und mit dem Chromatopac (Shimadzu C-R4AX) ausgewertet. Dieser Versuch wurde von Eric Melzer einmal durchgeführt.

Die Behandlung mit dem PAMP Flg22 bzw. Elf18 ergab eine ähnliche Induktion in der Ethylenbildung in allen Linien (Kap. 2.9.11), wogegen nach FB1 keine Ethylenproduktion festgestellt werden konnte. Die Resistenz der *atg*-Mutanten gegenüber *Pto* DC3000 ist also auch nicht durch eine veränderte Ethylenbildung im Vergleich zum Wildtyp erklärbar.

### 3.9.7 Hormon- und Camalexinmessungen

Salicylsäure (SA) spielt eine zentrale Rolle in pflanzlichen Resistenzmechanismen. Transgene Pflanzen, die die Salicylathydroxylase *nahG* exprimieren und somit die Akkumulation von SA verhindern, zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber vielerlei Pathogenen, wie beispielsweise *Pto* DC3000 (Delaney et al.; 1994). Veränderte Hormonmengen könnten somit Aufschluss geben, warum *atg*-Linien eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 aufweisen. Tatsächlich konnte kürzlich für unbehandelte *atg5*-Linien gezeigt werden, dass der Salicylatgehalt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen dreifach erhöht war (Yoshimoto et al.; 2009). Generell war die ermittelte SA Erhöhung jedoch sehr gering und lag bei nur 0,16 µg/g Frischgewicht im Vergleich zu 0,05 µg/g Frischgewicht des Wildtypes. Betrachtet man die Tab. 3.2 so trifft der beschriebene Anstieg der SA-Menge (Yoshimoto et al.; 2009) auch auf alle hier untersuchten *atg*-Linien zu. Die SA-Mengen unbehandelter *atg5*-Mutanten waren im Vergleich zu Col-0-Pflanzen um 38 % (Faktor 1,38), bei *atg10*-Mutanten sogar um 67% (Faktor 1,67) gesteigert.

<i>Pto</i> DC3000					<i>Pto</i> DC3000				
SA	MgCl <sub>2</sub>	Faktor	<i>Pto</i> DC3000	Faktor	JA	MgCl <sub>2</sub>	Faktor	<i>Pto</i> DC3000	Faktor
Col-0	119 ± 7	1	492 ± 42	1	Col-0	67 ± 9,	1	365,97 ± 74	1
<i>atg5-1</i>	164 ± 14	1,38	977 ± 98	1,99	<i>atg5-1</i>	102 ± 22	1,51	361,24 ± 60	0,98
<i>atg10</i>	199 ± 30	1,67	1269 ± 56	2,58	<i>atg10</i>	64 ± 10	0,95	576,80 ± 114	1,58

IAA	MgCl <sub>2</sub>	Faktor	<i>Pto</i> DC3000	Faktor	Cam	MgCl <sub>2</sub>	Faktor	<i>Pto</i> DC3000	Faktor
Col-0	14 ± 1,46	1	48,7 ± 6,12	1	Col-0	0,9 ± 0,4	1	48,6 ± 4,6	1
<i>atg5-1</i>	17,9 ± 2,51	1,28	18,6 ± 5,56	0,38	<i>atg5-1</i>	5,0 ± 1,9	5,55	85,3 ± 31	1,76
<i>atg10</i>	12,4 ± 1,49	0,89	57,7 ± 9,41	1,19	<i>atg10</i>	1,2 ± 0,4	1,33	82,1 ± 4,5	1,69

**Tab. 3.2: Hormon- und Camalexindaten nach Infektion mit *Pto* DC3000**

GC- und MS-Analysen zur Bestimmung der Salicylat- (SA), Jasmonsäure- (JA), Indoleessigsäure- (IAA) und Camalexin-(Cam) Werte wurden vom analytischen Labor (Karl Wurster, Universität Tübingen) durchgeführt. Pro Behandlung wurden pro Linie jeweils 6 Pflanzen mit  $1 \times 10^8$  cfu/ml *Pto* DC3000 infiziert oder zur Kontrolle mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> behandelt, nach 48 h geerntet und die erhaltenen Werte (in ng/g Frischgewicht (FG) für SA, JA und IAA bzw. in Fläche/g FG für Cam) auf das FG bezogen. Alle erhaltenen Werte wurden auf den Wildtyp bezogen (wt = 1) und Erhöhungen um den Faktor  $\geq 1,5$  grün markiert. Dieser Messdatensatz wurde in einem unabhängigen Experiment wiederholt.

Wurden die Pflanzen mit *Pto* DC3000 infiziert, so konnten in beiden Mutanten *atg5-1* und *atg10* im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen etwa doppelte Mengen SA gemessen werden (Tab. 3.2). Der Frage, ob diese geringen Unterschiede im SA-Gehalt der *atg*-Mutanten vor und nach der Infektion bereits eine erhöhte Resistenz verursachen, müsste nun näher nachgegangen werden.

Messungen der abwehrrelevanten Jasmonsäure ergaben sowohl vor, als auch nach der Infektion, keine eindeutigen Unterschiede zwischen den drei analysierten Linien. Auch die Messung des Auxins Indoleessigsäure (IAA), welches eher in Entwicklungsvorgängen, wie dem Wurzelwachstum involviert ist (Fukaki et al.; 2007), ließ keine eindeutigen Unterscheidung hinsichtlich der gebildeten Menge vor und nach der Infektion zu. Die Messung des abwehrrelevanten Phytoalexins Camalexin (Tsuji et al.; 1992, Glazebrook und Ausubel; 1994) in unbehandelter Pflanzen ergab sehr geringe Werte und ließ somit keine Unterscheidung zu. Jedoch wurden für *atg5-1*- und *atg10*-Mutanten nach Infektion erhöhte Mengen Camalexin gemessen (76 % bzw. 69 % mehr als in Col-0).

Inkubiert man die Pflanzen mit FB1 (Tab. 3.3), so kann man in allen Linien einen starken Anstieg der SA (4,8 - 6,5 µg/g FG) messen. So wurden Steigerungen um den Faktor 20 - 30 zum Ursprungswert gemessen, die jedoch keine Unterschiede zwischen *atg*-Linien und entsprechenden Wildtyp-Linien zeigten. Betrachtet man die Grundmengen gebildeter SA in den Acetonitril/Wasser infiltrierten Kontrollpflanzen, so konnten im Einklang mit MgCl<sub>2</sub>-behandelten Pflanzen (Tab. 3.2), erneut für die *atg*-Linien erhöhte SA-Mengen festgestellt werden (Tab. 3.3). Nach FB1-Behandlung zeigten die Linien *atg5-1*, *atg10* und *atg7* im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Linien eine erhöhte Bildung von JA. Camalexin wurde nach Toxinbehandlung ebenfalls vermehrt in den *atg*-Mutanten gebildet, während für IAA keinerlei Unterschiede zwischen den Linien gefunden wurden.

Fumonisin B1				
SA	Ac/H <sub>2</sub> O	Faktor	FB1	Faktor
Col-0	171 ± 19	1	6299 ± 909	1
<i>atg5-1</i>	273 ± 54	1,60	6245 ± 878	0,99
<i>atg10</i>	199 ± 26	1,16	6519 ± 751	1,03
Ws	115 ± 5	1	4938 ± 359	1
<i>atg7</i>	190 ± 24	1,65	4763 ± 389	0,96

JA	Ac/H <sub>2</sub> O	Faktor	FB1	Faktor
Col-0	200	1	263 ± 13	1
<i>atg5-1</i>	204 ± 4	1,02	952 ± 129	3,62
<i>atg10</i>	200	1	555 ± 65	2,11
Ws	13	1	54 ± 7	1
<i>atg7</i>	13	1	184 ± 49	3,41

IAA	Ac/H <sub>2</sub> O	Faktor	FB1	Faktor
Col-0	123 ± 9	1	163 ± 15	1
<i>atg5-1</i>	81 ± 6	0,66	165 ± 7	1,01
<i>atg10</i>	102 ± 3	0,83	204 ± 13	1,25
Ws	338 ± 46	1	311 ± 20	1
<i>atg7</i>	335 ± 30	0,99	263 ± 31	0,85

Cam	Ac/H <sub>2</sub> O	Faktor	FB1	Faktor
Col-0	114 ± 54	1	860 ± 58	1
<i>atg5-1</i>	162 ± 28	1,42	2145 ± 272	2,49
<i>atg10</i>	104 ± 24	0,91	1908 ± 166	2,22
Ws	0	X	255 ± 161	1
<i>atg7</i>	0	X	614 ± 196	2,41

**Tab. 3.3: Hormon- und Camalexindaten nach Behandlung mit dem Toxin Fumonisin B1**

GC- und MS-Analysen zur Bestimmung der Salicylat- (SA), Jasmonsäure- (JA), Indoleessigsäure- (IAA) und Camalexin- (Cam) Werte wurden vom analytischen Labor (Karl Wurster, Universität Tübingen) durchgeführt. Pro Behandlung wurden pro Linie jeweils 6 Pflanzen mit 10 µM Fumonisin B1 oder zur Kontrolle mit 7 % Acetonitril in Wasser injiziert, nach 72 h geerntet und die erhaltenen Werte (in ng/g Frischgewicht (FG) für SA, JA und IAA bzw. in Fläche/g FG für Cam) auf das Frischgewicht (FG) bezogen. Alle erhaltenen Werte wurden auf den Wildtyp bezogen (wt = 1) und Erhöhungen um den Faktor ≥ 1,5 grün markiert.

Die erhöhten SA-Mengen, die in insgesamt drei unabhängigen Ansätzen in den unbehandelten *atg*-Mutanten gefunden wurden (Tab. 3.2; Tab. 3.3), einhergehend mit der erhöhten Expression von *PR-1* liefern Indizien für die Erklärung des erhöhten Resistenzphänotyps gegenüber *Pto* DC3000. Auch nach Behandlung mit *Pto* DC3000 ließ sich eine Erhöhung des SA-Gehaltes in *atg5-1* und *atg10* feststellen. Schlussfolgern lässt sich daraus, dass die Autophagie eine Kontrollfunktion auf den SA-Spiegel ausübt.

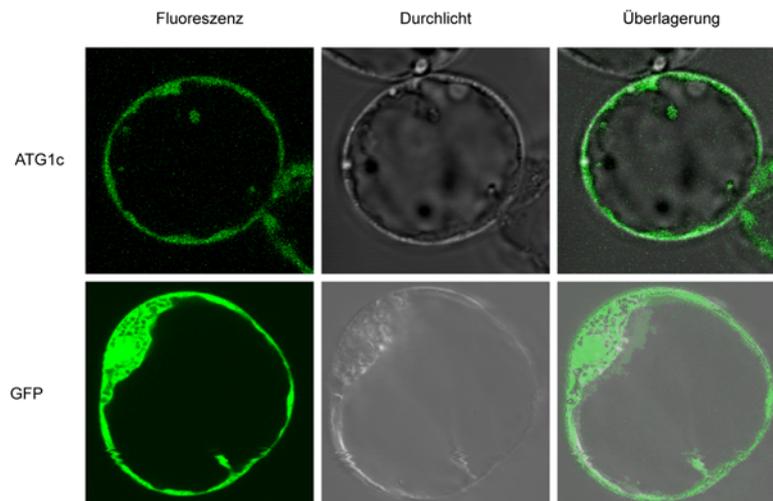
Es lässt sich auch festhalten, dass wie durch zwei unabhängige Behandlungsweisen (bakterielle Infektion und Toxinbehandlung) gezeigt, Hormonwege durch Autophagiedefekte in ihrem Wirken nicht schwerwiegend beeinträchtigt werden und sogar zum Teil stärker aktiviert wurden.

### 3.10 Charakterisierung von *ATG1c*

Da die hier charakterisierten Autophagiegene *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a* in spätere Autophagieabläufe involviert sind (Kap. 1.5), wurde zusätzlich *ATG1c* (At3g53930) als Vertreter früher Autophagieabläufe untersucht. Es wird angenommen, dass der Phosphorylierungsstatus von *ATG1* über Induktion oder Inhibition des autophagischen Prozesses entscheidet (Kap. 1.5). Die Zielproteine der *ATG1*-Kinase sind jedoch noch nicht gefunden. Deletionen des *ATG1*-Gens in *Saccharomyces cerevisiae* resultierten in einer Autophagieblockierung (Matsuura et al.; 1997), während bei *C. elegans*, *D. melanogaster* oder *D. discoideum* zusätzlich weitere Entwicklungsprobleme auftreten, was auf andere oder weitere Rollen der *ATG1*-Kinase hinweisen könnte (Nair und Klionsky; 2005). Wie für *ATG7* und *ATG18a* konnte eine Transkriptakkumulation nach Behandlung mit *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1 in Mikroarrayanalysen nachgewiesen werden (Tab. 3.1).

### 3.10.1 Lokalisation von ATG1c

Zur Lokalisation im Protoplastensystem wurde ATG1c mit Hilfe des Vektors pK7FWG2.0 als GFP-Fusionsprotein überexprimiert. Wie in Abb. 3.41 zu erkennen ist, wird ATG1c gemäß den Voraussagen des „Bio-Array resource for plant functional genomics“-Programms (BAR; Cell eFP Browser) im Zytosol exprimiert.



**Abb. 3.41: Lokalisation von ATG1c-GFP im Protoplasten**

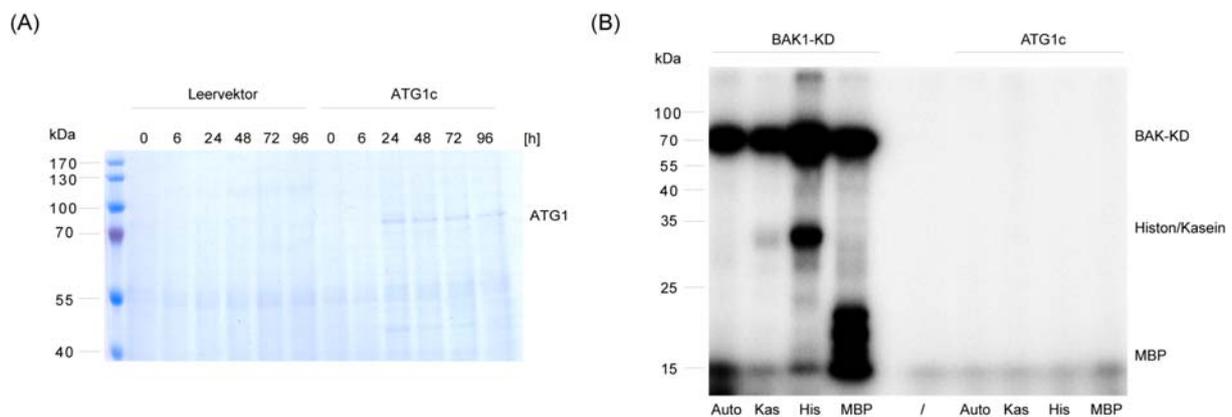
Protoplasten aus *A. thaliana* wurden mit dem Konstrukt *ATG1c*-pK7FWG2.0 bzw. mit einer GFP-exprimierenden Kontrolle transient transformiert und 24 h später mikroskopiert. Die Anregung der Fluoreszenz erfolgte mit einem Argon/Krypton Laser bei 488 nm, die Emission des Lichts konnte zwischen 500 – 600 nm gemessen werden. Dargestellt sind von links nach rechts das Fluoreszenzbild, das Durchlichtbild und die Überlagerung beider Bilder.

### 3.10.2 Überexpressionsversuche und *in vitro* Kinase Assay

Die Kinaseaktivität von *Saccharomyces cerevisiae* ATG1 wurde bereits *in vitro* nachgewiesen (Kamada et al.; 2000). Ebenso gelang der Nachweis einer Autophosphorylierung *in vitro* und *in vivo* (Matsuura et al.; 1997, Abeliovich et al.; 2003). Da *ATG1c* aus *Arabidopsis* ebenfalls eine Kinasedomäne enthält, sollte deren Funktionalität in einem Kinaseassay *in vitro* überprüft werden.

Die Überexpression in *E. coli* scheiterte (Daten nicht gezeigt), da das Protein bzw. dessen Abbauprodukt nach Bakterienaufschluss lediglich unlöslich im Pellet zu finden war. Daher wurde das *P. pastoris*-Expressionssystem (Kap. 2.8.1) verwendet. *ATG1c* wurde in den Sekretionsvektor pPICZ $\alpha$ A (Kap. 2.4; Tab. 2.5) kloniert, um eine Abnahme des Proteins aus dem Überstand zu ermöglichen, und anschließend exprimiert (Kap. 2.8.1). Die erwartete Fragmentgröße lag bei 90 kDa. Proben wurden nach 0, 6, 24, 48, 72 und 96 h gesammelt und, wie in Abb. 3.42 dargestellt, auf einem mit Coomassie-Brilliantblau gefärbtem Gel auf Vorhandensein einer zusätzlichen Bande bei etwa 90 kDa untersucht. Als Kontrolle wurde der Leervektor verwendet. Abb. 3.42 (A) zeigt nach einer Expressionszeit von 24 h eine Bande in erwarteter Höhe, dessen Menge allerdings nicht durch längere Expressionszeiten gesteigert werden konnte. Western-Blot-Analysen gegen den über dem Vektor angefügten

His- bzw. myc-Tag wurden mit entsprechenden Antikörpern durchgeführt und ergaben ein Signal mit erwarteter Größe, welches aber nur sehr schwach war (Daten nicht gezeigt). Trotzdem wurde der *Pichia* Überstand für einen Kinase-Aktivitätstest mit diesem Klon versucht. Als Kontrollprotein stand die Kinasedomäne von BAK1 (erhalten von Anne Schwedt, ZMBP; Pflanzenbiochemie) zur Verfügung, womit eine Autophosphorylierung, sowie die Phosphorylierung der artifiziellen Substrate Kasein, Histon und des „myelin basic protein“ (MBP) nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich zu BAK1 konnte für ATG1c, unter den gewählten Bedingungen, keine Kinase-Aktivität gezeigt werden (Abb. 3.42 (B)). Die Negativkontrolle GST zeigte ebenfalls keine Phosphatanlagerung. Weitere Expressionsstudien und Kontrollen müssten nun durchgeführt werden, um optimale Expressionsbedingungen herauszufinden und um eine eindeutige Aussage zu treffen, ob ATG1c eine aktive Kinase ist.



**Abb. 3.42: ATG1 Überexpression in *P. pastoris* und *in vitro* Kinaseaktivitätstest**

(A) *Pichia pastoris* wurde mit dem Konstrukt *ATG1c*-pPICZ $\alpha$ A transformiert und kultiviert. Die Induktion wurde mit MeOH herbeigeführt und nach 0, 6, 24, 48, 72 und 96 h Proben aus dem Überstand gesammelt, die für die SDS-PAGE verwendet wurden. Das Gel wurde mit Coomassie-Brilliantblau gefärbt und das Bandenmuster der Proben des Leervektors pPICZ $\alpha$ A (als Kontrolle) mit *ATG1*-pPICZ $\alpha$ A verglichen. Eine Bande zwischen der Markerbande 70 und 100 kDa konnte lediglich in den Proben des *ATG1*-pPICZ $\alpha$ A transformierten Stammes angefärbt werden. (B) *ATG1c*-Überstand wurde verwendet, um einen Kinaseaktivitätstest durchzuführen. Die Bestimmung der Kinaseaktivität erfolgte nach Zugabe der Substrate Kasein (25 – 19 kDa), Histon (21,5 – 11,3 kDa) bzw. MBP (18,4 kDa). Die Bande für *ATG1* ist bei 90 kDa zu erwarten. Als Positivkontrolle diente die GST-Kinasedomänefusion von BAK1 (BAK1-KD: 70,5 kDa), als Negativkontrolle das nichtfusionierte GST ( $\lambda$ : 28,5 kDa).

### 3.10.3 Herstellung einer RNAi-Linie und einer amiRNA-Linie

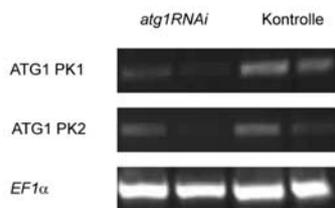
Die zunächst ausgewählten Linien N614104 und N630294 des Genes *ATG1c* (*At3g53930*) wiesen Transkript auf (Daten nicht gezeigt) und waren somit keine echten KO-Linien. In verschiedenen durchgeführten Versuchen, wie z.B. bakteriellen Wachstumskurven, Wurzellängen- und Trockenstress-Experimenten, zeigten sie außerdem keine phänotypischen Unterschiede zu Col-0 (Daten nicht gezeigt). Ferner konnten in der Linie N614104 sieben und in der Linie N630294 vier T-DNA-Insertionen durch Southern Blot Analysen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden RNAi-Linien und amiRNA-Linien hergestellt. Die Exon-Intron-Struktur von *ATG1c* ist in Abb. 3.43 (A) dargestellt und die genomische bzw. kodierende Fragmentlänge angegeben. Die für

*ATG1c*-spezifische Sequenz, die zur Generierung der RNAi-Linie amplifiziert wurde, umfasst eine Länge von 225 bp und ist in Exon 9 lokalisiert. Dieses Fragment wurde in den Gateway-Vektor pB7GWIWG2 kloniert (Kap. 2.4; Tab. 2.5). Die Herstellung der amiRNA-Linie erfolgte unter Verwendung des Web microRNA Designer (WMD; <http://wmd.weigelworld.org>), wobei eine artifizielle 21mer microRNA hergestellt wurde, die über gezielte Mutagenese in den Vektor miR319a pBSK (pRS300) eingeschleust wurde (Kap. 2.7.4.2) und gegen die ganze *ATG1*-Familie gerichtet sein sollte. Mittels *A. tumefaciens* vermittelter Transformation (Kap. 2.6.6) wurden für beide Konstrukte transgene *Arabidopsis* Pflanzen erzeugt.

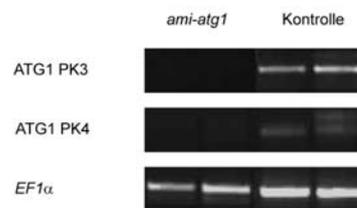
(A)



(B)



(C)



**Abb. 3.43: Genstruktur und Transkriptanalyse der RNAi-Linie und ami-RNA-Linie**

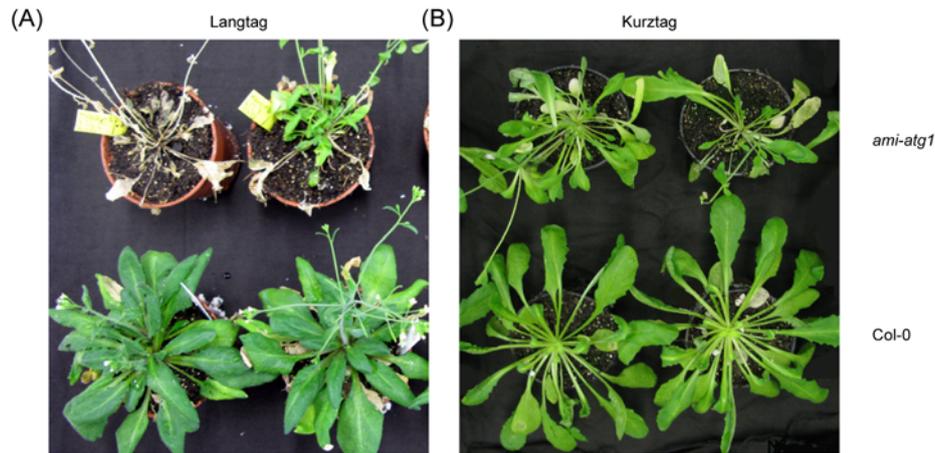
Die RNA aus Blattmaterial 4 - 5 Wochen alter Pflanzen wurde isoliert und in cDNA transkribiert. Die Transkriptmengen wurden mittels semiquantitativer RT-PCR quantifiziert. *atg1-RNAi*-Linien wurden mit 2 verschiedenen Primerkombinationen (PK) überprüft, einerseits mit den den Primern *atg1c-atg2F* und *at3g53930R2* (PK1), andererseits wurden die Primer *at3g53930F3* und *at3g53930R3* (PK3) verwendet, um das Vorhandensein von Transkript zu überprüfen. Transkriptanalysen für *ami-atg1* wurden mit den Primern *at3g53930F1* und *at3g53930R2* (PK3) bzw. *at3g53930F4* und *at3g53930R4* (PK4) durchgeführt (Primersequenzen in Tab. 7.1). Als Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte Gen *EF1α* verwendet.

Wie in den Abb. 3.43 (B) und (C) gezeigt, wiesen beide Linien reduzierte Transkriptmengen für *ATG1c* (*At3g53930*) auf. Es lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass es sich hierbei um Transkript von den Genen *ATG1a* bzw. *ATG1b* handelt. Da die amiRNAi-Linie deutlich weniger vorhandenes Transkript aufwies, wurde diese für weitere Versuche verwendet.

### 3.10.4 Phänotypische Analysen an *amiRNA-atg1* Pflanzen

#### 3.10.4.1 Beobachtungen zur Seneszenz

Wie bereits für die anderen *atg*-Linien beschrieben (Abb. 3.6), konnte auch für die *amiRNA-atg1*-Linie verfrühte Seneszenz sowohl unter Langtag- als auch Kurztagbedingungen festgestellt werden (Abb. 3.44). Dieser Phänotyp deutet auf ein erfolgreiches Ausschalten der *ATG1*-Gene durch das amiRNA-Konstrukt hin. Auch verzögertes Blattwachstum konnte für die *amiRNA-atg1*-Linie beobachtet werden (Abb. 3.44).

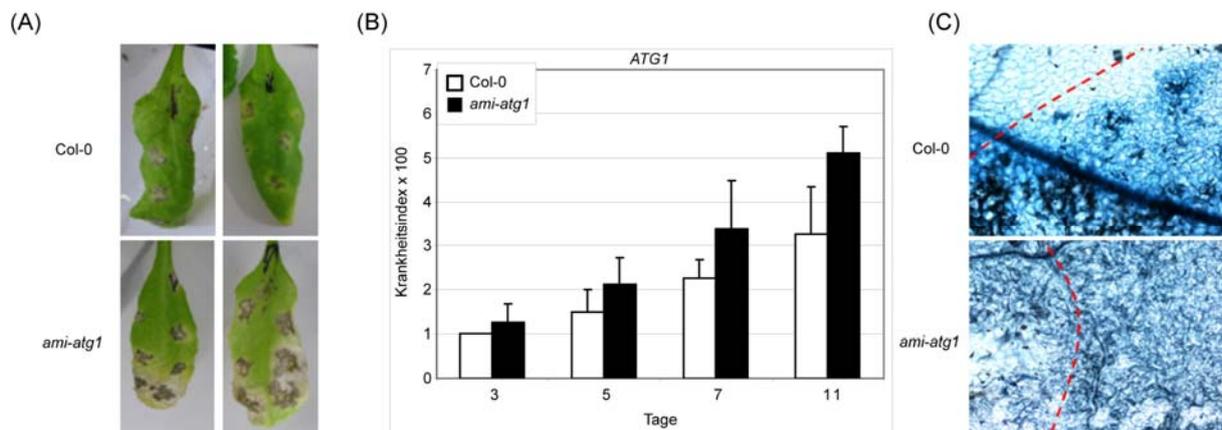


**Abb. 3.44: Verfrühte Seneszenz der *ami-atg1*-Linie unter Lang- und Kurztagbedingungen**

Je 2 Pflanzen der Linie *ami-atg1* und Col-0 wurden unter Langtag- (A) bzw. Kurztagbedingungen (B) kultiviert und nach 10 bzw. 7 Wochen fotografiert. Eine geringere Blattgröße und eine verfrühte Seneszenz konnte in der *ami-atg1*-Linie im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden.

### 3.10.4.2 Infektion mit *Alternaria brassicicola*

Infektionsversuche wurden mit *A. brassicicola* durchgeführt und ähnliche Ergebnisse wie für *atg5*, *atg7*, *atg10* und *atg18a* erhalten. So konnte ebenfalls eine signifikant erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem pilzlichen Pathogen gezeigt werden (Abb. 3.45). Dies wurde nach 11 Tagen in Form von deutlichen Chlorosen ebenso makroskopisch sichtbar. Die Anzahl Trypan angefärbter Zellen, auch über den Applikationsort hinaus, deutete ebenfalls, wie bereits für *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* bekannt, auf einen fehlregulierten Zelltod (Abb. 3.45) hin, der im Col-0 Wildtyp nicht in diesem Ausmaß auftrat.



**Abb. 3.45: Infektion mit *Alternaria brassicicola***

Sporensuspensionen von  $1 \times 10^6$  Sporen/ml wurden hergestellt und jeweils 6 Tropfen/Blatt für Aufnahmen (A), und Kategorisierungen (B) verwendet. Trypanblaufärbungen (C) wurden nach 7 Tagen durchgeführt und mikroskopisch ausgewertet. Dieser Versuch wurde mit ähnlichen Ergebnissen ein weiteres Mal wiederholt.

Schlußfolgernd lässt sich also auch für dieses weitere *ATG* feststellen, dass Befall mit dem nekrotrophen Pilz *A. brassicicola* in fehlreguliertem Zelltod endet, und der Autophagie hierbei eine bedeutende Rolle zukommt.



## 4 Diskussion

Galt die Autophagie in früheren Jahren lediglich als unspezifischer Aufräummechanismus der Zelle zur Wahrung der Homöostase und Überbrückung widriger Umstände wie Nahrungsmangel, so wurde in den letzten Jahren diese Annahme vielfach revidiert, da zahlreiche weitere wichtige und auch selektive Funktionen dieses Abbauprozesses entschlüsselt wurden. Viele unabhängige Entdeckungen, vor allem im tierischen Feld, gaben Hinweise darauf, dass die in Hefe, Mensch und Pflanze konservierte Autophagie auch für eine breite Palette physiologischer Programme bedeutsam ist (Levine; 2005, Delgado et al.; 2009, Deretic; 2009).

Zusätzlich zu dem Wirkungsgebiet der Autophagie in Entwicklungsprozessen wurde dieser Abbaumechanismus in Pflanzen auch mit der Begrenzung der HR nach Pathogenbefall in Verbindung gebracht, zu der *atg6*-Mutanten im Vergleich zu Wildtyp-Linien nicht mehr befähigt waren (Liu et al.; 2005, Patel und Dinesh-Kumar; 2008). Die Autophagie sichert somit nach erzieltm „Schrotschusseffekt“ (Lam; 2004) das Überleben des Blattes oder sogar des gesamten Organismus. Doch das autophagische Wirkungsgebiet ist nicht nur auf zellschützende Funktionen beschränkt, sondern wird auch mit Zelltodmechanismen in Verbindung gebracht. So wurde beispielsweise nach Infektion mit avirulenten Bakterien weniger Zelltod in den Mutanten *atg7* und *atg9* verursacht (Hofius et al.; 2009). Ähnliche, die duale Zelltodfunktion der Autophagie untermauernde Ergebnisse wurden zuvor auch im tierischen Feld durch den Nachweis der Zelltodblockierung in apoptose-beeinträchtigten *atg7/Beclin1* und *atg5/Beclin1*-RNAi-Linien festgestellt (Shimizu et al.; 2004, Yu et al.; 2004). Beteiligungen der pflanzlichen Autophagie an Zelltodprogrammen und ihre Konsequenz auf Immunantworten sind bis jetzt jedoch nur ansatzweise aufgeklärt.

In dieser Arbeit gelang es, unterschiedliche Rollen der Autophagie an der pflanzlichen Basalresistenz gegenüber nekrotrophen und hemibiotrophen virulenten Erregern zu zeigen. Ferner konnte eine negative, autophagische Regulation SA-abhängiger Abwehrprozesse gegenüber hemibiotrophen Pathogenen postuliert werden.

## 4.1 Entwicklungsphänotypische Analysen

Im Vergleich zu Schleimpilzen, Nematoden, Fruchtfliegen und Säugetieren (Juhasz et al.; 2003, Melendez et al.; 2003, Otto et al.; 2003, Kuma et al.; 2004), bei denen Autophagie-Defekte häufig letal sind, zeigen Autophagie-defiziente Pflanzen unter nährstoffreichen Bedingungen nur einen schwach ausgeprägten Phänotyp und sind überlebensfähig. Es findet ein normaler Verlauf der Entwicklungsstadien von Embryogenese, Keimung, Keimblattentwicklung, Spross- und Wurzelwachstum, bis über Blütenbildung und Samenproduktion statt (Bassham et al.; 2006). Vorteilhaft für das Überleben der Pflanzen könnte sein, dass sie durch ihre sessile Lebensweise zwangsläufig ihrer Umwelt von Beginn an ausgesetzt sind und ihre Nährstoffe aus Luft und Erde gewinnen können. Die Autophagie ist deshalb nur in bestimmten Situationen als Nährstofflieferant und Energiequelle in Pflanzen überlebenswichtig, wenn z.B. die im Boden befindlichen Stickstoffmengen unzureichend sind oder die Pflanze beispielsweise durch Beschattung in ihrer Photosyntheseeffizienz und somit Kohlenstoffversorgung eingeschränkt wird (Chen et al.; 1994, Aubert et al.; 1996, Moriyasu und Ohsumi; 1996, Doelling et al.; 2002, Hanaoka et al.; 2002, Contento et al.; 2004).

Weitere Erklärungen für die unterschiedliche Empfindsamkeit zwischen Autophagie-defizienten Tieren und Pflanzen könnten sein, dass die Autophagie im pflanzlichen Organismus weniger vielfältige Entwicklungsfunktionen übernimmt, oder aber Autophagie-unabhängige Wege aktiviert werden können, die das Überleben in kritischen Phasen sichern. Da Autophagie-defiziente Pflanzen, wie *atg3*, *atg4*, *atg5*, *atg7*, *atg9*, *atg10* und *atg18a* einen verfrühten Seneszenzphänotyp aufweisen und weniger Blütenstände bilden (Thompson und Vierstra; 2005, Bassham et al.; 2006), kommt der Autophagie zwar keine überlebenswichtige, aber dennoch eine Beteiligung in Entwicklungsprozessen zu (Hanaoka et al.; 2002). Dies konnte für alle hier verwendeten *atg*-Mutanten durch Seneszenzuntersuchungen bestätigt werden (Abb. 3.5 – 3.6). Da der Seneszenzphänotyp in allen Mutanten unter unseren Anzuchtbedingungen auftrat, war es besonders wichtig, das Alter der Pflanzen für Infektionsstudien (Kap. 4.2) zu berücksichtigen und nur Pflanzen in einem Alter von 4 - 6 Wochen zu verwenden, damit ein Einfluss des Seneszenzprozesses auf Phänotypen nach Pathogenbefall ausgeschlossen werden kann.

Eine weitere Beobachtung war, dass der Zeitpunkt der Blütenstandausbildung in den Mutanten *atg5-1* und *atg7* im Vergleich zum Wildtyp verspätet auftrat (Abb. 3.7).

Normalerweise wird die Seneszenz altersbedingt ausgelöst. Sie kann aber auch verfrüht durch externe Faktoren, wie Phytohormonzugabe, Dunkelheit, Temperatur und Pathogenbefall induziert werden (Smart; 1994, Bleecker und Patterson; 1997). Die genaue autophagische Seneszenzfunktion liegt vermutlich in einem massiven, aber kontrollierten Abbau der zellulären Bestandteile, der wiederum notwendig für die Stabilisierung der

zellulären Überlebensfähigkeit ist und für eine effiziente Ausführung der Seneszenz sorgt (Buchanan-Wollaston et al.; 2005). Inhibitoren der Blattseneszenz sind beispielsweise Cytokinine, die mit minimalen Konzentrationen effektiv die Chlorose abgeschnittener Blätter verhindern können (Mok und Mok; 1994), deren Zugabe in der *atg7*-Mutante allerdings nicht ausreichend antagonistisch wirkte (Doelling et al.; 2002). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Cytokinine, die letztendlich das Überleben des Blattes fördern, oberhalb des ATG8/ATG12 Weges oder in einem parallelen Weg wirken müssten.

Eine weitere Ursache der verfrühten Seneszenz in *atg*-Mutanten könnte in höheren Zuckermengen liegen (siehe Kap. 4.2.3), die nachgewiesene Auslöser dieses Phänomens sind (Dai et al.; 1999).

Auch weitere autophagieunabhängige, seneszenzinhibierende Funktionen der ATGs können nicht ausgeschlossen werden.

Weiterhin konnte in den in dieser Arbeit untersuchten *atg*-Mutanten vor allem bis zur vierten Wachstumswoche ein verzögertes Blattwachstum, einhergehend mit reduziertem Frischgewicht, festgestellt werden (Abb. 3.4), deren Ursache noch nicht aufgeklärt wurde. Möglich wäre, dass die Autophagie regulatorischen Einfluss auf Phytohormone wie SA, ABA, JA, ET und Brassinosteroide ausüben kann, die teilweise wiederum die Entwicklung und das Wachstum von Pflanzen beeinflussen. Brassinosteroid-Mutanten weisen z.B. Zwergwuchs und eine geringere Fertilität auf (Choe et al.; 2001), ähnlich also dem Phänotyp der *atg*-Mutanten, für die dünnere Blütenstände mit weniger Blüten festgestellt wurden (Abb. 3.7). Diese Hypothese müsste in zukünftigen, entwicklungsbiologischen Arbeiten durch Hormonanalysen bestätigt oder dementiert werden.

## **4.2 Einfluss der Autophagie-Defekte nach Infektionen mit Phytopathogenen**

Einige Studien sowohl im tierischen als auch pflanzlichen Organismus weisen auf eine Beteiligung der Autophagie an der Immunantwort hin (Levine; 2005, Liu et al.; 2005). Pflanzen besitzen im Gegensatz zu Tieren kein adaptives Immunsystem. Eine Gemeinsamkeit beider Organismen ist aber durch die angeborene Immunität gegeben. Diese ermöglicht es PAMPs als Fremdstrukturen wahrzunehmen und dadurch Immunantworten (PTI) auszulösen (Dangl und Jones; 2001). Wenn Pathogene befähigt sind die PTI zu unterdrücken, resultiert dies in einer Anfälligkeit der Pflanze (ETS). Erkennen Pflanzen pathogeneigene Virulenzfaktoren durch R-Genprodukte, setzt eine verstärkte Immunantwort ein, die häufig zur Bildung der HR führt (Dangl und Jones; 2001). Diese spezielle pathogeninduzierte Form des Zelltodes bedarf unter anderem einer

autophagischen eingrenzenden Regulation, wie am Beispiel von *ATG6* gezeigt wurde (Liu et al.; 2005, Patel und Dinesh-Kumar; 2008).

Da die Funktion der Autophagie in der Immunität zu Beginn der Arbeit nur unzureichend an wenigen *ATGs* charakterisiert war (Liu et al.; 2005, Patel und Dinesh-Kumar; 2008, Hofius et al.; 2009, Yoshimoto et al.; 2009) und die Expression einiger in dieser Arbeit untersuchter *ATGs* (*ATG1c*, *ATG7*, *ATG18a*) nach Pathogenbefall induziert wurde (Tab. 3.1), wurden mit *atg5-1*, *atg5-2*, *atg7*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* in einem breiten Versuchsansatz weitere *atg*-Mutanten systematisch auf eine mögliche Beteiligung in der Immunabwehr untersucht. Analysen wurden mit der Modellpflanze *A. thaliana* durchgeführt und umfassten sowohl verschiedene Immun- als auch Erregertypen (Basisimmunität (PTI) und R-Gen-spezifische Immunität (ETI); virulente/avirulente Bakterien und Pilze).

Die Besiedelung pflanzlichen Gewebes durch Phytopathogene kann auf unterschiedlichste Art und Weise erfolgen. Zwei bedeutende Ernährungsstrategien sind in der Nekrotrophie und Biotrophie gegeben. Nekrotrophe Organismen, wie beispielsweise die Pilze *B. cinerea* und *A. brassicicola* töten im Zuge der Infektion ihr Wirtsgewebe durch die Sekretion von Toxinen ab und sichern sich auf diese Weise ihre Nahrungs- und Vermehrungsgrundlage. Die Strategie biotropher Pathogene dagegen liegt darin, die Erkennung durch ihre jeweilige Wirtspflanze zu vermeiden und diese gleichzeitig zu parasitieren. Dies gelingt unter anderem durch die Vermeidung oder Unterdrückung zelltodauslösender Mechanismen (durch Effektoren) oder der Ausbildung bestimmter Infektionsstrukturen (wie Haustorien). Einige Organismen, wie *Pseudomonas syringae* oder *Phytophthora parasitica* wechseln im Laufe der Infektionszeit von der biotrophen auf die nekrotrophe Ernährungsform und werden daher als hemibiotrophe Pathogene bezeichnet. Der Nachweis einer möglichen Beteiligung der Autophagie an Abwehrmechanismen und die Ermittlung verschiedener Autophagiefunktionen wurde deshalb in Infektionsstudien mit nekrotrophen, biotrophen und hemibiotrophen Erregern in allen *atg*-Mutanten versucht.

#### **4.2.1 Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch nekrotrophe Pilze**

Vertreter nekrotropher Pilze wurden in *B. cinerea* und *A. brassicicola* gefunden. Die Infektion mit *B. cinerea* hatte sehr aggressive Auswirkungen auf das Blattgewebe (Abb. 3.14) und verursachte in allen untersuchten Linien große Läsionen, deren Größenbestimmung zu keinen deutlichen Unterschieden führte (Abb. 3.15). Allerdings konnte nach Infektion in den Mutanten eine verfrühte Seneszenz festgestellt werden (Abb. 3.14), die möglicherweise durch *B. cinerea* induziert sein könnte.

Da die Unterscheidung von Seneszenz und *B. cinerea*-induziertem Zelltod unter diesen Infektionsbedingungen nicht möglich war, wurden die *atg*-Mutanten nach Infektion mit dem weniger aggressiven Pilz *A. brassicicola* auf phänotypische Unterschiede hin untersucht.

Dieser Befall löste in allen *atg*-Mutanten, im Gegensatz zu Wildtyp- und komplementierten Linien, zu früheren Zeitpunkten und in stärkerem Ausmaß Chlorosen und Nekrosen aus, die sich meist über das komplette Blatt ausbreiteten. Die Ergebnisse wurden durch die Messung größerer Läsionen, erhöhtem Chlorophyllverlust und erhöhten Zelltod- und ROS-Raten unterstützt (Abb. 3.16 - Abb. 3.19). Die *atg7*-Linie wies im Vergleich zu den anderen drei *atg*-Mutanten geringere aber trotz allem zum Wildtyp unterscheidbare Krankheitssymptome auf, was aufgrund des unterschiedlichen Ökotyps hervorgerufen sein könnte.

Toxine, die häufig als externe Virulenzfaktoren wirksam sind (Abbas et al.; 1994), könnten den gestörten Zelltod in den *atg*-Mutanten verursachen, weswegen nach externer Applikation die Auswirkungen bestimmter Toxine auf das Blattgewebe untersucht wurden. Da Toxine aus *A. brassicicola* nicht verfügbar waren, wurde zunächst der Einfluss des Mycotoxins FB1 aus dem nekrotrophen Pilz *Fusarium moniliforme* untersucht. Dieses Toxin übt *in vitro* einen kompetitiv inhibierenden Effekt auf die Synthese des bioaktiven Sphingolipids Ceramid aus (Gilchrist; 1997). In Darmzellen, aber auch in anfälligen Tomatenblättern führt dies zu einer Akkumulation der freien, membranpermeablen Sphingoidbasen Sphinganin und Sphingosin (Abbas et al.; 1994, Schmelz et al.; 1998, Hannun et al.; 2001). Diese Ceramide, die in Tieren Apoptose aktivieren (Hannun und Obeid; 2002, Levade et al.; 2002, Pettus et al.; 2002), gelten als „second messenger“ in Stressantworten und induzieren ausschließlich im unphosphorylierten Zustand auch in *Arabidopsis* Zellen und Protoplasten einen apoptose-ähnlichen PCD (Liang et al.; 2003, Townley et al.; 2005).

Eine lokale FB1-Behandlung in den *atg*-Mutanten zeigte nach wenigen Tagen einen Zelltod der sich im Gegensatz zu den Wildtyp- und Kontroll-Linien über das ganze Blatt ausbreitete und nicht auf den Infiltrationsort beschränkt blieb (Abb. 3.20). Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass eine geregelte Regulation der Sphingolipidwege durch die Autophagie für eine negative Zelltodregulation von Nöten ist, und daher gezielt von nekrotrophen Organismen gestört wird, die von dem absterbenden Material als Nahrungsgrundlage profitieren. Interessant in diesem Zusammenhang ist ebenso die Tatsache, dass FB1 sowohl die Expression Seneszenz-assoziiierter Gene als auch die SA-Bildung induziert, die ihrerseits in hohen Mengen Zelltod auslösen kann (Weymann et al.; 1995, Rate et al.; 1999). So zeigen die Mutanten *cpr1-1*, *cpr6-1* und *acd2-2*, deren SA-Signalwege konstitutiv aktiv sind, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber FB1 (Bowling et al.; 1994, Greenberg et al.; 1994, Clarke et al.; 1998, Asai et al.; 2000, Greenberg und Yao; 2004). Da die SA-Mengen in unbehandelten *atg*-Mutanten bereits erhöht sind, wie durch Hormonmessungen festgestellt wurde (Tab. 3.3), könnte die verstärkte Zelltodausprägung sowohl nach FB1-Behandlung als auch nach *Alternaria*-Infektion möglicherweise darauf zurückführbar sein. Generell könnten erhöhte SA-Mengen außerdem die Abwehr gegenüber nekrotrophen Organismen herabsetzen, da der SA-Weg, der mit der Abwehr gegenüber biotrophen Pathogenen in

enger Verbindung steht, auch einen inhibitorischen Einfluss auf die JA- und ET-Wege ausüben kann, die wiederum für die Abwehr gegenüber nekrotrophen Pathogenen benötigt werden (Glazebrook; 2005). Da aber nach FB1-Behandlung sowohl SA-Mengen als auch JA-Mengen anstiegen (Tab. 3.3), gilt diese Annahme als eher unwahrscheinlich.

Es war nun interessant festzustellen, ob der in den *atg*-Mutanten gefundene Phänotyp nach *Alternaria*-Befall bzw. FB1-Behandlung ganz allgemein durch verschiedene Zelltodauslöser (wie NLP<sub>Pp</sub> oder Methanol) erzeugt wird, weswegen deren Symptomatik auf *Arabidopsis*-Blättern untersucht wurde. Das nekroseauslösende Toxin NLP<sub>Pp</sub> des hemibiotrophen Oomyceten *Phytophthora parasitica* zeigte interessanterweise keine über den Applikationsort hinausgehende Zelltodausbreitung (Abb. 3.21). Auch der durch Methanol hervorgerufene Zelltod blieb auf den Applikationsort beschränkt und bestätigt, ähnlich wie die Ergebnisse nach NLP<sub>Pp</sub>-Behandlung, dass *atg*-Mutanten nicht allgemein in der Zelltodregulation gestört sind (Abb. 3.33).

Die Infiltration des hemibiotrophen Bakteriums *Pto avrRpm1*, welches eine R-Gen vermittelte HR auslöst, führte im Gegensatz zu Patel und Dinesh-Kumar (2008) und Yoshimoto et al. (2009) jedoch übereinstimmend mit Hofius et al. (2009) auch nicht nach 20 Tagen zu fehlreguliertem Zelltod (Abb. 3.33). Eine mögliche Erklärung dieser konträren Datensätze könnte an altersbedingten Unterschieden der Pflanzen liegen (Yoshimoto et al.; 2009). So fanden Yoshimoto et al. (2009) auch lediglich in 7 - 8 Wochen nicht jedoch in 4 - 5 Wochen alten Pflanzen die beschriebene Zelltodausbreitung vor. Da ältere Pflanzen zur spontanen ROS-Bildung neigen (Yoshimoto et al.; 2009) und nach 7 - 8 Wochen ebenso erste Seneszenzerscheinungen auftreten (Abb. 3.6), könnte der beschriebene sich ausbreitende Zelltod nach *Pto avrRpm1*-Infektion möglicherweise lediglich ein Sekundäreffekt oxidativen Stresses und induzierter Seneszenz sein. Da die unter oxidativem Stress gebildeten ROS durch ihre hohe Reaktivität Schäden an Proteinen, Lipiden und Kohlenhydraten verursachen, sind sie aufgrund ihrer hohen Toxizität befähigt, den Zelltod einzuleiten (Mittler et al.; 2004). Akkumulationen von ROS könnten somit auch für den Zelltod nach *Alternaria* Infektion verantwortlich sein, waren aber in unbehandelten 4 - 5 Wochen alten Pflanzen nicht nachweisbar (Abb. 3.8). Ein direkter Einfluss von ROS an der Ausprägung des Phänotyps konnte daher ausgeschlossen werden. Nach *Alternaria*-Infektion stiegen die ROS-Mengen aber in den *atg*-Mutanten auch außerhalb der Infektionsstellen an (Abb. 3.19) und könnten somit indirekt in fehlreguliertem Zelltod münden.

Bei Säugetieren fördern ROS die lysosomale Membranpermeabilisierung und lösen dadurch die Caspase-vermittelte Apoptose bzw. den Cathepsin-vermittelten nekrotischen Zelltod aus (Yamashima; 2004, Golstein und Kroemer; 2007, Kurz et al.; 2008). ROS induzieren aber auch einen Zelltod, der in Autophagosomenanhäufung resultiert (Chen et al.; 2008). Diese Form des autophagischen Zelltods wird als Antwort auf oxidativen Stress im Nervensystem

aktiviert (Harraz et al.; 2008). ROS selbst ist sogar ein möglicher Aktivator des autophagischen Weges, wobei  $H_2O_2$  als direkter Regulator von *ATG4* identifiziert wurde (Scherz-Shouval et al.; 2007). Dem Zelltod entgegen wirkt in Säugerzellen die Chaperon-vermittelte Autophagie, die für den Abbau oxidierter Proteine während oxidativer Stressbedingungen benötigt wird (Kiffin et al.; 2004), in Pflanzen aber noch nicht nachgewiesen werden konnte (Thompson und Vierstra; 2005). Eine zellschützende Funktion wird auch durch die ebenso in Pflanzen bisher nicht bekannte Mitophagie erzielt. Hierbei werden defekte Mitochondrien eliminiert, die ansonsten in einem wiederkehrenden Kreislauf potentiellen und immer größeren oxidativen Schaden anrichten können (Kim et al.; 2007) (Wallace; 2005). Somit kommt der Autophagie während des oxidativen Stresses eine duale Rolle in der Auslösung oder Verhinderung des Zelltods zu.

Zusätzlich zu den infektionsbedingt gebildeten ROS-Mengen wurde in *atg*-Mutanten von *A. thaliana* konstitutiver oxidativer Stress nachgewiesen (Xiong et al.; 2007a), welcher die Schwelle zur Zelltodinitiierung weiter herabsetzen könnte. Ebenfalls erhöhte ROS-Mengen wurden in *atg7*-defizienten Muskelzellen von Säugetieren gefunden, die morphologisch veränderte Mitochondrien aufwiesen und in ihrer für die Respiration essentiellen Funktion beeinträchtigt waren (Wu et al.; 2009). Die Akkumulation von ROS scheint somit ein übergreifendes Merkmal der *atg*-Mutanten verschiedener Organismen zu sein.

Somit lässt sich schlussfolgern, dass die Autophagie vor allem unter Stressbedingungen für den Abbau eines Übermaßes an oxidierten Proteinen und Lipidperoxiden nötig ist, die sich zusätzlich zu den unter normalen Wachstumsbedingungen fortwährend gebildeten oxidierten Proteinen bilden. Da *atg*-Mutanten nach *Alternaria*-Befall bzw. FB1-Behandlung nicht befähigt sind oxidierte Proteine dem Abbau zuzuführen, wäre es denkbar, dass diese die Verursacher des beobachtbaren unkontrollierten Zelltods sind.

Weiterhin möglich wäre, dass die Autophagie für die Eliminierung noch nicht identifizierter zelltodfördernder Faktoren von Nöten ist, die ansonsten in das umgebende, gesunde Gewebe auswandern, oder aber, dass die Autophagie die Induktion, Beweglichkeit oder Erkennung eines pro-PCD Signals moduliert (Patel et al.; 2006). Indirekt könnte die Autophagie auch eine Rolle spielen, in dem sie Rezeptoren oder andere beteiligte Komponenten des pro-PCD-Signals blockiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durch nekrotrophe Pilze oder deren Toxine ausgelösten Zelltodprogramme in *atg*-Mutanten dereguliert sind und der Autophagie somit eine zelltodbegrenzende Funktion in dieser Interaktion zukommt. Diese Zelltodregulation bildet eine Grundlage für die Abwehr von *A. brassicicola*. Die Behandlung mit Toxinen aus hemibiotrophen Organismen dagegen, bzw. Bakterieninfektionen mit hemibiotrophen avirulenten Stämmen, ebenso wie unspezifische Methanolbehandlungen ließen keinen sich ausbreitenden Zelltod feststellen und zeigten somit keinerlei Unterschiede zu Wildtyp-Linien.

Dieser Befund lässt folglich auf eine gewisse Spezifität des autophagischen Prozesses in der Zelltodregulation schließen.

#### **4.2.2 Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch biotrophe Oomyceten**

Aufgrund der Ergebnisse nach Infektion mit nekrotrophen Pilzen wäre zu erwarten, dass erhöhte Anfälligkeit gegenüber nekrotrophen Pathogenen zu erhöhter Resistenz gegenüber obligat biotrophen Pathogenen führt. Daher wurde auch diese Art von Interaktion in weiteren Infektionsversuchen untersucht.

In Kollaboration mit J. Parker (MPI für Pflanzenzüchtung, Köln) wurden Infektionsstudien mit dem biotrophen Oomyceten *H. arabidopsidis* durchgeführt, die allerdings im Vergleich zum Wildtyp sowohl nach Infektion mit virulenten, als auch avirulenten Stämmen keinerlei Unterscheidung in den Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* zuließen (Abb. 3.22; Abb. 3.23). Auch für *atg7* konnte nach Infektion mit einem virulenten Stamm kein Unterschied hinsichtlich des Zelltods und der Sporenbildung festgestellt werden (Abb. 3.24). Dies widerspricht somit den Daten von Hofius et al. (2009), die eine erhöhte Anfälligkeit der Linie gegenüber diesem Isolat beschrieben hatten und im Gegenzug eine erhöhte Resistenz gegenüber avirulenten Isolaten fanden, was hier für *atg7* aber nicht näher analysiert wurde. Da die gleiche KO-Linie verwendet wurde, wäre eine Erklärung für diese konträren Datensätze, dass das Pflanzenalter verschieden war und dadurch unterschiedliche Anfälligkeit hervorgerufen wurde (siehe Kap. 4.2.1). In diesem Zusammenhang belegt eine Studie, die in zehn verschiedenen Laboren gleiche Versuchsansätze wählte, eindrucksvoll, dass trotz Standardbedingungen auch eine erhebliche Variabilität hinsichtlich der Phänotypen auftreten kann (Massonnet et al.; 2010). Dies ließ sich auf geringfügige Änderungen der Anzuchtbedingungen (wie z. B. Lichtqualität) zurückführen, die wiederum einen Einfluss auf makroskopische und molekulare Phänotypen ausübten. Vorstellbar wäre somit auch, dass äußere Umwelteinflüsse ähnliche Effekte auf Zelltod und Immunität ausüben können, die die konträren Datensätze erklären würden.

### 4.2.3 Einfluss der Autophagie-Defekte nach Befall durch hemibiotrophe Bakterien

Entgegen den Erwartungen konnte nach den Daten dieser Arbeit somit in den *atg*-Mutanten keine erhöhte Resistenz gegenüber biotrophen Oomyceten nachgewiesen werden.

Das hemibiotrophe Bakterium *P. syringae* verbindet die biotrophe mit der nekrotrophen Lebensweise und löst in später Infektionsphase krankheitsbedingten Zelltod aus (Glazebrook; 2005), weswegen die Auswirkungen einer Infektion mit diesem Bakterium im Folgenden näher analysiert wurden. Zusätzlich zu Quantifizierungen des bakteriellen Wachstums sollte der Frage nachgegangen werden, ob diese spät ausgelöste Form des Zelltods ebenfalls einer autophagischen Regulation unterliegt, wie für *atg6* in *Arabidopsis* gezeigt wurde (Patel und Dinesh-Kumar; 2008) oder, ob die Regulation über andere Mechanismen gesteuert wird. Deshalb wurden verschiedene Stämme des hemibiotrophen Bakteriums, die virulenter, avirulenter, Typ III-Sekretionssystem defizienter und nichtpathogener Natur waren, hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und ihres makroskopischen Infektions-Phänotyps untersucht (Kap. 3.8.2).

Durch mehrfache experimentelle Wiederholungen konnten Unterschiede zwischen *atg*-Mutanten und Wildtyp- bzw. komplementierten Linien nach Infektion mit avirulenten, Typ III-Sekretionssystem defizienten und nichtpathogenen Stämmen ausgeschlossen werden (Abb. 3.25 - Abb. 3.28). Frühere Infektionsstudien mit *Pto avrRpm1* in *atg6*-defizienten Linien zeigten ebenfalls kein verändertes Wachstumsverhalten im Vergleich zum Wildtyp (Patel und Dinesh-Kumar; 2008), wogegen Hofius et al. (2009) erhöhte Suszeptibilität in den *atg*-Mutanten *atg7* und *atg9* nach Infektion mit *Pto avrRpm1* und *Pto avrRps4* nachwies. Da diese beiden Linien im Ws-Hintergrund sind, wären Unterschiede durch Ökotypspezifitäten zu erklären, oder aber wie bereits in Kap. 4.2.2 erwähnt, durch laborspezifische Unterschiede in der Handhabung der Infektionsversuche und Anzuchtbedingungen (Massonnet et al.; 2010).

Signifikante Unterschiede wurden jedoch in der Immunität gegenüber *Pto* DC3000 in den im Col-0-Hintergrund befindlichen Mutanten *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* erhalten, die alle auf konsistente Weise einen erhöhten Resistenzphänotyp gegenüber *Pto* DC3000 aufwiesen (Abb. 3.29). Die Mutante *atg7* zeigte einen abweichenden Phänotyp, da keine Unterschiede hinsichtlich des Bakterienwachstums zu quantifizieren waren, die Blätter aber im Vergleich zum Wildtyp (Ws) und der komplementierten Linie starke Chlorosen aufwiesen (Abb. 3.31). Möglicherweise handelt es sich hierbei um einen Ökotyp-spezifischen Unterschied, weswegen es interessant wäre, eine *atg7*-Mutante im Col-0-Hintergrund zu testen. Da die bisher einzige verfügbare homozygote KO-Linie (N557605) im Col-0-Hintergrund nicht frei von Transkript war (Daten nicht gezeigt), konnte dieser Versuch noch nicht durchgeführt werden.

Möglich wäre allerdings auch, dass *ATG7* direkt für die Eingrenzung des Zelltodes benötigt wird, wie es auch für *ATG6* gezeigt werden konnte (Patel und Dinesh-Kumar; 2008).

Zur Klärung der erhöhten Resistenz der drei unabhängigen *atg*-Mutanten wurden eine Reihe fortführender Experimente durchgeführt. Ein verstärkt auftretender Zelltod dieser *atg*-Linien könnte den Resistenzphänotyp erklären, da die Bakterien zunächst von lebendem Blattgewebe abhängig sind. Sollte dieses lokal absterben, würde ähnlich wie bei der HR, dem Pathogen die Nahrungsgrundlage entzogen, was in schlechteres Wachstum und somit erhöhte Resistenz der Pflanze münden würde. Eine erhöhte Zelltodrate konnte allerdings weder durch Ionenleitfähigkeitsmessungen noch durch Trypanblaufärbungen bestätigt werden (Abb. 3.30; Abb. 3.31).

Resistenzen gegenüber Pathogenen könnten auch durch einen erhöhten Zuckergehalt bewirkt werden (Herbers et al.; 1996a, Herbers et al.; 1996b, Salzman et al.; 1998). Daher war es interessant den Zusammenhang zwischen Zuckermengen und der Immunität in Wildtyp- und *atg*-Mutanten zu analysieren. Weitere Indizien, die für gesteigerte Zuckermengen in den *atg*-Mutanten sprachen, waren die geringere Größe und die verfrühte Seneszenz (Kap. 4.1). Exogen applizierte Zucker inhibieren ebenfalls das Wachstum und induzieren sogar die Expression von PR-Proteinen (Herbers et al.; 1995, Herbers et al.; 1996b). Tomatenpflanzen, die den Zuckersensor Hexokinase überexprimierten, zeigten auch beschleunigte Seneszenz (Dai et al.; 1999). Dies verbindet wiederum den Abwehrprozess mit der Seneszenz. Die *hys1/cpr5*-Mutante (Hyperseneszenz/konstitutiver Expressor von *PR-5*) beispielsweise weist erhöhte Zuckermengen auf und zeigt sowohl eine verfrühte Seneszenz als auch eine erhöhte Abwehr gegenüber Pathogenen. Eine zuckerinduzierte erhöhte Abwehr der *atg*-Mutanten würde somit den Resistenzphänotyp und die verfrühte Seneszenz erklären. Der Vergleich der Mutanten *atg5-1* und *atg10* mit ihrem Wildtyp ergab aber keine deutlichen Unterschiede im Zuckergehalt sieben verschiedener Zucker (Fruktose, Glukose, Raffinose, Rhamnose, Ribulose, Sukrose, Stachyose) (gemessen von B. Stadelhofer, Daten nicht gezeigt), woraus sich schließen lässt, dass die Ursache der Resistenz in anderen Mechanismen begründet sein muss.

Da auch keine reduzierten Zuckermengen in den *atg*-Mutanten vorlagen, lässt sich ebenfalls ausschließen, dass die Vermehrung der Bakterien durch reduzierte Nährstoffverfügbarkeit gestört ist. Dies würde sich nicht nur im Zuckerpool, sondern auch im Aminosäurepool widerspiegeln, der aber ebenfalls zwischen *atg5*- und Wildtyppflanzen nicht unterscheidbar war (Yoshimoto et al.; 2009).

Eine weitere Erklärung der gefundenen Resistenz könnte darin liegen, dass Pathogene durch Bindung an Autophagiegene ihre Virulenz erhöhen, worauf in Kap. 4.3 näher eingegangen werden soll.

Weitere mögliche Ursachen der erhöhten Resistenz in den *atg*-Mutanten sollten durch Analysen früher (Stomataschließungen, MAPK-Aktivierungen, Ethylenproduktion, *FRK1*-Induktion) und später (*PR-1*-Induktion, Kalloseablagerungen) PTI-assoziiierter Abwehrreaktionen (Kap. 1.1) herausgefunden werden.

Doch traten weder stärkere Stomataschließungen (Abb. 3.37), noch verstärkt aktivierte MAPK-Kaskaden (Abb. 3.39) oder Änderungen in der Ethylenproduktion (Abb. 3.40) oder *FRK1*-Expression nach Flg22-Behandlung (Abb. 3.36) in den *atg*-Mutanten auf. Auch die nach Flg22-Behandlung gebildete Kallose (Abb. 3.38) und die Expression des Markergens *PR-1* (Abb. 3.36) ließen nach Flg22- und Chitin-Behandlung keine Unterscheidung zwischen Wildtyp und *atg5-1*-Mutante zu.

Die *atg*-Mutationen scheinen somit keine drastischen Auswirkungen auf die Regulation bzw. Aktivierung der PTI auszuüben.

Betrachtet man allerdings die Genexpression in den zur Kontrolle mit MgCl<sub>2</sub> infiltrierten Blättern, so zeigt sich, dass bereits ohne Infektion ausschließlich in den *atg*-Mutanten Transkript des Markergens *PR-1* und *FRK1* detektierbar war (Abb. 3.34; Abb. 3.35). Dasselbe wurde für *PR-1* ebenso für *atg5* zeitgleich beschrieben (Yoshimoto et al.; 2009). Beide Gene sind durch SA transkriptionell induziert (*PR-1*: (Seo et al.; 2008) und *FRK1*: IMDS, <http://ausubellab.mgh.harvard.edu/imds>). Tatsächlich konnten in drei unabhängigen Experimenten erhöhte SA- und JA-Mengen bereits in unbehandelten Blättern detektiert werden, wie für *atg5* ebenfalls von Yoshimoto et al. (2009) nachgewiesen wurde. Ebenfalls waren leichte Anstiege an SA bei *Pto* DC3000-behandelten *atg*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu vermerken (Tab. 3.2). Die erhöhten SA Mengen in den *atg*-Mutanten lieferten somit ein wichtiges Indiz, dass die Autophagie einen negativen Einfluss auf den SA-Hormonweg ausüben kann, welches wiederum bei konstitutiver Aktivierung bzw. Inhibierung des SA-Abbaus die erhöhte Resistenz der Mutanten erklären würde.

Die Bedeutung des Phytohormons SA wurde bereits in vielerlei Prozessen belegt. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass beispielsweise die Behandlung mit Flg22 schon nach 2 h eine lokale und systemische Akkumulation von SA verursacht (Mishina und Zeier; 2007). Eine weitere wichtige Entdeckung war, dass mit Flg22-vorbehandelte Wildtyp-Pflanzen durch „Priming“-Effekte erhöhte Resistenzen gegenüber *Pto* DC3000 in Folgeinfektionen aufwiesen (Zipfel et al.; 2004).

Weiterhin sind zahlreiche Mutanten bekannt, deren SA-Wege und Abwehrgenexpressionen konstitutiv aktiv sind und die zur spontanen Bildung nekrotischer Läsionen neigen. Diese HR-imitierende Läsion aktiviert vermutlich die SA-Produktion und *PR*-Gen-Expression und mündet in Resistenz gegenüber Pathogenen (Dietrich et al.; 1994, Devadas und Raina; 2002). Auch Mutanten, wie *dnd1* („defense, no death“) fallen in diese Kategorie, lösen allerdings keinen makroskopisch sichtbaren Zelltod aus (Yu et al.; 1998, Clough et al.; 2000,

Yu et al.; 2000). Dies würde auch auf die *atg*-Mutanten zutreffen. Diese konstitutive Resistenz erinnert an systemisch erworbene Resistenz (SAR) (White; 1979), die nach Induktion einer HR nach Erkennung zwischen R-Proteinen und mikrobiellen Effektoren für eine langanhaltende Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Pathogenen sorgt (Ross; 1961, Hecht und Bateman; 1964, Lovrekovich et al.; 1968, Uknes et al.; 1993, Ryals et al.; 1994). Die Antwort auf die Frage warum Pflanzen nicht generell erhöhte SA-Mengen mit einhergehender PR-Expression als Basisresistenz bilden, findet sich in der Betrachtung der Phänotypen dieser konstitutiv SAR-ausübenden Mutanten. Eine konstitutive SAR scheint einen schädlichen Einfluss auf den Gesamtorganismus auszuüben, deren Effekte den positiven Resistenzphänotyp überdecken würden. So kommt es im Fall von *acd2*- („accelerated cell death 2“) und *lsd1*- (lesion simulating disease“-) Mutationen zu spontanen Läsionen oder im Fall von *cpr1*- („constitutive expressor of *PR-1*) oder *dnd1*-Mutanten zu gehemmtem Größenwachstum (Yu et al.; 2000).

Auch für die *atg*-Linien *atg5-1*, *atg5-2*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* konnten reduziertes Wachstum, erhöhte SA-Mengen, konstitutive *PR-1*-Expressionen und erhöhte Resistenz gegenüber virulenten *Pto* DC3000 gefunden werden. Dies spräche für eine durch die *atg*-Mutationen hervorgerufene konstitutive SAR. Unterstützt wird diese Annahme weiterhin darin, dass in mehreren Wochen alten *lsd1*- wie auch *atg*-Mutanten konstitutiv oxidative Stresswege aktiviert sind, deren Produkte in geringen Mengen ebenso Schutzfunktionen erfüllen (Klibenstein et al.; 1999, Yoshimoto et al.; 2009).

Allerdings sollte eine konstitutive SAR auch eine erhöhte Resistenz gegenüber *H. arabidopsidis* auslösen. Da dies in dieser Form nicht beobachtet werden konnte (Kap. 4.2.2), wäre es möglich, dass die SA-Mengen für die Ausprägung von Resistenzen gegenüber obligat biotrophen Oomyceten höher liegen müssten, als es für hemibiotrophe Bakterien der Fall ist.

Da die SA-Mengen und *PR-1* Expressionen allerdings nur geringfügig und nicht um ein Vielfaches erhöht sind, treten die Defekte der *atg*-Mutanten im Vergleich zu *cpr*, *acd* und *lsd*-Mutanten nicht so deutlich zu Tage. Ob die geringfügig erhöhten SA-Mengen und *PR-1*-Expressionen tatsächlich alleine für die gefundene Resistenz verantwortlich sind, bleibt fraglich. Ein zukünftiger interessanter Versuch wäre, Wildtyp-Pflanzen einer Behandlung mit geringen Konzentrationen von SA oder SA-Analogen wie INA oder BTH zu unterziehen, um in *Pto* DC3000-Wachstumskurven einen vergleichbaren Resistenzphänotyp wie in den *atg*-Mutanten zu erzielen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Autophagie eine negativ regulierende Wirkung auf die SA-abhängige Abwehr auszuüben scheint. Somit kann zusätzlich zur Zelltodkontrolle eine weitere wichtige Funktion der Autophagie postuliert werden.

### 4.3 Autophagie als Abwehrmechanismus

In den in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsstudien konnte durch die Störung des autophagischen Prozesses eine erhöhte Resistenz nach Infektion mit virulenten Bakterien des Stammes *Pto* DC3000 gefunden werden, während die Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *A. brassicicola* oder die Behandlung mit FB1, isoliert aus dem nekrotrophen Pilz *F. moniliforme*, in erhöhtem Zelltod resultierte. Dies deutet, abhängig von der Ernährungsweise verschiedener Pathogene, auf unterschiedliche Beteiligungen der Autophagie in Abwehrmechanismen und Zelltodregulationen hin.

Wie in Kap. 4.2.1 und Kap. 4.2.3 diskutiert, ist es möglich, dass an der Ausprägung dieser Phänotypen der SA-Weg und auch möglicherweise andere Hormonwege entscheidend beteiligt sind. Zusätzlich ist der Prozess allgemein auch als Aufräummechanismus für den Abtransport oxidierter Proteine, Toxine oder defekter Organellen essentiell, die vermehrt nach Infektionen auftreten. Direkte, spezifische Interaktionen zwischen ATGs und Immunkomponenten, für die es zahlreiche Beispiele im tierischen System gibt, sind auch im pflanzlichen Organismus denkbar.

Bei Säugetieren sorgt die Autophagie für die Aktivierung von PRRs und Toll-ähnlichen Rezeptoren, deren Homologe auch in *A. thaliana* zu finden sind, was wiederum in der Aktivierung antimikrobieller Abwehrprodukte resultiert. Hochinteressant wäre es somit, Interaktionen zwischen ATGs und einem an der Abwehr beteiligten Rezeptor in *Arabidopsis* nachzuweisen. Die Komplexität der Autophagieregulation wird darin deutlich, dass TLRs auch selbst eine Autophagieinduktion herbeiführen können (Xu et al.; 2007, Delgado et al.; 2008), deren Nachweis im pflanzlichen Organismus aber noch aussteht. So können TLRs, wie TLR4 nach LPS-Erkennung in Makrophagen auch autophagosomale Proteine zur Phagosomenmembran rekrutieren (Sanjuan et al.; 2007).

Eine weitere wichtige Funktion in Säugetieren ist der direkte autolysosomale Abbau intrazellulärer Pathogene, wie z.B. von *Mycobacterium tuberculosis* aus Phagosomen (Gutierrez et al.; 2004), oder von ins Zytosol geflüchteten Pathogenen, wie *Shigella* (Ogawa et al.; 2005) oder auch von extrazellulären Pathogenen wie Streptokokken, die die Invasion bewerkstelligen (Nakagawa et al.; 2004). Die Funktion der Autophagie wird hierbei als allgemeiner zytoplasmatischer Aufräumprozess betrachtet. Da phytopathogene Bakterien allerdings den Apoplasten als Lebensraum nutzen und nicht intrazellulär auftreten, wäre eine Untersuchung dieses als Xenophagie beschriebenen Prozesses nur nach viraler Infektion in Pflanze-Pathogen-Interaktionen sinnvoll. Zahlreiche Beispiele für die Viruselimination sind auch im tierischen System beschrieben, wie durch erhöhte Virustiter in *atg5* und *atg6* Mutanten nach Infektion mit dem Herpes Simplex Virus deutlich wird (Levine und Yuan; 2005, Seay und Dinesh-Kumar; 2005). Die Notwendigkeit der Gene *ATG1*, *ATG2*, *ATG4*, *ATG6*, *ATG7*, *ATG8a-b* und *ATG9* nach VSV-Infektion zur Reduzierung viraler Titer konnte

ebenso in *Drosophila* bestätigt werden (Shelly et al.; 2009). Die Vielzahl getesteter Mutanten bekräftigt eine direkte Beteiligung des Autophagieweges und nicht anderer möglicher beeinflusster Wege. Ein reduzierter Virustiter in Tabak konnte auch erstmals nach Infektion mit dem TMV festgestellt werden (Liu et al.; 2005), was somit auf das Vorhandensein dieses direkten Abbauprozesses einen Hinweis geben könnte, jedoch einer mikroskopischen Bestätigung bedarf.

In Säugetieren wurden einzelne ATG-abhängige abwehrrelevante Funktionen identifiziert, die ebenso in Pflanzen vorstellbar wären. So führte eine erhöhte Expression von *Beclin1* in Neuronen zu einer Reduktion der Sindbis-Virus-Replikation (Liang et al.; 1998). In Mäusen konnte nach zellspezifischer Deletion in Phagozyten von *ATG5* nach Infektion mit dem Bakterium *Listeria monocytogenes* und dem Protozoen *Toxoplasma gondii* eine höhere Anfälligkeit gegenüber beiden verschiedenen intrazellulären Pathogenen festgestellt werden (Zhao et al.; 2008). Eine mögliche Hypothese ist, dass *ATG5* eine kritische Funktion in der Zerstörung Parasiten-enthaltender Vesikel spielt, indem es mit Immunabwehr-assoziierten GTPasen zur Vakuole rekrutiert wird (Virgin und Levine; 2009). Der genaue Mechanismus und die Rolle, der auch in *A. thaliana* vorkommenden GTPasen muss noch entschlüsselt werden. Eine Theorie ist, dass ihre Lokalisation am Pathogen-enthaltenden Phagosom oder der Vakuole die Zerstörung dieser Kompartimente erleichtert und das Pathogen in Richtung Autophagosom steuert. Folglich sind bestimmte ATG Proteine befähigt, zelluläre Faktoren oder Signalwege zu beeinflussen, die die Virus- und Bakterienreplikation oder Verbreitung einschränken.

Da im Zuge der Ko-Evolution von Pathogenen mit ihren Wirten immer weitere Virulenzeffektoren und R-Proteine gebildet werden, sind evolutionäre Anpassungen der Pathogene, die schützende Mechanismen gegen die Autophagie entwickelt haben, unvermeidlich. *Listeria monocytogenes* kann die Reifung von Autophagosomen durch Porenbildung mittels Toxinen verhindern (Birmingham et al.; 2008a, Birmingham et al.; 2008b), oder *Mycobacterium tuberculosis* die Fusion mit dem Lysosom unterbinden (Gutierrez et al.; 2004). *Legionella pneumophila* induziert sogar die Autophagie, um sich in Autophagosom-ähnlichen Kompartimenten zu replizieren (Gutierrez et al.; 2005) und auch Viren wie Corona- (Prentice et al.; 2004) oder Polioviren (Jackson et al.; 2005) profitieren von einem intakten Autophagieapparat. Auch Beispiele direkter Interaktionen zwischen ATGs und Effektorproteinen konnten identifiziert werden. Wenn *ATG5* auf direkte Weise mit dem Oberflächenprotein VirG von *Shigella flexneri* interagiert, so wird der Abbau von VirG eingeleitet. Besitzt das Bakterium allerdings das Effektorprotein IcsB, so kann dieses durch Blockierung eines bakteriellen Epitopes mit der Interaktion interferieren und die Erkennung mit anschließendem Abbau verhindern. IcsB-Mutanten werden von Autophagosomen eingeschlossen und abgebaut (Ogawa et al.; 2005). Eine direkte Interaktion zwischen dem

Neurovirulenzprotein ICP34.5 des Herpes-Simplex-Virus (HSV-1) und Beclin1 bewirkt die Funktionsinhibierung von Beclin1 und stellt somit ein weiteres Beispiel erfolgreicher Besiedelung dar. Tritt diese Bindung mit Inaktivierung dagegen nicht auf, so ist HSV-1 in Mäusen in seiner Virulenz geschwächt.

Da die Bakterien den pflanzlichen Organismus nicht intrazellulär befallen, kann die gefundene erhöhte Resistenz nach *Pto* DC3000-Infektion nicht durch das Fehlen von Autophagosomen, die zur Replikation fremder Strukturen genutzt werden, erklärt werden. Allerdings sind direkte Interaktionen zwischen pflanzlichen ATGs als Zielstellen für Virulenzeffektoren wie im tierischen System vorstellbar (Orvedahl et al.; 2007), die diese Interaktion für die Erhöhung ihrer Virulenz benötigen. Nach Ausschalten eines bestimmten ATGs wäre es möglich, dass ein Effektorprotein nicht mehr an den geeigneten Ort über Autophagosomentransport gelangen kann, oder aber durch das Autophagosom geschützt wird, und so auch vor dem Ubiquitin-Proteasom-Pfad verschont bleibt oder die Bindung an ein bestimmtes ATG direkt dessen Virulenzfunktion erhöht.

In tierischen Systemen konnte bereits eine vielfältige Beteiligung autophagischer Prozesse an der Ausprägung der Immunität nachgewiesen werden. In *Arabidopsis* konnte in den letzten Jahren durch einige Studien zunehmend gezeigt werden, dass der Prozess ebenso in komplexer Weise an der pflanzlichen Immunantwort beteiligt ist (Liu et al.; 2005, Patel und Dinesh-Kumar; 2008, Hofius et al.; 2009). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur *ATG6*, sondern auch weitere ATGs, wie *ATG1c*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG9*, *ATG10* und *ATG18a* insbesondere in der Basalresistenz eine bedeutende Rolle spielen. Die erste und bisher einzige Studie, die auf eine mögliche Xenophagie in Pflanzen hindeutet, wurde in Tabakpflanzen durchgeführt (Liu et al.; 2005). Im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen wurden erhöhte Virustiter des TMV in *atg6*-Mutanten gefunden. Erste Erkenntnisse in *Arabidopsis* wurden mit *atg6*-Knock-Down-Linien erzielt, die eine gestörte R-Gen vermittelte Zelltodregulation nach Infektion mit avirulenten Bakterien (*Pto* avrRpm1), sowie eine gestörte, krankheitsbedingte Zelltodregulation nach virulenter Bakterieninfektion zeigten (Patel und Dinesh-Kumar; 2008). Diese Ergebnisse deuten auf eine negative Zelltodregulation der Autophagie hin. Weitere Beispiele, die eine überlebensfördernde Funktion der Autophagie stützen, wurden in dieser Arbeit nach *Alternaria*-Befall oder Toxinaussetzung festgestellt, wobei die zugrunde liegenden regulatorischen Mechanismen vermutlich anderen Ursprungs sind.

Konträre Ergebnisse, die eine zelltodfördernde Funktion und somit positive Zelltodregulation der Autophagie postulieren, wurden mit den Linien *atg7* und *atg9* erhalten (Hofius et al.; 2009). Durch Zelltodmessungen wurde in den Mutanten weniger Zelltod als in Wildtyp-Pflanzen nachgewiesen. Allerdings steht dieses Phänomen in Abhängigkeit des

Immunrezeptors. Unterschiede in der Zelltodausrprägung konnten nur nach Perzeption an TIR-NB-LRR-Rezeptoren detektiert werden, nicht nach Erkennung durch CC-NB-LRR-Rezeptoren (Hofius et al.; 2009). Dieser Befund zeigt somit auch, dass die Autophagie spezifische Resistenzfunktionen erfüllt.

Dies wurde auch nach Infektion mit *Pto* DC3000 in dieser Arbeit deutlich, wobei ein negativer Einfluss auf SA-abhängige Prozesse ermittelt wurde.

Die Entschlüsselung der Autophagiefunktionen und deren zugrunde liegenden Regulationen stehen somit erst am Anfang, doch deren Beteiligung an immunrelevanten Prozessen gilt nun als gesichert. Zukünftig muss jedoch die Spezifität und Notwendigkeit des Prozesses näher analysiert werden, um die Funktion nicht nur auf den allgemeinen Aufräummechanismus zu beschränken. Außerdem muss auch überprüft werden, ob die Induktion der Autophagie nach Pathogeninfektion auf dieselbe Weise wie unter nährstofflimitierenden Bedingungen abläuft und wie die Pathogene eine Autophagieinduktion auslösen. Welche zusätzlichen zur SA benötigten Signale oder Komponenten die Induktion bzw. Repression der Autophagie während des PCD bewirken, muss in zukünftigen Experimenten geklärt werden.

## 5 Zusammenfassung

Der in Eukaryoten hochkonservierte Prozess der Autophagie erfüllt wichtige Funktionen in der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase und als Energielieferant unter nährstoffarmen Bedingungen. Zytosol, beschädigte oder überzählige Organellen und Proteinaggregate werden vom Autophagosom umschlossen, welches nach Transport und Fusion mit der Vakuole/Lysosom dem Abbau zugeführt wird. An diesem Vorgang sind eine Reihe von Autophagie-assoziierten Genen (ATGs) beteiligt und basierend auf Homologien zu Hefe, in der dieser Prozess am besten untersucht ist, konnten 36 ATGs in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden. Die Autophagie sorgt allerdings nicht nur für ein Gleichgewicht zwischen Biogenese und Abbau in der Zelle, sondern ist auch für die Zelltodregulation bedeutend. Im tierischen und auch im pflanzlichen System wurden sowohl zelltodfördernde als auch zelltodinhibierende Mechanismen beschrieben.

In dieser Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, wann die Autophagie das Überleben bzw. das Sterben der Zelle begünstigt, beziehungsweise welche Rolle diesem Prozess in der pflanzlichen Immunantwort zukommt. Erste Hinweise einer möglichen Beteiligung der Autophagie in der Immunabwehr lieferten Mikroarray-Analysen, die zeigten, dass die Expression von mehr als einem Drittel der ATGs nach Pathogeninfektion induziert wird, so auch von *ATG7* und *ATG18a*. In einem revers-genetischen Ansatz wurden eine Reihe von Knock-Out bzw. Knock-Down Linien für *ATG1c*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG10* und *ATG18a* verwendet, um den Einfluss der Autophagiedefizienz zu analysieren. Nach Infektion mit dem nekrotrophen Pilz *Alternaria brassicicola* konnten in allen hier untersuchten *atg*-Mutanten, im Gegensatz zu Wildtyp-Linien, verstärkte Krankheitssymptome beobachtet werden, die mit erhöhten Zelltodraten und vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies korrelierten. Dies konnte nicht für den biotrophen Oomyceten *Hyaloperonospora arabidopsidis* gefunden werden. Nach Behandlung der Blätter mit Fumonisin B1, ein aus nekrotrophen Pilzen isoliertes Toxin, kam es ebenso zu einer Zelltodausbreitung. Schlußfolgernd ließ sich aus diesem Datensatz eine Rolle der Autophagie während krankheitsbedingter Nekrose als einer Zelltodform, hervorgerufen durch nekrotrophe Organismen und deren Toxine, postulieren.

Eine mögliche Beteiligung der Autophagie an der bakteriellen Abwehr wurde durch Quantifizierungen des Wachstums verschiedener *Pseudomonas*-Stämme auf Wildtyp- und *atg*-Mutanten ermittelt. Nach Analyse von avirulenten Stämmen, Typ III-Sekretionsmutanten, Nichtwirtsstämmen und virulenten Stämmen konnten nur Unterschiede im Wachstumsverhalten nach Infektion mit virulenten *Pto* DC3000 gefunden werden. Die *atg*-Mutanten *atg5-1*, *atg10*, *atg18a-1* und *atg18a-2* wiesen eine deutlich erhöhte Resistenz

gegenüber diesem Pathogen auf, als es für Wildtyp- und komplementierte Linien der Fall war. Da makros- und mikroskopisch durch Ionenleitfähigkeitsmessungen und Trypanblaufärbungen kein vermehrter Zelltod nach Infektion mit *Pto* DC3000 nachgewiesen werden konnte, ließ sich die erhöhte Resistenz nicht durch eine erhöhte Zelltodrate und der damit verbundenen Wachstumsreduktion biotropher Erreger erklären. Fortführend wurde nach Veränderungen in der konstitutiven oder induzierbaren Ausprägung der PTI gesucht. Jedoch lieferten nach PAMP-Behandlung weder MAPK-Assays, Stomataöffnungszustände noch Mengen an abgelagerter Kallose Hinweise auf verbesserte Resistenzmechanismen in den *atg*-Mutanten. Interessanterweise konnte nach Analyse des Hormongehaltes sowie der Expression von Markergenen schon in nicht-infizierten Kontrollblättern der *atg*-Mutanten eine erhöhte Menge an SA sowie eine vermehrte Expression des SA-abhängigen Markergens *PR-1* detektiert werden. Dies könnte dazu beitragen, die erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 zu erklären.

Diese Arbeit zeigt somit zum einen eine Beteiligung der Autophagie an der Basalresistenz gegenüber nekrotisierenden Pathogenen und belegt des Weiteren eine negative regulatorische Funktion der Autophagie von SA-abhängigen Immunantworten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aarts, N, M Metz, E Holub, BJ Staskawicz, MJ Daniels und JE Parker** (1998) Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 10306-11
- Abbas, HK, T Tanaka, SO Duke, JK Porter, EM Wray, L Hodges, AE Sessions, E Wang, AH Merrill, Jr. und RT Riley** (1994) Fumonisin- and AAL-Toxin-Induced Disruption of Sphingolipid Metabolism with Accumulation of Free Sphingoid Bases. *Plant Physiol* **106**: 1085-1093
- Abeliovich, H, C Zhang, WA Dunn, Jr., KM Shokat und DJ Klionsky** (2003) Chemical genetic analysis of Apg1 reveals a non-kinase role in the induction of autophagy. *Mol Biol Cell* **14**: 477-90
- Abramovitch, RB, YJ Kim, S Chen, MB Dickman und GB Martin** (2003) Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J* **22**: 60-9
- Abramovitch, RB, JC Anderson und GB Martin** (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 601-11
- Ahlfors, R, V Macioszek, J Rudd, M Brosche, R Schlichting, D Scheel und J Kangasjarvi** (2004) Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis thaliana during ozone exposure. *Plant J* **40**: 512-22
- Alexander, DE und DA Leib** (2008) Xenophagy in herpes simplex virus replication and pathogenesis. *Autophagy* **4**: 101-3
- Alfano, JR und A Collmer** (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414
- Alonso, JM, AN Stepanova, TJ Leisse, CJ Kim, H Chen, P Shinn, DK Stevenson, J Zimmerman, P Barajas, R Cheuk, C Gadrinab, C Heller, A Jeske, E Koesema, CC Meyers, H Parker, L Prednis, Y Ansari, N Choy, H Deen, M Geralt, N Hazari, E Hom, M Karnes, C Mulholland, R Ndubaku, I Schmidt, P Guzman, L Aguilar-Henonin, M Schmid, D Weigel, DE Carter, T Marchand, E Risseeuw, D Brogden, A Zeko, WL Crosby, CC Berry und JR Ecker** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**: 653-7
- Asai, T, JM Stone, JE Heard, Y Kovtun, P Yorgey, J Sheen und FM Ausubel** (2000) Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* **12**: 1823-36
- Asai, T, G Tena, J Plotnikova, MR Willmann, WL Chiu, L Gomez-Gomez, T Boller, FM Ausubel und J Sheen** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**: 977-83
- Aubert, S, E Gout, R Bligny, D Marty-Mazars, F Barrieu, J Alabouvette, F Marty und R Douce** (1996) Ultrastructural and biochemical characterization of autophagy in higher plant cells subjected to carbon deprivation: control by the supply of mitochondria with respiratory substrates. *J Cell Biol* **133**: 1251-63
- Bassham, DC, M Laporte, F Marty, Y Moriyasu, Y Ohsumi, LJ Olsen und K Yoshimoto** (2006) Autophagy in development and stress responses of plants. *Autophagy* **2**: 2-11
- Bassham, DC** (2007) Plant autophagy--more than a starvation response. *Curr Opin Plant Biol* **10**: 587-93
- Bechtold, N und G Pelletier** (1998) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* **82**: 259-66
- Beers, EP und JM McDowell** (2001) Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 561-7
- Belkhadir, Y, R Subramaniam und JL Dangl** (2004) Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 391-9
- Bernales, S, KL McDonald und P Walter** (2006) Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response. *PLoS Biol* **4**: e423
- Biederbick, A, HF Kern und HP Elsasser** (1995) Monodansylcadaverine (MDC) is a specific in vivo marker for autophagic vacuoles. *Eur J Cell Biol* **66**: 3-14
- Birmingham, CL, V Canadien, NA Kaniuk, BE Steinberg, DE Higgins und JH Brumell** (2008a) Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* **451**: 350-4

- Birmingham, CL, DE Higgins und JH Brumell** (2008b) Avoiding death by autophagy: interactions of *Listeria monocytogenes* with the macrophage autophagy system. *Autophagy* **4**: 368-71
- Birnboim, HC und J Doly** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-23
- Blatt, MR, A Grabov, J Brearley, K Hammond-Kosack und JD Jones** (1999) K<sup>+</sup> channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction. *Plant J* **19**: 453-62
- Bleecker, AB und SE Patterson** (1997) Last exit: senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **9**: 1169-79
- Blume, B, T Nürnberger, N Nass und D Scheel** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-40
- Boller, T und G Felix** (2009) A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**: 379-406
- Bowling, SA, A Guo, H Cao, AS Gordon, DF Klessig und X Dong** (1994) A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**: 1845-57
- Bradford, MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54
- Bradley, DJ, P Kjellbom und CJ Lamb** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**: 21-30
- Brisson, LF, R Tenhaken und C Lamb** (1994) Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell* **6**: 1703-1712
- Brodersen, P, M Petersen, HM Pike, B Olszak, S Skov, N Odum, LB Jorgensen, RE Brown und J Mundy** (2002) Knockout of *Arabidopsis* accelerated-cell-death1 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev* **16**: 490-502
- Buchanan-Wollaston, V, T Page, E Harrison, E Breeze, PO Lim, HG Nam, JF Lin, SH Wu, J Swidzinski, K Ishizaki und CJ Leaver** (2005) Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. *Plant J* **42**: 567-85
- Büttner, D und U Bonas** (2003) Common infection strategies of plant and animal pathogenic bacteria. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 312-9
- Cao, Y und DJ Klionsky** (2007) Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein. *Cell Res* **17**: 839-49
- Century, KS, EB Holub und BJ Staskawicz** (1995) NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6597-601
- Chen, MH, LF Liu, YR Chen, HK Wu und SM Yu** (1994) Expression of alpha-amylases, carbohydrate metabolism, and autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant J* **6**: 625-36
- Chen, Y, E McMillan-Ward, J Kong, SJ Israels und SB Gibson** (2008) Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* **15**: 171-82
- Chisholm, ST, G Coaker, B Day und BJ Staskawicz** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* **124**: 803-14
- Choe, S, S Fujioka, T Noguchi, S Takatsuto, S Yoshida und KA Feldmann** (2001) Overexpression of DWARF4 in the brassinosteroid biosynthetic pathway results in increased vegetative growth and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant J* **26**: 573-82
- Chomczynski, P und N Sacchi** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**: 156-9
- Clarke, JD, Y Liu, DF Klessig und X Dong** (1998) Uncoupling PR gene expression from NPR1 and bacterial resistance: characterization of the dominant *Arabidopsis* cpr6-1 mutant. *Plant Cell* **10**: 557-69
- Clough, SJ und AF Bent** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-43
- Clough, SJ, KA Fengler, IC Yu, B Lippok, RK Smith, Jr. und AF Bent** (2000) The *Arabidopsis* dnd1 "defense, no death" gene encodes a mutated cyclic nucleotide-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 9323-8
- Contento, AL, SJ Kim und DC Bassham** (2004) Transcriptome profiling of the response of *Arabidopsis* suspension culture cells to Suc starvation. *Plant Physiol* **135**: 2330-47

- Dai, N, A Schaffer, M Petreikov, Y Shahak, Y Giller, K Ratner, A Levine und D Granot** (1999) Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis, and induces rapid senescence. *Plant Cell* **11**: 1253-66
- Dangl, JL, RA Dietrich und MH Richberg** (1996) Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* **8**: 1793-1807
- Dangl, JL und JD Jones** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-33
- De Duve, C** (1963) The lysosome. *Sci Am* **208**: 64-72
- del Pozo, O und E Lam** (2003) Expression of the baculovirus p35 protein in tobacco affects cell death progression and compromises N gene-mediated disease resistance response to Tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 485-94
- Delaney, TP, S Uknes, B Vernooij, L Friedrich, K Weymann, D Negrotto, T Gaffney, M Gut-Rella, H Kessmann, E Ward und J Ryals** (1994) A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Delgado, MA, RA Elmaoued, AS Davis, G Kyei und V Deretic** (2008) Toll-like receptors control autophagy. *Embo J* **27**: 1110-21
- Delgado, MA und V Deretic** (2009) Toll-like receptors in control of immunological autophagy. *Cell Death Differ* **16**: 976-83
- Delgado, MA, S Singh, S De Haro, S Master, M Ponpuak, C Dinkins, W Ornatowski, I Vergne und V Deretic** (2009) Autophagy and pattern recognition receptors in innate immunity. *Immunol Rev* **227**: 189-202
- Deretic, V** (2009) Strange bedfellows expose ancient secrets of autophagy in immunity. *Immunity* **30**: 479-81
- Devadas, SK und R Raina** (2002) Preexisting systemic acquired resistance suppresses hypersensitive response-associated cell death in Arabidopsis hr1 mutant. *Plant Physiol* **128**: 1234-44
- Dietrich, RA, TP Delaney, SJ Uknes, ER Ward, JA Ryals und JL Dangl** (1994) Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**: 565-77
- Doelling, JH, JM Walker, EM Friedman, AR Thompson und RD Vierstra** (2002) The APG8/12-activating enzyme APG7 is required for proper nutrient recycling and senescence in Arabidopsis thaliana. *J Biol Chem* **277**: 33105-14
- Drose, S, KU Bindseil, EJ Bowman, A Siebers, A Zeeck und K Altendorf** (1993) Inhibitory effect of modified bafilomycins and concanamycins on P- and V-type adenosinetriphosphatases. *Biochemistry* **32**: 3902-6
- Dunn, WA, Jr.** (1994) Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol* **4**: 139-43
- Durrant, WE und X Dong** (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209
- Edwards, K, C Johnstone und C Thompson** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Elbaz, M, A Avni und M Weil** (2002) Constitutive caspase-like machinery executes programmed cell death in plant cells. *Cell Death Differ* **9**: 726-33
- Feilner, T, C Hultschig, J Lee, S Meyer, RG Immink, A Koenig, A Possling, H Seitz, A Beveridge, D Scheel, DJ Cahill, H Lehrach, J Kreuzberger und B Kersten** (2005) High throughput identification of potential Arabidopsis mitogen-activated protein kinases substrates. *Mol Cell Proteomics* **4**: 1558-68
- Felix, G, JD Duran, S Volko und T Boller** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265-76
- Feys, B, CE Benedetti, CN Penfold und JG Turner** (1994) Arabidopsis Mutants Selected for Resistance to the Phytotoxin Coronatine Are Male Sterile, Insensitive to Methyl Jasmonate, and Resistant to a Bacterial Pathogen. *Plant Cell* **6**: 751-759
- Fujiki, Y, K Yoshimoto und Y Ohsumi** (2007) An Arabidopsis homolog of yeast ATG6/VPS30 is essential for pollen germination. *Plant Physiol* **143**: 1132-9
- Fujita, M, Y Fujita, Y Noutoshi, F Takahashi, Y Narusaka, K Yamaguchi-Shinozaki und K Shinozaki** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436-42
- Fukaki, H, Y Okushima und M Tasaka** (2007) Auxin-mediated lateral root formation in higher plants. *Int Rev Cytol* **256**: 111-37
- Funakoshi, T, A Matsuura, T Noda und Y Ohsumi** (1997) Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**: 207-13
- Gijzen, M und T Nürnbergger** (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry* **67**: 1800-7

- Gilchrist, DG, B Ward, V Moussatos und CJ Mirocha** (1992) Genetic and physiological response to fumonisins and AAL-toxin by intact tissue of a higher plant. *Mycopathologia* **117**: 57-64
- Gilchrist, DG, H Wang und RM Bostock** (1995) Sphingosine-related mycotoxins in plant and animal diseases. *Can. J. Bot.* **73**: 459-467
- Gilchrist, DG** (1997) Mycotoxins reveal connections between plants and animals in apoptosis and ceramide signaling. *Cell Death Differ* **4**: 689-98
- Gilchrist, DG** (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 393-414
- Glazebrook, J und FM Ausubel** (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 8955-9
- Glazebrook, J** (2001) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*--2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**: 301-8
- Glazebrook, J** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-27
- Glickman, MH und A Ciechanover** (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev* **82**: 373-428
- Gohre, V und S Robatzek** (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189-215
- Golstein, P und G Kroemer** (2007) Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* **32**: 37-43
- Gomez-Gomez, L, G Felix und T Boller** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **18**: 277-84
- Gomez-Gomez, L und T Boller** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003-11
- Gomez-Gomez, L, Z Bauer und T Boller** (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1155-63
- Goodman, RN und AJ Novacky** (1994) The hypersensitive reaction in plants to pathogens. *St Paul: APS Press*
- Gordon, PB und PO Seglen** (1988) Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem Biophys Res Commun* **151**: 40-7
- Green, DR und JC Reed** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* **281**: 1309-12
- Greenberg, JT, A Guo, DF Klessig und FM Ausubel** (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**: 551-63
- Greenberg, JT** (1996) Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12094-7
- Greenberg, JT** (1997) Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 525-545
- Greenberg, JT und BA Vinatzer** (2003) Identifying type III effectors of plant pathogens and analyzing their interaction with plant cells. *Curr Opin Microbiol* **6**: 20-8
- Greenberg, JT und N Yao** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**: 201-11
- Gutierrez, MG, SS Master, SB Singh, GA Taylor, MI Colombo und V Deretic** (2004) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* **119**: 753-66
- Gutierrez, MG, CL Vazquez, DB Munafo, FC Zoppino, W Beron, M Rabinovitch und MI Colombo** (2005) Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell Microbiol* **7**: 981-93
- Hamasaki, M und T Yoshimori** (2010) Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett*
- Hammerschmidt, R** (1999) PHYTOALEXINS: What Have We Learned After 60 Years? *Annu Rev Phytopathol* **37**: 285-306
- Hammond-Kosack, KE und JD Jones** (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**: 1773-91
- Hanaoka, H, T Noda, Y Shirano, T Kato, H Hayashi, D Shibata, S Tabata und Y Ohsumi** (2002) Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiol* **129**: 1181-93
- Hannun, YA, C Luberto und KM Argraves** (2001) Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry* **40**: 4893-903

- Hannun, YA und LM Obeid** (2002) The Ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* **277**: 25847-50
- Harraz, MM, TM Dawson und VL Dawson** (2008) Advances in neuronal cell death 2007. *Stroke* **39**: 286-8
- Hatsugai, N, M Kuroyanagi, K Yamada, T Meshi, S Tsuda, M Kondo, M Nishimura und I Hara-Nishimura** (2004) A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* **305**: 855-8
- Hauck, P, R Thilmony und SY He** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8577-82
- Heath, MC** (2000) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol* **44**: 321-34
- Hecht, EI und DF Bateman** (1964) Nonspecific acquired resistance to pathogens resulting from localized infections by *Thilaoiopsis basicola* or viruses in tobacco leaves. *Phytopathology* **54**: 523-530
- Herbers, K, G Monke, R Badur und U Sonnewald** (1995) A simplified procedure for the subtractive cDNA cloning of photoassimilate-responding genes: isolation of cDNAs encoding a new class of pathogenesis-related proteins. *Plant Mol Biol* **29**: 1027-38
- Herbers, K, P Meuwly, WB Frommer, JP Metraux und U Sonnewald** (1996a) Systemic Acquired Resistance Mediated by the Ectopic Expression of Invertase: Possible Hexose Sensing in the Secretory Pathway. *Plant Cell* **8**: 793-803
- Herbers, K, P Meuwly, JP Metraux und U Sonnewald** (1996b) Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett* **397**: 239-44
- Herman, E und M Schmidt** (2004) Endoplasmic reticulum to vacuole trafficking of endoplasmic reticulum bodies provides an alternate pathway for protein transfer to the vacuole. *Plant Physiol* **136**: 3440-6
- Hershko, A und A Ciechanover** (1992) The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* **61**: 761-807
- Hofius, D, T Schultz-Larsen, J Joensen, DI Tsitsigiannis, NH Petersen, O Mattsson, LB Jorgensen, JD Jones, J Mundy und M Petersen** (2009) Autophagic components contribute to hypersensitive cell death in Arabidopsis. *Cell* **137**: 773-83
- Ichimura, Y, T Kirisako, T Takao, Y Satomi, Y Shimonishi, N Ishihara, N Mizushima, I Tanida, E Kominami, M Ohsumi, T Noda und Y Ohsumi** (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488-92
- Inoue, H, H Nojima und H Okayama** (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-8
- Iwata, A, JC Christianson, M Bucci, LM Ellerby, N Nukina, LS Forno und RR Kopito** (2005) Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13135-40
- Iwata, J, J Ezaki, M Komatsu, S Yokota, T Ueno, I Tanida, T Chiba, K Tanaka und E Kominami** (2006) Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals. *J Biol Chem* **281**: 4035-41
- Jabs, T, M Tschöpe, C Colling, K Hahlbrock und D Scheel** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub><sup>-</sup> from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4800-5
- Jackson, WT, TH Giddings, Jr., MP Taylor, S Mulinyawe, M Rabinovitch, RR Kopito und K Kirkegaard** (2005) Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol* **3**: e156
- Jamir, Y, M Guo, HS Oh, T Petnicki-Ocwieja, S Chen, X Tang, MB Dickman, A Collmer und JR Alfano** (2004) Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast. *Plant J* **37**: 554-65
- Jonak, C, L Okresz, L Bogre und H Hirt** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 415-24
- Jones, JD und JL Dangl** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-9
- Juhász, G, G Csikos, R Sinka, M Erdelyi und M Sass** (2003) The *Drosophila* homolog of Aut1 is essential for autophagy and development. *FEBS Lett* **543**: 154-8
- Kamada, Y, T Funakoshi, T Shintani, K Nagano, M Ohsumi und Y Ohsumi** (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**: 1507-13
- Kato, H, O Takeuchi, E Mikamo-Satoh, R Hirai, T Kawai, K Matsushita, A Hiiragi, TS Dermody, T Fujita und S Akira** (2008) Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. *J Exp Med* **205**: 1601-10

- Kemmerling, B, A Schwedt, P Rodriguez, S Mazzotta, M Frank, SA Qamar, T Mengiste, S Betsuyaku, JE Parker, C Mussig, BP Thomma, C Albrecht, SC de Vries, H Hirt und T Nürnberger** (2007) The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol* **17**: 1116-22
- Kiffin, R, C Christian, E Knecht und AM Cuervo** (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **15**: 4829-40
- Kim, HS, D Desveaux, AU Singer, P Patel, J Sondek und JL Dangl** (2005) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from Arabidopsis membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 6496-501
- Kim, I, S Rodriguez-Enriquez und JJ Lemasters** (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-53
- Kim, J und DJ Klionsky** (2000) Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **69**: 303-42
- Kirisako, T, Y Ichimura, H Okada, Y Kabeya, N Mizushima, T Yoshimori, M Ohsumi, T Takao, T Noda und Y Ohsumi** (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* **151**: 263-76
- Klibenstein, DJ, RA Dietrich, AC Martin, RL Last und JL Dangl** (1999) LSD1 regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant Microbe Interact* **12**: 1022-1026
- Klionsky, DJ und SD Emr** (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**: 1717-21
- Klionsky, DJ, JM Cregg, WA Dunn, Jr., SD Emr, Y Sakai, IV Sandoval, A Sibirny, S Subramani, M Thumm, M Veenhuis und Y Ohsumi** (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* **5**: 539-45
- Klionsky, DJ** (2005) The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *J Cell Sci* **118**: 7-18
- Klionsky, DJ, AM Cuervo, WA Dunn, Jr., B Levine, I van der Klei und PO Seglen** (2007) How shall I eat thee? *Autophagy* **3**: 413-6
- Klionsky, DJ, H Abeliovich, P Agostinis, DK Agrawal, G Aliev, DS Askew, M Baba, EH Baehrecke, BA Bahr, A Ballabio, BA Bamber, DC Bassham, E Bergamini, X Bi, M Biard-Piechaczyk, JS Blum, DE Bredesen, JL Brodsky, JH Brumell, UT Brunk, W Bursch, N Camougrand, E Cebollero, F Cecconi, Y Chen, LS Chin, A Choi, CT Chu, J Chung, PG Clarke, RS Clark, SG Clarke, C Clave, JL Cleveland, P Codogno, MI Colombo, A Coto-Montes, JM Cregg, AM Cuervo et al.** (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**: 151-75
- Komatsu, M, T Ueno, S Waguri, Y Uchiyama, E Kominami und K Tanaka** (2007) Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ* **14**: 887-94
- Krick, R, Y Muhe, T Prick, M Bredschneider, S Bremer, D Wenzel, EL Eskelinen und M Thumm** (2009) Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic and morphological traits. *Autophagy* **5**: 270-2
- Krishnamurthy, KV, R Krishnaraj, R Chozhavendan und F Samuel Christopher** (2000) The programme of cell death in plants and animals – A comparison. *Current Science* **79**:
- Kuma, A, M Hatano, M Matsui, A Yamamoto, H Nakaya, T Yoshimori, Y Ohsumi, T Tokuhisa und N Mizushima** (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-6
- Kuma, A, M Matsui und N Mizushima** (2007) LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy* **3**: 323-8
- Kunze, G, C Zipfel, S Robatzek, K Niehaus, T Boller und G Felix** (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**: 3496-507
- Kurz, T, A Terman, B Gustafsson und UT Brunk** (2008) Lysosomes and oxidative stress in aging and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1291-303
- Laemmli, UK** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-5
- Lam, E** (2004) Controlled cell death, plant survival and development. *Nature Reviews* **5**: 305-315
- Lamb, C und RA Dixon** (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275
- Lee, J, B Klusener, G Tsiamis, C Stevens, C Neyt, AP Tampakaki, NJ Panopoulos, J Noller, EW Weiler, GR Cornelis, JW Mansfield und T Nürnberger** (2001) HrpZ(Psph) from the plant

- pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 289-94
- Lee, J, JJ Rudd, VK Macioszek und D Scheel** (2004) Dynamic changes in the localization of MAPK cascade components controlling pathogenesis-related (PR) gene expression during innate immunity in parsley. *J Biol Chem* **279**: 22440-8
- Lenk, SE, DL Fisher und WA Dunn, Jr.** (1991) Regulation of protein secretion by crinophagy in perfused rat liver. *Eur J Cell Biol* **56**: 201-9
- Levade, T, S Malagarie-Cazenave, V Gouaze, B Segui, C Tardy, S Betito, N Andrieu-Abadie und O Cuvillier** (2002) Ceramide in apoptosis: a revisited role. *Neurochem Res* **27**: 601-7
- Levine, A, RI Pennell, ME Alvarez, R Palmer und C Lamb** (1996) Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. *Curr Biol* **6**: 427-37
- Levine, B und DJ Klionsky** (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* **6**: 463-77
- Levine, B** (2005) Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* **120**: 159-62
- Levine, B und J Yuan** (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**: 2679-88
- Liang, H, N Yao, JT Song, S Luo, H Lu und JT Greenberg** (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev* **17**: 2636-41
- Liang, XH, LK Kleeman, HH Jiang, G Gordon, JE Goldman, G Berry, B Herman und B Levine** (1998) Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* **72**: 8586-96
- Lincoln, JE, C Richael, B Overduin, K Smith, R Bostock und DG Gilchrist** (2002) Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 15217-21
- Liu, Y, M Schiff, K Czymmek, Z Tallozy, B Levine und SP Dinesh-Kumar** (2005) Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell* **121**: 567-77
- Lovrekovich, L, H Lovrekovich und MA Stahmann** (1968) Tobacco mosaic virus-induced resistance to *Pseudomonas tabaci* in tobacco. *Phytopathology* **58**: 1034-5
- Lund, ST, RE Stall und HJ Klee** (1998) Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell* **10**: 371-82
- Maleck, K, A Levine, T Eulgem, A Morgan, J Schmid, KA Lawton, JL Dangi und RA Dietrich** (2000) The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat Genet* **26**: 403-10
- Marty, F** (1978) Cytochemical studies on GERL, provacuoles, and vacuoles in root meristematic cells of *Euphorbia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**: 852-856
- Marty, F** (1999) Plant vacuoles. *Plant Cell* **11**: 587-600
- Marzella, L, J Ahlberg und H Glaumann** (1981) Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* **36**: 219-34
- Massey, AC, C Zhang und AM Cuervo** (2006) Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* **73**: 205-35
- Massonnet, C, D Vile, J Fabre, MA Hannah, C Caldana, J Lisec, GT Beemster, RC Meyer, G Messerli, JT Gronlund, J Perkovic, E Wigmore, S May, MW Bevan, C Meyer, S Rubio-Diaz, D Weigel, JL Micol, V Buchanan-Wollaston, F Fiorani, S Walsh, B Rinn, W Gruissem, P Hilson, L Hennig, L Willmitzer und C Granier** (2010) Probing the reproducibility of leaf growth and molecular phenotypes: a comparison of three *Arabidopsis* accessions cultivated in ten laboratories. *Plant Physiol* **152**: 2142-57
- Matile, PH und F Winkentbach** (1971) Function of lysosomes and lysosomal enzymes in the senescing corolla of the Morning Glory. *J Exp Bot* **22**: 759-771
- Matsuoka, K, T Higuchi, M Maeshima und K Nakamura** (1997) A Vacuolar-Type H<sup>+</sup>-ATPase in a Nonvacuolar Organelle Is Required for the Sorting of Soluble Vacuolar Protein Precursors in Tobacco Cells. *Plant Cell* **9**: 533-546
- Matsuura, A, M Tsukada, Y Wada und Y Ohsumi** (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**: 245-50
- Mattoo, AK, H Hoffman-Falk, JB Marder und M Edelman** (1984) Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to in vivo degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1380-1384
- McGurl, B, G Pearce, M Orozco-Cardenas und CA Ryan** (1992) Structure, expression, and antisense inhibition of the systemin precursor gene. *Science* **255**: 1570-3

- Melendez, A, Z Tallozy, M Seaman, EL Eskelinen, DH Hall und B Levine** (2003) Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* **301**: 1387-91
- Melotto, M, W Underwood, J Koczan, K Nomura und SY He** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* **126**: 969-80
- Minamikawa, T, K Toyooka, T Okamoto, I Hara-Nishimura und M Nishimura** (2001) Degradation of ribulose-bisphosphate carboxylase by vacuolar enzymes of senescing French bean leaves: immunocytochemical and ultrastructural observations. *Protoplasma* **218**: 144-53
- Mishina, TE und J Zeier** (2007) Bacterial non-host resistance: interactions of Arabidopsis with non-adapted *Pseudomonas syringae* strains. *Physiol Plant* **131**: 448-61
- Mittal, S und KR Davis** (1995) Role of the phytotoxin coronatine in the infection of Arabidopsis thaliana by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **8**: 165-71
- Mittler, R, V Shulaev, M Sekar und E Lam** (1996) Inhibition of Programmed Cell Death in Tobacco Plants during a Pathogen-Induced Hypersensitive Response at Low Oxygen Pressure. *Plant Cell* **8**: 1991-2001
- Mittler, R und E Lam** (1997) Characterization of nuclease activities and DNA fragmentation induced upon hypersensitive response cell death and mechanical stress. *Plant Mol Biol* **34**: 209-21
- Mittler, R, S Vanderauwera, M Gollery und F Van Breusegem** (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* **9**: 490-8
- Mizushima, N, A Yamamoto, M Matsui, T Yoshimori und Y Ohsumi** (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**: 1101-11
- Mok, DWS und MC Mok** (1994) Cytokinins Chemistry, Activity, and Function. *CRC Press, Boca Raton, FL* 129-137
- Montillet, JL, S Chamnongpol, C Rusterucci, J Dat, B van de Cotte, JP Agnel, C Battesti, D Inze, F Van Breusegem und C Triantaphylides** (2005) Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol* **138**: 1516-26
- Moran, R** (1982) Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N,N-Dimethylformamide. *Plant Physiol* **69**: 1376-1381
- Morel, JB und JL Dangl** (1999) Suppressors of the arabidopsis *Isd5* cell death mutation identify genes involved in regulating disease resistance responses. *Genetics* **151**: 305-19
- Moriyasu, Y und Y Ohsumi** (1996) Autophagy in Tobacco Suspension-Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation. *Plant Physiol* **111**: 1233-1241
- Nair, U und DJ Klionsky** (2005) Molecular mechanisms and regulation of specific and nonspecific autophagy pathways in yeast. *J Biol Chem* **280**: 41785-8
- Nakagawa, I, A Amano, N Mizushima, A Yamamoto, H Yamaguchi, T Kamimoto, A Nara, J Funao, M Nakata, K Tsuda, S Hamada und T Yoshimori** (2004) Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science* **306**: 1037-40
- Navarro, L, C Zipfel, O Rowland, I Keller, S Robatzek, T Boller und JD Jones** (2004) The transcriptional innate immune response to flg<sub>22</sub>. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol* **135**: 1113-28
- Negrutiu, I, RD Shillito, I Potrykus, G Biasini und F Sala** (1987) Hybrid genes in the analysis of transformation conditions I. Setting up a simple method for direct gene transfer in plant protoplasts. *Plant Mol Biol* **8**: 363-373
- Nicholson, DW und NA Thornberry** (1997) Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci* **22**: 299-306
- Noda, T und Y Ohsumi** (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **273**: 3963-6
- Nürnberg, T und D Scheel** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci* **6**: 372-9
- Nürnberg, T, F Brunner, B Kemmerling und L Piater** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-66
- Nürnberg, T und V Lipka** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* **6**: 335-345
- Ogawa, M, T Yoshimori, T Suzuki, H Sagara, N Mizushima und C Sasakawa** (2005) Escape of intracellular *Shigella* from autophagy. *Science* **307**: 727-31
- Ohsumi, Y** (2001) Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 211-6
- Orvedahl, A, D Alexander, Z Tallozy, Q Sun, Y Wei, W Zhang, D Burns, DA Leib und B Levine** (2007) HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. *Cell Host Microbe* **1**: 23-35

- Otto, GP, MY Wu, N Kazgan, OR Anderson und RH Kessin (2003) Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **278**: 636-645
- Overbye, A, M Fengsrud und PO Seglen (2007) Proteomic analysis of membrane-associated proteins from rat liver autophagosomes. *Autophagy* **3**: 300-22
- Patel, S, J Caplan und S Dinesh-Kumar (2006) Autophagy in the control of programmed cell death. *Curr Opin Plant Biol*
- Patel, S und SP Dinesh-Kumar (2008) Arabidopsis ATG6 is required to limit the pathogen-associated cell death response. *Autophagy* **4**: 20-7
- Pennell, RI und C Lamb (1997) Programmed Cell Death in Plants. *Plant Cell* **9**: 1157-1168
- Pettus, BJ, CE Chalfant und YA Hannun (2002) Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 114-25
- Phillips, AR, A Suttangkakul und RD Vierstra (2008) The ATG12 Conjugating Enzyme ATG10 is Essential for Autophagic Vesicle Formation in Arabidopsis thaliana. *Genetics*
- Pieterse, CM und LC Van Loon (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 456-64
- Pieterse, CM, A Leon-Reyes, S Van der Ent und SC Van Wees (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308-16
- Prentice, E, WG Jerome, T Yoshimori, N Mizushima und MR Denison (2004) Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J Biol Chem* **279**: 10136-41
- Qin, G, Z Ma, L Zhang, S Xing, X Hou, J Deng, J Liu, Z Chen, LJ Qu und H Gu (2007) Arabidopsis AtBECLIN 1/AtAtg6/AtVps30 is essential for pollen germination and plant development. *Cell Res* **17**: 249-63
- Rangaswamy, V, R Mitchell, M Ullrich und C Bender (1998) Analysis of genes involved in biosynthesis of coronafacic acid, the polyketide component of the phytotoxin coronatine. *J Bacteriol* **180**: 3330-8
- Rate, DN, JV Cuenca, GR Bowman, DS Guttman und JT Greenberg (1999) The gain-of-function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell* **11**: 1695-708
- Raught, B, AC Gingras und N Sonenberg (2001) The target of rapamycin (TOR) proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 7037-44
- Reggiori, F und DJ Klionsky (2002) Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot Cell* **1**: 11-21
- Reggiori, F, T Shintani, U Nair und DJ Klionsky (2005) Atg9 cycles between mitochondria and the pre-autophagosomal structure in yeasts. *Autophagy* **1**: 101-9
- Reynolds, A, D Leake, Q Boese, S Scaringe, WS Marshall und A Khvorova (2004) Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* **22**: 326-30
- Robatzek, S, D Chinchilla und T Boller (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev* **20**: 537-42
- Rohde, J, J Heitman und ME Cardenas (2001) The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth. *J Biol Chem* **276**: 9583-6
- Romeis, T, P Piedras und JD Jones (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell* **12**: 803-16
- Rose, T, L Bonneau, C Der, D Marty-Mazars und F Marty (2006) Starvation-induced expression of autophagy genes in Arabidopsis. *Biol Cell* **98**: 53-67
- Ross, AF (1961) Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329-39
- Ryals, J, S Uknes und E Ward (1994) Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* **104**: 1109-1112
- Ryals, JA, UH Neuenschwander, MG Willits, A Molina, HY Steiner und MD Hunt (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Saijo, Y, N Tintor, X Lu, P Rauf, K Pajerowska-Mukhtar, H Haweker, X Dong, S Robatzek und P Schulze-Lefert (2009) Receptor quality control in the endoplasmic reticulum for plant innate immunity. *Embo J* **28**: 3439-49
- Salzman, RA, I Tikhonova, BP Bordelon, PM Hasegawa und RA Bressan (1998) Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant Physiol* **117**: 465-72
- Sambrook, TD (1998) Does visual perspective matter in imitation? *Perception* **27**: 1461-73
- Sanjuan, MA, CP Dillon, SW Tait, S Moshiah, F Dorsey, S Connell, M Komatsu, K Tanaka, JL Cleveland, S Withoff und DR Green (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**: 1253-7

- Schenk, PM, K Kazan, I Wilson, JP Anderson, T Richmond, SC Somerville und JM Manners** (2000) Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 11655-60
- Scherz-Shouval, R, E Shvets, E Fass, H Shorer, L Gil und Z Elazar** (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J* **26**: 1749-60
- Schmelz, EM, MA Dombrink-Kurtzman, PC Roberts, Y Kozutsumi, T Kawasaki und AH Merrill, Jr.** (1998) Induction of apoptosis by fumonisin B1 in HT29 cells is mediated by the accumulation of endogenous free sphingoid bases. *Toxicol Appl Pharmacol* **148**: 252-60
- Schmelzle, T und MN Hall** (2000) TOR, a central controller of cell growth. *Cell* **103**: 253-62
- Schmidt, GW und ML Mishkind** (1983) Rapid degradation of unassembled ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunits in chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 2632-2636
- Schwab, R, JF Palatnik, M Riester, C Schommer, M Schmid und D Weigel** (2005) Specific effects of microRNAs on the plant transcriptome. *Dev Cell* **8**: 517-27
- Scott, SV und DJ Klionsky** (1998) Delivery of proteins and organelles to the vacuole from the cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **10**: 523-9
- Seay, M, S Patel und SP Dinesh-Kumar** (2006) Autophagy and plant innate immunity. *Cell Microbiol* **8**: 899-906
- Seay, MD und SP Dinesh-Kumar** (2005) Life After Death: Are Autophagy Genes Involved in Cell Death and Survival during Plant Innate Immune Responses? *Autophagy* **1**: 185-6
- Seo, PJ, AK Lee, F Xiang und CM Park** (2008) Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell Physiol* **49**: 334-44
- Shelly, S, N Lukinova, S Bambina, A Berman und S Cherry** (2009) Autophagy is an essential component of Drosophila immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity* **30**: 588-98
- Shimizu, S, T Kanaseki, N Mizushima, T Mizuta, S Arakawa-Kobayashi, CB Thompson und Y Tsujimoto** (2004) Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* **6**: 1221-8
- Shintani, T, WP Huang, PE Stromhaug und DJ Klionsky** (2002) Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Dev Cell* **3**: 825-37
- Slavikova, S, G Shy, Y Yao, R Glozman, H Levanony, S Pietrokovski, Z Elazar und G Galili** (2005) The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *J Exp Bot* **56**: 2839-49
- Slusarenko, A und N Schlaich** (2003) Downy mildew of Arabidopsis thaliana caused by hyaloperonospora parasitica (formerly Peronospora parasitica).
- Smalle, J und RD Vierstra** (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 555-90
- Smart, C** (1994) Gene expression during leaf senescence. *New Phytologist* **126**: 419-448
- Southern, EM** (1992) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. 1975. *Biotechnology* **24**: 122-39
- Staskawicz, BJ, FM Ausubel, BJ Baker, JG Ellis und JD Jones** (1995) Molecular genetics of plant disease resistance. *Science* **268**: 661-7
- Stone, JM, JE Heard, T Asai und FM Ausubel** (2000) Simulation of fungal-mediated cell death by fumonisin B1 and selection of fumonisin B1-resistant (fbr) Arabidopsis mutants. *Plant Cell* **12**: 1811-22
- Surpin, M, H Zheng, MT Morita, C Saito, E Avila, JJ Blakeslee, A Bandyopadhyay, V Kovaleva, D Carter, A Murphy, M Tasaka und N Raikhel** (2003) The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability and mediates different protein transport pathways. *Plant Cell* **15**: 2885-99
- Suzuki, K, T Kirisako, Y Kamada, N Mizushima, T Noda und Y Ohsumi** (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo J* **20**: 5971-81
- Takatsuka, C, Y Inoue, K Matsuoka und Y Moriyasu** (2004) 3-methyladenine inhibits autophagy in tobacco culture cells under sucrose starvation conditions. *Plant Cell Physiol* **45**: 265-74
- Tamura, K, T Shimada, E Ono, Y Tanaka, A Nagatani, SI Higashi, M Watanabe, M Nishimura und I Hara-Nishimura** (2003) Why green fluorescent fusion proteins have not been observed in the vacuoles of higher plants. *Plant J* **35**: 545-55
- Thomma, BP, I Nelissen, K Eggermont und WF Broekaert** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus Alternaria brassicicola. *Plant J* **19**: 163-71

- Thompson, AR, JH Doelling, A Suttangkakul und RD Vierstra** (2005) Autophagic nutrient recycling in *Arabidopsis* directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* **138**: 2097-110
- Thompson, AR und RD Vierstra** (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 165-73
- Thorpe, GW, CS Fong, N Alic, VJ Higgins und IW Dawes** (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 6564-9
- Thumm, M, R Egner, B Koch, M Schlumpberger, M Straub, M Veenhuis und DH Wolf** (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **349**: 275-80
- Tolkovsky, AM** (2009) Mitophagy. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1508-15
- Tolleson, WH, WB Melchior, Jr., SM Morris, LJ McGarrity, OE Domon, L Muskhelishvili, SJ James und PC Howard** (1996) Apoptotic and anti-proliferative effects of fumonisin B1 in human keratinocytes, fibroblasts, esophageal epithelial cells and hepatoma cells. *Carcinogenesis* **17**: 239-49
- Townley, HE, K McDonald, GI Jenkins, MR Knight und CJ Leaver** (2005) Ceramides induce programmed cell death in *Arabidopsis* cells in a calcium-dependent manner. *Biol Chem* **386**: 161-6
- Toyooka, K, T Okamoto und T Minamikawa** (2001) Cotyledon cells of *Vigna mungo* seedlings use at least two distinct autophagic machineries for degradation of starch granules and cellular components. *J Cell Biol* **154**: 973-82
- Toyooka, K, Y Moriyasu, Y Goto, M Takeuchi, H Fukuda und K Matsuoka** (2006) Protein aggregates are transported to vacuoles by a macroautophagic mechanism in nutrient-starved plant cells. *Autophagy* **2**: 96-106
- Tsuji, J, EP Jackson, DA Gage, R Hammerschmidt und SC Somerville** (1992) Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiol* **98**: 1304-1309
- Tsukada, M und Y Ohsumi** (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **333**: 169-74
- Uknes, S, S Dincher, L Friedrich, D Negrotto, S Williams, H Thompson-Taylor, S Potter, E Ward und J Ryals** (1993) Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell* **5**: 159-69
- Veit, S, JM Wörle, T Nürnberger, W Koch und HU Seitz** (2001) A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiol* **127**: 832-41
- Vierstra, RD** (1993) Protein degradation in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **44**: 385-410
- Vigil, EL** (1970) Cytochemical and developmental changes in microbodies (glyoxysomes) and related organelles of castor bean endosperm. *J Cell Biol* **46**: 435-54
- Virgin, HW und B Levine** (2009) Autophagy genes in immunity. *Nat Immunol* **10**: 461-70
- Vittorini, S, C Paradiso, A Donati, G Cavallini, M Masini, Z Gori, M Pollera und E Bergamini** (1999) The age-related accumulation of protein carbonyl in rat liver correlates with the age-related decline in liver proteolytic activities. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **54**: B318-23
- Wallace, DC** (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* **39**: 359-407
- Wang, E, WP Norred, CW Bacon, RT Riley und AH Merrill, Jr.** (1991) Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium moniliforme*. *J Biol Chem* **266**: 14486-90
- Wang, H, J Li, RM Bostock und DG Gilchrist** (1996a) Apoptosis: A Functional Paradigm for Programmed Plant Cell Death Induced by a Host-Selective Phytotoxin and Invoked during Development. *Plant Cell* **8**: 375-391
- Wang, W, C Jones, J Ciacci-Zanella, T Holt, DG Gilchrist und MB Dickman** (1996b) Fumonisins and *Alternaria alternata* lycopersici toxins: sphinganine analog mycotoxins induce apoptosis in monkey kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 3461-5
- Weaver, LM, S Gan, B Quirino und RM Amasino** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol* **37**: 455-69
- Weissman, A** (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2**: 169-78
- Weymann, K, M Hunt, S Uknes, U Neuenschwander, K Lawton, HY Steiner und J Ryals** (1995) Suppression and Restoration of Lesion Formation in *Arabidopsis* lsd Mutants. *Plant Cell* **7**: 2013-2022
- White, RF** (1979) Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* **99**: 410-412

- Wu, JJ, C Quijano, E Chen, H Liu, L Cao, MM Fergusson, Rovira, II, S Gutkind, MP Daniels, M Komatsu und T Finkel (2009) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress mediate the physiological impairment induced by the disruption of autophagy. *Aging (Albany NY)* **1**: 425-37
- Xiong, Y, AL Contento und DC Bassham (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **42**: 535-46
- Xiong, Y, AL Contento und DC Bassham (2007a) Disruption of autophagy results in constitutive oxidative stress in *Arabidopsis*. *Autophagy* **3**: 257-8
- Xiong, Y, AL Contento, PQ Nguyen und DC Bassham (2007b) Degradation of oxidized proteins by autophagy during oxidative stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **143**: 291-9
- Xu, Y, C Jagannath, XD Liu, A Sharafkhaneh, KE Kolodziejska und NT Eissa (2007) Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* **27**: 135-44
- Yamashima, T (2004) Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell Calcium* **36**: 285-93
- Yoo, HS, WP Norred, J Showker und RT Riley (1996) Elevated sphingoid bases and complex sphingolipid depletion as contributing factors in fumonisin-induced cytotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **138**: 211-8
- Yoshimoto, K, H Hanaoka, S Sato, T Kato, S Tabata, T Noda und Y Ohsumi (2004) Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* **16**: 2967-83
- Yoshimoto, K, Y Jikumaru, Y Kamiya, M Kusano, C Consonni, R Panstruga, Y Ohsumi und K Shirasu (2009) Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 2914-27
- Yu, I, KA Fengler, SJ Clough und AF Bent (2000) Identification of *Arabidopsis* mutants exhibiting an altered hypersensitive response in gene-for-gene disease resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 277-86
- Yu, IC, J Parker und AF Bent (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis* dnd1 mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7819-24
- Yu, L, A Alva, H Su, P Dutt, E Freundt, S Welsh, EH Baehrecke und MJ Lenardo (2004) Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* **304**: 1500-2
- Zhang, S und DF Klessig (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci* **6**: 520-7
- Zhao, Z, B Fux, M Goodwin, IR Dunay, D Strong, BC Miller, K Cadwell, MA Delgado, M Ponpuak, KG Green, RE Schmidt, N Mizushima, V Deretic, LD Sibley und HW Virgin (2008) Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens. *Cell Host Microbe* **4**: 458-69
- Zimmermann, S, T Nürnbergger, JM Frachisse, W Wirtz, J Guern, R Hedrich und D Scheel (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2751-5
- Zipfel, C, S Robatzek, L Navarro, EJ Oakeley, JD Jones, G Felix und T Boller (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764-7
- Zipfel, C, G Kunze, D Chinchilla, A Caniard, JD Jones, T Boller und G Felix (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-60

# 7 Anhang

## Übersicht aller verwendeten Oligonukleotide

Primer	Sequenz 5' → 3'	T <sub>Schmelz</sub>	Gen
N574937LP	tcc gcc tcc caa att caa tc	60,40	<i>At3g53930</i>
N574937RP	acc aaa ttt atc ttc ccg gg	58,35	<i>At3g53930</i>
at3g53930gw-F	aaa aag cag gc taa atg gct cag tcg tcg ttg	68,49	<i>At3g53930</i>
at3g53930gw-R	aga aag ctg ggt ttg ctt ctg agg ata tga ag	67,21	<i>At3g53930</i>
at3g53930gw-SR	aga aag ctg ggt c tca ttg ctt ctg agg ata tg	68,38	<i>At3g53930</i>
at3g53930gw-F2	aaa aag cag gct aaa tgg ctc agt cgt cgt tgg tg	70,53	<i>At3g53930</i>
at3g53930gw-R2	aga aag ctg ggt ttg ctt ctg agg ata tga agt tc	68,19	<i>At3g53930</i>
at3g53930F1	agg tgg tga tct gtc tat gt	58,35	<i>At3g53930</i>
at3g53930R1	ttc aga gct gca tca tta tc	56,30	<i>At3g53930</i>
at3g53930F2	tgg ttc acc act gta tat gg	58,35	<i>At3g53930</i>
at3g53930R2	agc ttg acg gtt tga att gg	58,35	<i>At3g53930</i>
at3g53930F3	tca tct tca tct ggt tct ccg	60,61	<i>At3g53930</i>
at3g53930R3	ata tgt tct gag tcg ata cc	56,30	<i>At3g53930</i>
at3g53930F1-	atg gct cag tcg tcg tt	57,19	<i>At3g53930</i>
at3g53930R1	tca ttg ctt ctg agg ata tg	56,30	<i>At3g53930</i>
atg1c-F1	acg gat tta gtg ttg aaa ga	54,25	<i>At3g53930</i>
atg1c-F2	aga gta gga aga aat atc ag	54,25	<i>At3g53930</i>
atg1c-R1	tca atc tgg tta tga gtg ag	56,30	<i>At3g53930</i>
atg1c-atg2F	agg aga tcg cta tgg ctc gg	64,50	<i>At3g53930</i>
atg1c-utr-F	agtcacatcatcagctcaatttc	58,95	<i>At3g53930</i>
RNAi-atg1c-F	aaa aag cag gct atc ttt taa aca tac ttc ccc g	65,87	<i>At3g53930</i>
RNAi-atg1c-R	aga aag ctg ggt tct tcc ttg ggt act aaa tga tct g	69,12	<i>At3g53930</i>
atg1-EcoRI-Fwd	aat tga att cac cat ggc tca gtc gtc gtt ggt gg	70,53	<i>At3g53930</i>
atg1-NotI-Rev	aat tgc ggc cgc ctc att gct tct gag gat atg	70,87	<i>At3g53930</i>
atg1lmiR-s	gat tga ggc ttt aaa tag cgg tgt ctc tct ttt gta ttc c	68,80	<i>At3g53930</i>
atg1llmiR-a	gac acc gct att taa agc ctc aat caa aga gaa tca	67,78	<i>At3g53930</i>
atg1llmiR*s	gac aac gct att taa tgc ctc att cac agg tcg tga tat	69,82	<i>At3g53930</i>
atg1VmiR*a	gaa tga ggc att aaa tag cgt tgt cta cat ata tat tcc	65,73	<i>At3g53930</i>
N854665LP	aag caa gtt tca ggt gtc tc	58,35	<i>At5g17290</i>
N854665RP	taa gag gaa tca aca gag gc	58,35	<i>At5g17290</i>
atg5-gw-F	aaa aag cag gct gta tgg cga agg aag cgg	70,10	<i>At5g17290</i>
atg5-gw-R	aga aag ctg ggt acc ttt gag gag ctt tc	67,45	<i>At5g17290</i>
atg5-gw-SR	aga aaa gct ggg ttt cac ctt tga gga gct ttc	68,49	<i>At5g17290</i>
at5g17290-F1	atc acc caa gct taa aat ggg	58,66	<i>At5g17290</i>
at5g17290-R1	tca cct ttg agg agc ttt cac	60,61	<i>At5g17290</i>
atg5-1	acg tta gcc acc aac aga tta agc agt gt	66,04	<i>At5g17290</i>
atg5-2	caa ttc aca gat gga ttg taa ctg cag ag	64,62	<i>At5g17290</i>
atg5-3	atg gcg aag gaa gcg gtc a	62,32	<i>At5g17290</i>
atg5-4	tca cct ttg agg agc ttt	55,34	<i>At5g17290</i>
atg5-5	cac aaa gga gat cga aaa gaa cac ctg ttg	66,00	<i>At5g17290</i>
atg5-promattB1-gw-	aaa aag cag gct ccc aca ttt tct tac gta ccc	68,38	<i>At5g17290</i>
atg5-promattB5r-	aca aag ttg ttc tct tcc ccg tca cac ctt c	68,61	<i>At5g17290</i>
atg5-promattB2-gw-	aga aag ctg ggt atc tct tcc ccg tca cac ctt c	71,90	<i>At5g17290</i>
N557605LP	att gtg tat tat gtt tgt gtg gg	56,30	<i>At5g45900</i>
N557605RP	ttg tgg atg tcc aca tgg tc	60,40	<i>At5g45900</i>
at5g45900gw-F	aaa aag cag gct cca tgg ctg aga aag aaa ctc	68,38	<i>At5g45900</i>
at5g45900gw-R2	aga aag ctg ggt aag atc t aca gct aca tcg	67,29	<i>At5g45900</i>
at5g45900gw-SR2	aga aag ctg ggt t tta aag atc tac agc tac atc	65,87	<i>At5g45900</i>
at5g45900F1	atg gct gag aaa gaa act cc	58,35	<i>At5g45900</i>
at5g45900F2	ata agt gtc ctg ttc ctg gg	60,40	<i>At5g45900</i>
at5g45900F3	att agc ctt gct aat tcc atg	56,71	<i>At5g45900</i>
at5g45900F4	atg gta atg cgc cat ggt gc	62,45	<i>At5g45900</i>
at5g45900R2	acc ttg gca cgc ttc caa gt	62,45	<i>At5g45900</i>

at5g45900R3	tat cgg tta aca aga aca cc	56,30	<i>At5g45900</i>
at5g45900R4-2	atc tac agc tac atc gtc atc	58,66	<i>At5g45900</i>
atg7-EcoRI-Fwd	aat tga att cgc cat ggc tga gaa aga aac tcc	67,14	<i>At5g45900</i>
atg7-NotI-Rev	aat tgc ggc cgc ctt aaa gat cta cag cta cat c	69,49	<i>At5g45900</i>
atg7IImiR-s	gat taa atc tga gtc gcg ccg att tct ctc ttt tgt att cc	69,82	<i>At5g45900</i>
atg7IIImiR-a	gaa tcg gcg cga ctc aga ttt aat caa aga gaa tca	68,80	<i>At5g45900</i>
atg7IIImiR*s	gaa tag gcg cga ctc tga ttt att cac agg tog tga tat	70,85	<i>At5g45900</i>
atg7IVmiR*a	gaa taa atc aga gtc gcg cct att cta cat ata tat tcc	66,75	<i>At5g45900</i>
atg7-promattB1-gw-	aaa aag cag gct cca ttc aaa acc gtg tta agc	67,14	<i>At5g45900</i>
atg7-promattB2-gw-	aga aag ctg ggt agg ctg atc tta tct ttc tg	67,21	<i>At5g45900</i>
FLAG467B07LP	agc ttt tcc aaa caa cgc aac c	60,81	<i>At3g07525</i>
FLAG467B07RP	ttc gat tga tca gag gaa ccc	60,61	<i>At3g07525</i>
N584434LP	tta cag tgc atc ata caa gg	56,30	<i>At3g07525</i>
N584434RP	aag tgg tgt aag caa aat gg	56,30	<i>At3g07525</i>
at3g07525F1	atg gat tca gct cga gag	57,62	<i>At3g07525</i>
at3g07525R1	cta att cag cat ctc aag agg	58,66	<i>At3g07525</i>
atg10-gw-F	aaa aag cag gct caa tgg att cag ctc gag ag	68,49	<i>At3g07525</i>
atg10-gw-R	aga aag ctg ggt aat tca gca tct caa gag g	67,29	<i>At3g07525</i>
atg10-gw-SR	aga aag ctg ggt act aat tca gca tct caa gag	67,14	<i>At3g07525</i>
at3g07525R2	atg gat gct cct ctg gag	57,62	<i>At3g07525</i>
atg10-promattB1-	aaa aag cag gct ccg gag aca aac aac agt ata	68,09	<i>At3g07525</i>
atg10-promattB2-	aga aag ctg ggt atg gag gag taa aca aaa tcg c	68,28	<i>At3g07525</i>
62770LP	att tcg atc gtg gcg gtg g	62,32	<i>At3g62770</i>
62770RP	aca cac atc cag aaa cag c	58,01	<i>At3g62770</i>
at3g62770F1	atg gcc acc gta tct tct tc	60,40	<i>At3g62770</i>
at3g62770R1	cta acc act gag cat ttg aa	56,30	<i>At3g62770</i>
at3g62770-gw-F	aaa aag cag gct cta tgg cca ccg tat ctt ctt c	69,49	<i>At3g62770</i>
at3g62770-gw-R	aga aag ctg ggt aga aaa ctg aag gcg gtt tca gac	71,16	<i>At3g62770</i>
at3g62770-gw-SR	aga aag ctg ggt att aga aaa ctg aag gcg gtt tca g	69,12	<i>At3g62770</i>
atg18-prom-gw-F	aaa aag cag gct cat tga ttg tca acg tct gga a	67,08	<i>At3g62770</i>
atg18-prom-gw-R	aga aag ctg ggt agg aag aat gat ttg aag gaa tc	67,01	<i>At3g62770</i>
atg18-prom-gw-F2	aaa aag cag gct tta ctt aga cgt ttt tgg ttt g	64,66	<i>At3g62770</i>
A	ctg caa ggc gat taa gtt ggg taa c	64,58	amiRNA
B	gcg gat aac aat ttc aca cag gaa aca g	64,61	amiRNA
attB1 adapter	ggg gac aag ttt gta caa aaa agc agg c t	66,04	Gateway
attB2 adapter	ggg gac cac ttt gta caa gaa agc tgg gt	68,87	gateway
SALK_Lba	tgg ttc acg tag tgg gcc atc g	64,00	T-DNA
FLAG_LB4	gtg ccc acg gaa tag ttt tgg	59,80	T-DNA
Sail LB	gct tcc tat tat atc ttc cca aat tac c	60,7	T-DNA
GABI_Kat_Lba	ccc att tgg acg tga atg tag aca c	63,0	T-DNA
Oligo-dT	ttt ttt ttt ttt ttt tta gc	46,73	RT-PCR
PR-1 F	atg aat ttt act ggc tat tc	52,20	<i>At2g14610 (PR-1)</i>
PR-1-R	tta gta tgg ctt ctc gtt c	55,85	<i>At2g14610 (PR-1)</i>
Sirk5	gct gga tcc atc ggt tac ctt gac	64,4	<i>At2g19190 (FRK1)</i>
Sirk3	Gtc tag att cac tgt aag cat ttt cgt c	62,2	<i>At2g19190 (FRK1)</i>

Tab. 7.1: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide zur Analyse von *ATG1c*, *ATG5*, *ATG10* und *ATG18a*

## Übersicht aller genotypisierten Linien und deren phänotypischen Hintergründe

AtATG	Name	Insertion	Insertion	Insertion	Insertion
At3g61960 (a)	AtATG1	<b>N554351</b>	N801381	FLAG290B11	
At2g37840 (b)		N8559240			
At3g53930 (c)		<b>N614104</b>	<b>N630294</b>	<b>FLAG086H02</b>	N574937
At3g19190	AtATG2	N528908	N576727	FLAG453E06	FLAG539E04
At5g61500	AtATG3	nicht verfügbar			
At2g44140 (a)	AtATG4	<b>N858308</b>	N161641		
At3g59950 (b)		nicht verfügbar			
At5g17290	AtATG5	<b>N823856</b>	<b>GABI294F10</b>	<b>atg5</b>	N854665
		N520601			
At3g61710	AtATG6	N822970	N551168	N609281	
At5g45900	AtATG7	<b>N557605</b>	<b>atg7</b>		
At4g21980 (a)	AtATG8	<b>N545344</b>			
At4g04620 (b)		N561157			
At1g62040 (c)		N503706	N622538		
At2g05630 (d)		N544572			
At2g45170 (e)		N626394			
At4g16520 (f)		<b>N633008</b>	N557021		
At3g60640 (g)		nicht verfügbar			
At3g06420 (h)		<b>N855160</b>	N170356		
At3g15580 (i)		<b>N575713</b>	<b>N623914</b>		
At2g31260		AtATG9	<b>N645980</b>	N628991	N630796
At3g07525	AtATG10	<b>atg10</b>	N584434	N648910	FLAG467B07
At1g54210 (a)	AtATG12	<b>FLAG108A12</b>	N586079		
At3g13970 (b)		<b>N555982</b>	N503192		
At3g18770 (a)	AtATG13	nicht verfügbar			
At3g49590 (b)		<b>N565240</b>	<b>N544831</b>		
At3g62770 (a)	AtATG18	<b>GABI651D08</b>	<b>atg18aRNAi</b>	N830269	
At4g30510 (b)		N539939	N539947		
At2g40810 (c)		N813396	N588893		
At3g56440 (d)		nicht verfügbar			
At5g05150 (e)		N542915	N593971	N593998	N609133
At5g54730 (f)		<b>N562392</b>	N544700		
At1g03380 (g)		<b>N500928</b>			
At1g54710 (h)		nicht verfügbar			

**Tab. 7.2: T-DNA Insertionslinien**

In rot dargestellt sind alle pathogeninduzierten ATGs dargestellt, die in Mikroarrayanalysen ermittelt wurden. In schwarz gedruckt sind alle Linien, die als homozygot Knock-Out identifiziert wurden; in grau alle Linien die sich nach Genotypisierungen als homozygot Wildtyp herausstellten und in indigo alle heterozygoten Linien. Grün unterlegt sind die Linien die in Kollaboration mit R. van der Hoorn erhalten wurden, in blau die Linien, die von D. Bassham erhalten wurde und in beige die Knock-Out-Linien von R. Vierstra.



# DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde vom März 2006 bis Juni 2010 am Institut für Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei all denjenigen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank geht an Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und die vielen damit verbundenen hilfreichen Diskussionen sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus Harter für die Bereitschaft diese Arbeit mit zu begutachten.

Besonders danke ich auch meiner direkten Betreuerin Frau Dr. Andrea Gust für die Einarbeitung in die Pflanzenwelt, der Beantwortung zahlreicher Fragen und der Mitkorrektur dieser Arbeit.

Ich danke der Forschungsschwerpunktprogramm-Gemeinschaft Baden-Württemberg für die Finanzierung eines Teils dieser Arbeit.

Ein herzliches Danke meinen N1-Laborkollegen Dr. Anita Brock, Dr. Stefan Engelhardt, Dr. Yvonne Gäbler, Eva Haller, Dr. Karina Kober, Dagmar Kolb, Heini Lajunen, Roland Willmann und Weiguo Zhang für die schöne Zeit im Labor!

Ein besonderer Dank auch an Karina, die mich auf der Autophagosomensuche kräftig unterstützt hat und an Eric Melzer für die Ethylenmessungen.

Natürlich auch ein großes Danke allen weiteren N's und F's der Pflanzenbiochemie für die Hilfsbereitschaft, die prima Arbeitsatmosphäre sowie für die Seminarraum-Sonderveranstaltungen!

Danken möchte ich auch dem Gärtnereiteam für die vielen pikierten Kisten, Dieter Steinmetz, der das Innenleben des Computers immer wieder in Ordnung gebracht hat, Caterina Brancato für die Protoplastentransformationen und Karl Wurster und Bettina Stadelhofer für die Hormon- und Zuckeranalysen.

Für die freundlicherweise zur Verfügung gestellten Samen danke ich Richard Vierstra (Laboratory of Genetics, Madison), Diane Bassham (Department of Botany, Ames) und Renier van der Hoorn (MPI, Plant Chemetics, Köln).

Zum Schluss möchte ich mich noch ganz herzlich bei meinen drei wichtigsten G's bedanken. Meinen Eltern Gunter und Gitta, für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, sowie Georg, für seine Hilfe und den Rückhalt, auch aus dem tiefen Bayern.



# LEBENS LAUF

## Heike Doris Lenz

---

Geburtsdatum und –ort	28.03.1981 in Stuttgart-Bad Cannstatt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

## Schulbildung

---

1987-1991	Albschule Stuttgart-Degerloch
1991-1992	Wilhelmsgymnasium Stuttgart
1992-2000	Lessing Gymnasium Winnenden Abschluss der allgemeinen Hochschulreife im neusprachlichen Zweig

## Hochschulbildung

---

2000-2005	Studium der Biologie an der Friedrich Hecker Universität Konstanz mit den Schwerpunkten Biochemie, Limnologische Mikrobiologie, Molekulare Genetik, Pflanzenphysiologie und Phytopathologie Mündliche Diplomprüfungen in der Phytopathologie und Biochemie
01/2005-10/2005	Diplomarbeit bei Prof. Dr. K. Mendgen am Lehrstuhl für Phytopathologie an der Friedrich Hecker Universität Konstanz Titel der Arbeit: „Transformation von <i>Uromyces fabae</i> “
Seit 03/2006	Promotion bei Prof. Dr. T. Nürnberger am Institut für Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen Titel der Arbeit: „Die Rolle Autophagie-assoziiierter Proteine in der pflanzlichen Immunantwort“