

**Molekulare und funktionelle Analyse
der pathogenresponsiven Rezeptorkinase DRK3
aus *Arabidopsis thaliana***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von

Sandra Postel

Tag der mündlichen Prüfung:

11. Mai 2010

Dekan:

Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Georg Felix

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Pflanzliche Pathogenabwehr	1
1.1.1	Pathogeninduzierte Immunität (<i>pathogen-triggered immunity</i> , PTI)	2
1.1.2	Effektorinduzierte Suszeptibilität (<i>effector-triggered susceptibility</i> , ETS)	4
1.1.3	Effektorinduzierte Immunität (<i>effector-triggered immunity</i> , ETI)	5
1.1.4	Erworbene Resistenz	6
1.2	Perzeptionssysteme für die Erkennung von Pathogenen	7
1.3	Reaktionen auf zellulärer Ebene.....	10
1.4	Rezeptorähnliche Kinasen (RLKs).....	12
1.5	Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	14
2.1.2	Nährmedien.....	14
2.1.3	Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen.....	16
2.1.4	Verwendete Plasmide	17
2.1.5	Verwendetes Pflanzenmaterial	18
2.2	Anzuchtbedingungen	18
2.2.1	Anzucht von <i>E.coli</i>	18
2.2.2	Anzucht von <i>Pseudomonas spp.</i>	18
2.2.3	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	19
2.2.4	Anzucht von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2.2.5	Anzucht von <i>Alternaria brassicicola</i> und <i>Botrytis cinerea</i>	19
2.2.6	Anzucht von <i>A.thaliana</i> Zellkulturen	19
2.2.7	Anzucht der Versuchspflanzen	19
2.3	Transformationen	20
2.3.1	Transformation von <i>E.coli</i>	20
2.3.2	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	20
2.3.3	Transformation von <i>A. thaliana</i> Protoplasten.....	20
2.3.4	Transformation von <i>A. thaliana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.5	Transformation von <i>N.benthamiana</i> mittels <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	21
2.3.6	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
2.3.7	Hefe-Paarung	22
2.4	DNA-Analytik	23
2.4.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Arabidopsis</i> Pflanzen.....	23
2.4.2	Plasmid-Präparation aus <i>E.coli</i> DH5 α	23
2.4.2.1	Plasmid-Minipräparation aus DH5 α -Zellen mittels alkalischer Lyse	23
2.4.2.2	Plasmid-Minipräparation mittels <i>QIAprep spin Miniprep kit</i> (QIAGEN).....	24
2.4.2.3	Plasmid-Midipräparation mittels <i>QIAGEN Tip 100 Midiprep kit</i>	24
2.4.2.4	Plasmid-Minipräparation aus <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
2.4.2.5	Plasmid-Minipräparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.4.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in Lösung.....	25
2.4.4	Restriktion.....	25
2.4.5	Ligation.....	25
2.4.6	Fällung von DNA mit Ethanol.....	25
2.4.7	Klonierung mit der Gateway®-Klonierungstechnologie	25
2.4.8	Klonierungsstrategien	26
2.4.8.1	Klonierung der Vektoren für BiFC.....	26
2.4.8.2	Klonierung verschiedener Konstrukte zur Pflanzentransformation	27
2.4.9	Polymerasekettenreaktion - PCR	27
2.4.9.1	PCR auf cDNA	28
2.4.9.2	Genotypisierung	28
2.4.9.3	Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.4.10	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	29
2.4.11	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	29

2.4.12	Herstellung radioaktiv markierter Sonden.....	29
2.4.13	Southern-blot	30
2.4.14	Herstellung einer cDNA-Bibliothek	30
2.4.15	Sequenzierung von DNA.....	31
2.4.16	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung.....	31
2.5	RNA-Analytik	31
2.5.1	Isolierung von RNA aus Blattmaterial.....	31
2.5.2	DNaseI-Verdau isolierter RNA	31
2.5.3	Reverse Transkription.....	32
2.5.4	RNA-Agarosegel	32
2.5.5	Northern blot.....	32
2.5.6	Dot-Blot.....	33
2.6	Protein-Analytik.....	33
2.6.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	33
2.6.2	Zellaufschluss	33
2.6.2.1	Zellaufschluss von BL21AI™-Zellen	33
2.6.2.2	Zellaufschluss von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.6.2.3	Zellaufschluss von <i>A. thaliana</i> Protoplasten	34
2.6.3	Proteinaufreinigung von GST-Fusionsproteinen	34
2.6.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	34
2.6.5	Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	34
2.6.6	Proteinfärbung mit Coomassie Brillant Blau R-250.....	35
2.6.7	Western-Blot.....	35
2.6.8	Kinaseaktivitätstest	36
2.6.9	Suche nach Interaktionspartnern mittels des Hefe-Dihybrid-Systems	36
2.6.10	Gerichtete Hefe-Dihybrid-Experimente	38
2.6.11	Lasergestützte Konfokalmikroskopie	39
2.6.12	Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC).....	39
2.6.13	Co-Immunopräzipitation aus transient transformierten <i>N. benthamiana</i> -Pflanzen	39
2.7	Phänotypische Pflanzenversuche	40
2.7.1	Analyse des Expressionsmusters des <i>DRK3</i> -Gens in <i>Arabidopsis</i>	40
2.7.2	Infektionsstudien mit verschiedenen Pathogenen.....	41
2.7.2.1	Bakterienwachstum <i>in planta</i>	41
2.7.2.2	Pilzwachstum <i>in planta</i>	41
2.7.3	3,3'-Diaminobenzidin (DAB) - Färbung	42
2.7.4	Trypanblau-Färbung	42
2.7.5	Bestimmung des Hormongehaltes in <i>Arabidopsis</i>	42
2.7.6	Statistische Auswertung.....	43
2.8	Datenbankanalysen.....	43
3	Ergebnisse	44
3.1	Expressionsmuster des <i>DRK3</i> -Gens	44
3.1.1	Aktivierung der Expression des <i>DRK3</i> -Gens durch Pathogene und Elizitoren.....	44
3.1.2	Expression des <i>DRK3</i> -Gens nach Hormonbehandlung und abiotischem Stress.....	46
3.2	Manipulation der Expression des <i>DRK3</i> -Gens in <i>Arabidopsis</i>	47
3.2.1	Analyse der T-DNA-Insertionslinie (<i>drk3-1</i>)	48
3.2.1.1	Genotypisierung der <i>drk3-1</i>	48
3.2.1.2	<i>DRK3</i> -Transkript in der <i>drk3-1</i>	48
3.2.1.3	Zahl der T-DNA-Insertionen.....	49
3.2.2	Komplementation der <i>drk3-1</i>	50
3.2.3	<i>DRK3</i> -RNA-Interferenz- und <i>DRK3-sense</i> -Pflanzen	51
3.3	Phänotypische Analyse der <i>DRK3</i> -expressionsveränderten Linien	52
3.3.1	Wachstum verschiedener Pathogene <i>in planta</i>	52
3.3.2	Weitere Effekte in <i>drk3-1</i> -Pflanzen nach Infektion mit <i>Pto</i> DC3000	56
3.4	Struktur und modularer Aufbau des <i>DRK3</i> -Proteins	57
3.4.1	Lokalisation des <i>DRK3</i> -Proteins in <i>Arabidopsis</i> Protoplasten.....	58
3.4.2	Kinaseaktivität des <i>DRK3</i> -Proteins	60

3.4.3	Sequenzvergleich verschiedener Kinasedomänen	60
3.4.4	Interaktionsstudien der verschiedenen Domänen des DRK3-Proteins	62
3.5	DRK3-verwandte Proteine	63
3.5.1	Sequenzvergleich der nächsten Homologen mit der DRK3	63
3.5.2	Expression des <i>HOM1</i> -Gens.....	63
3.5.3	T-DNA-Insertionslinien in <i>HOM1</i>	64
3.5.4	Wachstum von <i>Pseudomonaden in planta</i>	64
3.6	Identifizierung möglicher Interaktionspartner des DRK3-Proteins.....	65
3.6.1	Herstellung einer neuen cDNA-Bibliothek.....	65
3.6.2	Identifizierung möglicher Interaktionspartner	65
3.7	<i>Resistance to Leptosphaeria maculans 3 (RLM3)</i>	69
4	Diskussion	72
4.1	Expressionsmuster des <i>DRK3</i> -Gens	72
4.2	Effekte veränderter <i>DRK3</i> -Expressionslevel.....	74
4.3	Molekulare Eigenschaften des DRK3-Proteins.....	77
4.4	Das nächste Homologe des DRK3-Proteins.....	81
4.5	Interaktorstudien.....	82
4.6	Mögliche Funktionen des DRK3-Proteins	84
5	Zusammenfassung.....	86
6	Literaturverzeichnis.....	87
7	Anhang	A
7.1	Verwendete Primer.....	A
7.2	Sequenz des <i>DRK3</i> -Gens mit Lokalisation der T-DNA-Insertion und Genotypisierungs-Primern	C
7.3	Sequenz des <i>DRK3</i> -Gens mit RT-PCR-Primern	D
7.4	Hygromycin-Sonde für Southern-blot-Analysen	E
7.5	Sequenz des <i>DRK3</i> -Gens mit zur Klonierung von RNAi- und <i>sense</i> -Sequenzabschnitten benutzten Primern.....	F
7.6	Zu Komplementationsstudien kloniertes genomisches Fragment des <i>DRK3</i> -Gens	G
7.7	Sequenz des <i>HOM1</i> -Gens mit Lokalisation der T-DNA-Insertionen und Primer.....	H
7.8	Sequenz der putativen Myristoylierungsstelle im DRK3-Protein	I
7.9	<i>Microarray</i> -Daten der Expression des <i>DRK3</i> -Gens.....	J
7.10	<i>Microarray</i> -Daten der Expression des <i>HOM1</i> -Gens.....	L

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	NBS	Nukleotid-Bindestelle
Abb.	Abbildung	NO	Stickstoffmonoxid
ACC	1-Amino-Cyclopropan-1-Carboxyl-Säure	OD	optische Dichte
ATP	Adenosintriphosphat	ovx	Überexpression
Avr	Avirulenz	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
bzw.	beziehungsweise	PCI	Phenol:Chloroform:
C	Cytosin		Isoamylalkohol (25:24:1)
CC	<i>coiled-coil</i>	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	komplementäre DNA	PEG	Polyethylenglykol
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Columbia-0	PR	<i>pathogenesis-related</i>
d.h.	das heißt	<i>Pph</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	<i>Pto</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
DNase	Desoxyribonuklease		pathovar
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	pv.	Umdrehungen pro Minute
DRK	abwehrrelevante Rezeptorkinase	Upm	R
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	R	Resistenz
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraazetat	RFP	rotfluoreszierendes Protein
EF1 α	Elongationsfaktor 1 α	RL(C)K	rezeptorähnliche (zytoplasmatische) Kinase
GFP	grünfluoreszierendes Protein	RNA	Ribonukleinsäure
<i>et al.</i>	und andere	RNase	Ribonuklease
g	Erdbeschleunigung	RNAi	RNA Interferenz
G	Guanin	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
GAL4AD	GAL4-Aktivierungsdomäne	RT	Raumtemperatur
GAL4BD	GAL4-DNA-Bindedomäne	RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
GST	Glutathion-S-Transferase	SA	Salizylat
h	Stunde	SAR	systemisch erworbene Resistenz
H ₂ O _{dd}	Milli-Q-Reinstwasser	SD	<i>synthetic dropout medium</i>
HR	hypersensitive Reaktion	SD-HALW	SD ohne Histidin, Adenin, Leuzin, Tryptophan
hrc	hrp und konserviert	SD-LW	SD ohne Leuzin, Tryptophan
hrp	HR und Pathogenität	SDS	Natriumdodezylsulfat
HRP	Meerrettich-Peroxidase	SD-W	SD ohne Tryptophan
ISR	induzierte systemische Resistenz	s. Kap.	siehe Kapitel
JA	Jasmonat	t	Zeit
KBE	koloniebildende Einheit	T	Thymin
KD	Kinasedomäne	T _{anneal}	Anlagerungstemperatur
kDa	kilo Dalton	TLR	TOLL-ähnlicher Rezeptor
KO	<i>knockout</i>	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
LB	Lennox Medium	U	Einheit (<i>unit</i>)
LPS	Lipopolysaccharid	UV	ultraviolett
LRR	leuzinreiche Wiederholung	VIB	<i>Flanders Interuniversity Institute for Biotechnology</i>
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>	Vol.	Volumen
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	v/v	Volumen pro Volumen
MeJA	Methyljasmonat	WT	Wildtyp
Min.	Minute	w/v	Masse pro Volumen
mRNA	<i>messenger RNA</i>	z.B.	zum Beispiel
MS	Murashige und Skoog		
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Centre</i>		

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

1 Einleitung

Pflanzliche Produkte sind neben tierischen Lebensmitteln eine wichtige Grundlage der menschlichen Ernährung und finden außerdem als Heilmittel einen weit verbreiteten Einsatz. Um den menschlichen Bedarf an pflanzlichen Nahrungs- und Arzneimitteln zu decken, werden Pflanzen in großem Maßstab angebaut. Hierbei werden oft Monokulturen gepflanzt, die besonders anfällig gegenüber dem Befall mit spezifischen Pathogenen sind. So hatte z.B. in Irland eine Infektion von Kartoffeln mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule, 1845-1849 starke Ernteaussfälle zur Folge, die eine katastrophale Hungersnot hervorgerufen haben (Ristaino, 2002).

Pflanzen sind dem Angriff von Pathogenen jedoch nicht wehrlos ausgesetzt, sondern zeigen erstaunlicherweise Resistenz gegen eine Vielzahl möglicher Pathogene. Denn um sich gegen Pathogene verteidigen zu können, besitzen pflanzliche Organismen wie auch tierische Lebewesen ein Immunsystem. Auf den ersten Blick unterscheiden sich diese Systeme maßgeblich, da Pflanzen im Gegensatz zu Tieren sessile Organismen sind, die außerdem keine Blutbahn und keine spezialisierten Immunabwehrzellen und demnach auch kein adaptives Immunsystem besitzen. Deshalb ist in Pflanzen jede einzelne Zelle in der Lage potentielle Pathogene zu erkennen und Abwehrreaktionen auszulösen, damit eine Infektion verhindert oder eingedämmt werden kann. Erstaunlicherweise ähneln sich die Immunabwehrreaktionen des angeborenen Immunsystems der Säuger und von *Drosophila melanogaster* und das pflanzliche Immunsystem sowohl konzeptionell als auch teilweise in den molekularen Mechanismen (Nürnberger *et al.*, 2004).

Die Erforschung der genauen Wirkmechanismen der pflanzlichen Abwehrreaktionen ist Gegenstand vieler wissenschaftlicher Arbeiten und ermöglicht interessante Einblicke in die Wechselwirkungen von Pathogenen und Pflanzen.

1.1 Pflanzliche Pathogenabwehr

Die Immunabwehr der Pflanzen wird in verschiedene Ebenen unterteilt. Man unterscheidet konstitutiv vorhandene Barrieren und induzierbare Mechanismen (Nürnberger und Lipka, 2005; Ingle *et al.*, 2006).

Zu den konstitutiv aktiven Schutzmechanismen zählen z.B. das Vorhandensein einer Kutikula und einer Zellwand, die den Pathogenen den Zugang zu den Pflanzenzellen erschweren (Ride, 1983). Außerdem werden bestimmte Sekundärmetabolite, sogenannte Phytoantizipine, als inaktive Vorstufen in der Vakuole gelagert und bei Schädigung des Gewebes freigesetzt. Ihre antimikrobielle Wirkung wird durch Modifikation aktiviert (Elstner *et al.*, 1996; Osbourn, 1996).

Zusätzlich zu den genannten Barrieren gibt es verschiedene durch Pathogene induzierbare Abwehrmechanismen. Diese Reaktionen sind nicht konstitutiv aktiv, da ein erhöhter Abwehrzustand der Pflanze negative Auswirkungen auf die Biomasse und Saatgutproduktion der Pflanze hat (Pieterse *et al.*, 2009).

Die unterschiedlichen Phasen der induzierbaren pflanzlichen Pathogenabwehr und die entsprechenden Anpassungen der Pathogene wurden von Jones und Dangl, 2006 in drei verschiedene Stufen eingeteilt und in einem Zick-Zack-Modell dargestellt (s. Abb. 1.1). Die Stufen werden als *pathogen-triggered immunity* (PTI), *effector-triggered susceptibility* (ETS) und als *effector-triggered immunity* (ETI) bezeichnet (Jones und Dangl, 2006). Dieses Modell bezieht sich jedoch nur auf biotrophe und hemibiotrophe Pathogene.

Zudem werden in von der Infektionsstelle weiter entfernten Geweben Zustände erhöhter Alarmbereitschaft induziert. Dies wird als erworbene Resistenz bezeichnet und ermöglicht eine erhöhte Resistenz im Falle von Sekundärinfektionen (s. Kap. 1.1.4)

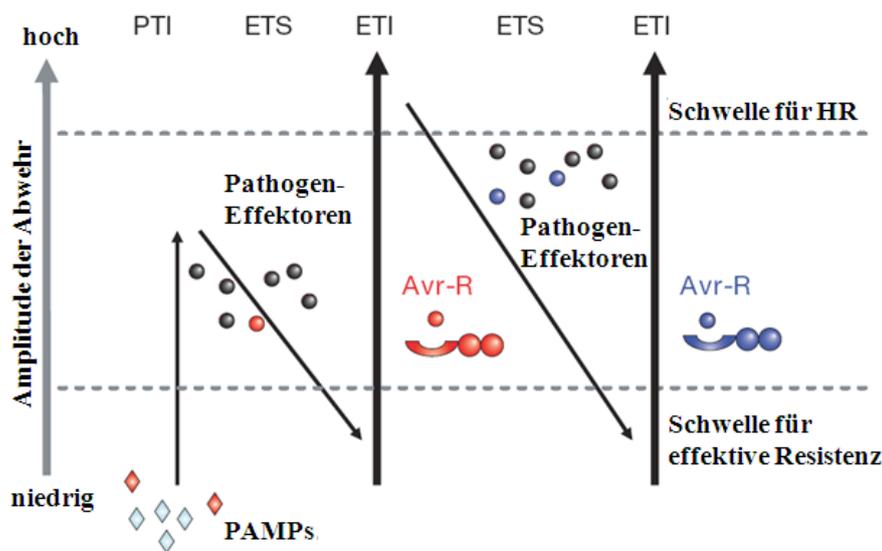


Abbildung 1-1 Zick-Zack-Modell der pflanzlichen Abwehr nach Jones und Dangl, 2006

1.1.1 Pathogeninduzierte Immunität (*pathogen-triggered immunity*, PTI)

Im Allgemeinen sind Pflanzen gegen die meisten Pathogene resistent. Dieses Phänomen wurde früher auch als Basisresistenz oder Nichtwirtsresistenz bezeichnet und definierte Pflanze-Pathogen-Interaktionen, die eine Parasitierung aller Kultivare einer Pflanzenspezies durch alle Rassen eines Pathogens ausschließen (Prell, 1996; Mysore und Ryu, 2004; Nürnberger und Lipka, 2005). Hierfür ist neben den oben erwähnten konstitutiven Barrieren die pathogeninduzierte Immunität (PTI) verantwortlich. Die PTI ist dadurch gekennzeichnet, dass konservierte mikrobielle Strukturen von pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren (*pattern-recognition receptors*, PRRs) erkannt und Abwehrreaktionen induziert werden, durch die eine Ausbreitung des Pathogens eingedämmt werden kann (Jones und Dangl, 2006). Diese Abwehrreaktionen sind in Kapitel 1.3 genauer beschrieben.

Es zeigen sich Ähnlichkeiten zum angeborenen Immunsystem von Säugetieren. Hierbei erfolgt die Erkennung mikrobieller Pathogene durch keimbahnkodierte Rezeptoren (Medzhitov und Janeway, 1997), die in den ersten Stunden nach einer Infektion Entzündungsreaktionen auslösen (Hoffmann *et al.*, 1999). Es werden in erster Linie bestimmte konservierte Strukturen der Pathogene erkannt, die als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet wurden. Hierunter versteht man Substanzen, die spezifisch für Mikroorganismen sind und im Wirt nicht

vorkommen, die konservierte oberflächenexponierte Strukturen bilden und notwendig für das Überleben des Pathogens sind (Medzhitov und Janeway, 1997; Medzhitov und Janeway, 2000). Zu diesen Verbindungen zählen beispielsweise LPS und Flagellin. Manche dieser Strukturen werden auch von pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren gebunden. Sie wurden in der pflanzlichen Immunforschung anfangs als Elizitoren bezeichnet. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Elizitoren die gleichen Eigenschaften besitzen wie PAMPs (Brunner *et al.*, 2002; Gomez-Gomez und Boller, 2002; Nürnberger und Brunner, 2002; Parker, 2003). Somit wurde der Begriff PAMP auch auf das pflanzliche Immunabwehrsystem ausgeweitet. Mittlerweile wurde der Begriff PAMP durch MAMP (*microbe-associated molecular pattern*) ersetzt, da diese konservierten Strukturen auch in nicht-pathogenen Mikroorganismen vorkommen können (Mackey und McFall, 2006).

Das bestuntersuchtete Beispiel der pflanzlichen MAMP-Erkennung ist die durch den Flagellinrezeptor *flagellin sensing 2* (FLS2) vermittelte Perzeption von Flg22, einer konservierten Peptidsequenz aus bakteriellem Flagellin. Die Erkennung des Liganden durch den Rezeptor löst Immunreaktionen aus, die zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pseudomonas syringae* führt (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Gomez-Gomez und Boller, 2002; Zipfel *et al.*, 2004). Die Erkennung von Flg22 durch FLS2 ist in allen Klassen höherer Pflanzen konserviert (Boller und Felix, 2009). Ein weiteres Beispiel für ein proteinogenes MAMP ist das N-azetylierte Fragment Elf18, das aus 18 Aminosäuren des bakteriellen *Elongationsfaktors*-Tu (EF-Tu) besteht. Elf18 löst nach Erkennung durch den Mustererkennungsrezeptor EFR Immunabwehrreaktionen aus (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Ebenso besitzt eine aus 15 Aminosäuren bestehende Nukleotidbindedomäne aus dem Kälteschockprotein CSP von grampositiven Bakterien in Tabak MAMP-Aktivität (Felix und Boller, 2003). Auch das nekroseinduzierende *Nep1-like protein* aus *Phytophthora* (NLP_{pp}) (Fellbrich *et al.*, 2002) und ein konservierter Bereich aus Transglutaminasen, Pep-13, von *Phytophthora* (Nürnberger *et al.*, 1994), konnten in Petersilie, und NLP_{pp} zusätzlich in *Arabidopsis*, bestimmte Abwehrreaktionen aktivieren.

Es wurden auch MAMPs identifiziert, die keine Proteine sind, sondern zu anderen strukturellen Klassen gehören. So lösen z.B. pilzliches Chitin und Ergosterol in Tomatenzellen Pathogenabwehrreaktion aus (Baureithel *et al.*, 1994; Granada *et al.*, 1995). Für Peptidoglykane von *Staphylococcus aureus* wurde gezeigt, dass sie in *Arabidopsis* Abwehrreaktionen induzieren (Gust *et al.*, 2007). Auch das Lipopolysaccharid, das ein Membranbestandteil gram-negativer Bakterien ist, besitzt MAMP-Aktivität (Newman *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2001; Newman *et al.*, 2002; Erbs und Newman, 2003). Nur in wenigen Fällen ist für die genannten MAMPs der entsprechende Mustererkennungsrezeptor bekannt. Die bisher identifizierten Rezeptoren werden in Kap. 1.2 detailliert behandelt.

Auch pflanzeneigene Strukturen, sogenannte Gefahren-Signale (*danger-associated molecular patterns*, DAMPs) können Abwehrreaktionen auslösen. Diese DAMPs werden bei Pathogenbefall z. B. aus der Zellwand freigesetzt und sind ein Warnsignal für den Angriff eines Pathogens. So induzieren z.B. pflanzliche *Oligogalacturonide* (OGAs) die Akkumulation von

Phytoalexinen und die Ethylenproduktion in Pflanzen (D'Ovidio *et al.*, 2004). Die Rezeptorkinase WAK1 bindet Pektin und ist möglicherweise Bestandteil des Erkennungssystems für OGAs (Boller und Felix, 2009). Es wurde auch gezeigt, dass AtPep1, ein bei Verwundung freigesetztes Peptid, durch den Rezeptor AtPepR1 erkannt wird und neben der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies eine Alkalisierung des Mediums in *Arabidopsis* auslöst (Huffaker *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006).

Es gibt Pathogene, die trotz dieser pflanzlichen Basisresistenz erfolgreich bestimmte Pflanzen besiedeln können. Dies ist darauf zurückzuführen, dass Pathogene bestimmte Strategien entwickelt haben, um Abwehrreaktionen der PTI unterdrücken zu können.

1.1.2 Effektorinduzierte Suszeptibilität (*effector-triggered susceptibility*, ETS)

Effektorinduzierte Suszeptibilität (ETS) wurde früher auch als kompatible Interaktion oder Basiskompatibilität bezeichnet (Espinosa und Alfano, 2004). In diesem Fall sind einige Pathogene einer Spezies in der Lage ihre Wirtspflanzen erfolgreich zu besiedeln, indem sie bestimmte Virulenzfaktoren in die Pflanzenzelle injizieren und dadurch die PTI des Wirtes unterdrücken (Göhre und Robatzek, 2008).

Gram-negative Bakterien können mittels eines sogenannten Typ-III-Sekretionssystems Effektoren in die Wirtszelle translozieren. Dieses System ist auch in Humanpathogenen wie *Yersinia spp.* zu finden. Der Grundaufbau der Typ-III-Sekretionssysteme gleicht dem Flagellen-Basalkörper (Tampakaki *et al.*, 2004). Das System besteht entweder aus einer Nadel (*Yersinia*) oder einem Hrp-Pilus (*Pseudomonaden*) und einer in der Plasmamembran verankerten Basis. Das Typ-III-Sekretionssystem von *Pseudomonas* wird in „*hypersensitive response and pathogenicity*“ (*hrp*)-*Clustern* kodiert (Alfano und Collmer, 1996; Bogdanove *et al.*, 1996; Galan und Collmer, 1999). Zu den Proteinen, die sekretiert werden, gehören *hrp outer proteins* (Hop) und *Avirulenz-* (Avr-) Proteine, die in der Regel in sogenannten Pathogenitätsinseln kodiert werden (Büttner und Bonas, 2002). Diese Effektoren werden dann, vermutlich ATP-abhängig, in die Pflanzenzelle injiziert (Hueck, 1998). Die bisher entdeckten Avr-Gene zeigen wenig Homologie zueinander (Bonas und Lahaye, 2002), so dass man davon ausgehen kann, dass sie durch verschiedene Mechanismen die unterschiedlichen Ebenen der pflanzlichen Immunabwehr beeinflussen können (Göhre und Robatzek, 2008).

Für einige Effektoren ist bekannt, wie sie die Wirtsabwehr modulieren (Göhre und Robatzek, 2008; Cui *et al.*, 2009). Hierzu zählen z.B. AvrPto und AvrPtoB aus *Pseudomonas*. Für AvrPto konnte *in vitro* und in Protoplasten gezeigt werden, dass es an die Kinasedomäne pflanzlicher Mustererkennungsrezeptoren wie FLS2 und EFR bindet, deren autophosphorylierende Kinaseaktivität hemmt und damit die Signaltransduktion der PTI unterdrückt wird (Xiang *et al.*, 2008). Außerdem ist AvrPto in der Lage den Korezeptor von FLS2, *BRI1-associated kinase 1* (BAK1), zu binden (Shan *et al.*, 2008). Der C-Terminus von AvrPtoB besitzt Ubiquitin E3-Ligase Aktivität. Durch Interaktion mit der Kinasedomäne von FLS2 wird dieses ubiquitinyliert und dessen Abbau induziert, wodurch wiederum die PTI gestört wird (Göhre *et al.*, 2008). Auch der putative Chitinrezeptor CERK1 aus *Arabidopsis* wird von AvrPtoB ubiquitinyliert und dadurch der Abbau dieses Rezeptors induziert (Gimenez-Ibanez *et al.*, 2009). Für den

Xanthomonas campestris Effektor XopN konnte gezeigt werden, dass er PTI in Tomate und *Arabidopsis* hemmen kann (Kim *et al.*, 2009).

Evolutionär bedingt haben Pflanzen wiederum bestimmte Mechanismen entwickelt, die es ermöglichen bakterielle Effektoren oder ihre Auswirkungen zu detektieren und eine weitere Stufe der Immunabwehr auszulösen, um eine Ausbreitung des Pathogens zu verhindern.

1.1.3 Effektorinduzierte Immunität (*effector-triggered immunity, ETI*)

Einige Kultivare bestimmter Pflanzenspezies sind in der Lage die Effektoren der Pathogene direkt oder indirekt wahrzunehmen. Dadurch wird eine weitere Stufe pflanzlicher Abwehrreaktionen, die effektorinduzierte Immunität (ETI), aktiviert, um einen Befall durch das Pathogen zu unterbinden. Dies wurde ursprünglich auch als wirtsspezifische Resistenz bezeichnet (Prell, 1996; Dangl und Jones, 2001). Die ausgelösten Abwehrreaktionen sind schneller und stärker als Reaktionen der PTI und können in lokalem Zelltod gipfeln (hypersensitive Reaktion, HR) (Greenberg, 1997). Ausgelöst wird die ETI durch das Vorhandensein eines Avirulenz- (Avr-) Faktors des Pathogens, auch Effektor genannt, und eines entsprechenden Produktes eines Resistenz- (R-) Gens der Pflanze, womit der Avr-Faktor detektiert werden kann. Nur wenn die beiden Gen-Produkte vorhanden sind, wird die ETI ausgelöst. Dies wurde von Flor als Gen-für-Gen-Hypothese definiert (Flor, 1956; Flor, 1971). Im Gegensatz zu den strukturell sehr unterschiedlichen Avr-Proteinen, zählen R-Proteine oftmals zur Klasse der NBS-LRR-Proteine (s. Kap. 1.2).

In einigen Fällen konnte eine direkte Interaktion von Avr- mit R-Proteinen gezeigt werden. So interagiert z.B. der Avr-Faktor AvrL des Flachs-Rostpilzes mit dem entsprechenden Resistenzprotein L von Flachs in Hefe (Dodds *et al.*, 2006). Außerdem konnte eine Interaktion von RRS1-R, einem R-Protein, das Resistenz gegen einige Stämme von *Ralstonia* vermittelt, mit dem PopP2-Effektor von *Ralstonia solanacearum* nachgewiesen werden (Deslandes *et al.*, 2003). Avr-Pita aus dem reispflichtigen Pilz *Magnaporthe grisea* interagiert mit Pi-ta aus Reis (Jia *et al.*, 2000).

Es gibt Beispiele der ETI für die keine direkte Interaktion eines Avr-Proteins mit einem Resistenzprotein gezeigt werden konnte. Diese Fälle werden mit der *Guard*-Hypothese (van der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001; van der Hoorn *et al.*, 2002) erklärt: Das Effektorprotein (Avr-Faktor) wirkt als Virulenztarget auf ein bestimmtes Wirtsprotein, so dass dieses zu Gunsten des Pathogens manipuliert wird. Die Veränderung dieses Wirtsproteins kann durch bestimmte Resistenzproteine (Wächter) detektiert werden und resultiert in der Aktivierung von Abwehrreaktionen der ETI.

Die beiden nicht verwandten *Pseudomonas*-Effektoren AvrPto und AvrPtoB interagieren z.B. mit der zytoplasmatischen Kinase Pto aus Tomate (Kim *et al.*, 2002). Diese Interaktion wird durch das pflanzliche NB-LRR-Protein Prf wahrgenommen und ETI-spezifische Abwehrreaktionen ausgelöst (Wu *et al.*, 2004; Abramovitch und Martin, 2005; Mucyn *et al.*, 2006).

RPM1-interacting protein 4, RIN4, ist ein acyliertes und plasmamembranassoziiertes Protein in *Arabidopsis*, das als negativer Regulator von Reaktionen der PTI bekannt ist (Kim *et al.*, 2005;

Liu *et al.*, 2009). Es wird von den Avirulenzfaktoren *avrRpm1*, *avrB* und *avrRpt2* aus *Pseudomonas syringae* manipuliert (Mackey *et al.*, 2002; Axtell *et al.*, 2003). Dieser Angriff wird von verschiedenen R-Genen überwacht. Die durch Myristoylierung an der Membran lokalisierten Effektoren *avrRpm1* und *avrB* interagieren mit RIN4 und induzieren dessen Phosphorylierung (Mackey *et al.*, 2002). Dies wird durch ein myristoyliertes, an der Membran lokalisiertes R-Protein, RPM1, registriert (Boyes *et al.*, 1998). *AvrRpt2* ist eine Cysteinprotease (Axtell *et al.*, 2003), die RIN4 an zwei Stellen schneidet und es damit eliminiert (Mackey *et al.*, 2002; Chisholm *et al.*, 2005). Dies aktiviert wiederum ein weiteres R-Protein, RPS2 (Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003). Signaltransduktionen, die über RPM1 und RPS2 aktiviert werden, benötigen auch das Protein *non-race-specific disease resistance 1*, NDR1, welches mit RIN4 interagiert (Day *et al.*, 2006). RIN4 wird demnach von zwei R-Genen überwacht und ist Angriffspunkt dreier bekannter Avr-Faktoren.

Auch im Falle von Pilzinfektionen wurden R-Proteine und entsprechende Avr-Faktoren identifiziert. Das R-Protein Cf-2 aus Tomate überwacht die pflanzliche, sekretierte Cysteinprotease Rcr3. Diese ist das Target des Avirulenzfaktors *Avr2* aus *Cladosporium fulvum* (Rooney *et al.*, 2005). Für die R-Proteine RLM1 und RLM2 wurde gezeigt, dass sie Resistenz gegenüber dem hemibiotrophen Pilz *Leptosphaeria maculans* vermitteln (Staal *et al.*, 2006).

Die nächste Stufe des Modells nach PTI, ETS und ETI beschreibt die Entwicklung weiterer Faktoren der Pathogene, um die ETI zu unterdrücken. Hierzu zählt z.B. der Effektor *AvrPphC* aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Dieser unterdrückt in einigen Kultivaren von Bohne die ETI, die durch *AvrPphF* induziert wird. Im Gegenzug haben auch hier die Pflanzen wieder Erkennungsmechanismen entwickelt, so dass *AvrPphC* auch wiederum selbst ein Avr-Faktor auf anderen Bohne-Kultivaren ist (Tsiamis *et al.*, 2000). Demnach besteht ein ewiger Wettbewerb zwischen Pflanze und Pathogen (Jones und Dangl, 2006). Der Ausgang dieses Kampfes hängt davon ab, ob die Fähigkeit des Pathogens die PTI oder ETI zu unterdrücken oder die Möglichkeiten der Pflanze die Pathogene zu erkennen und effiziente Immunabwehrreaktionen auszulösen überwiegt (Pieterse *et al.*, 2009).

1.1.4 Erworbene Resistenz

Zusätzlich zu den Abwehrreaktionen der PTI und der ETI ist die Pflanze auch in der Lage einen Zustand erhöhter Alarmbereitschaft in nicht direkt infiziertem Gewebe zu aktivieren und damit Sekundärinfektionen zu unterdrücken. Das Phänomen der erworbenen Resistenz wurde von Ross erstmals 1961 beschrieben. Nach Infektion von Tabak mit dem Tabak-Mosaik-Virus und anschließender Behandlung mit verschiedenen viralen Pathogenen zeigte sich eine erhöhte Resistenz gegen die Sekundärinfektionen in von der Primärinfektion entferntem Gewebe. Er nannte das Phänomen *local acquired resistance* (LAR), wenn die Resistenz in der Nähe der primären Infektionsstelle auftrat. Als *systemic acquired resistance* (SAR) bezeichnete er sekundäre Resistenzen, die in zur primären Infektionsstelle weiter entfernten Geweben ausgelöst wurden (Ross, 1961a; Ross, 1961b). Die SAR kann sowohl durch PTI als auch ETI induziert werden (Pieterse *et al.*, 2009). Sie ist ein salizylat- (SA-) abhängiger Prozess und es zeigt sich ein erhöhter Salizylat-Gehalt sowohl an der Infektionsstelle als auch in entferntem Gewebe (Malamy

et al., 1990; Métraux *et al.*, 1990). Mutanten, wie *nahG*, in denen durch Expression einer Salizylat-Hydroxylase Salizylat nicht mehr akkumuliert werden kann, sind nicht fähig eine SAR zu entwickeln (Durrant und Dong, 2004). *Nonexpressor of PR-genes 1* (NPR1) ist als wichtiger Faktor bekannt, der in der SAR nach Aktivierung durch Salizylat *pathogenesis-related*- (PR-) Gene aktiviert (Dong, 2004). Zu diesen PR-Genen zählen in *Arabidopsis* *PR1*, *PR2* und *PR5* (Uknes *et al.*, 1992; Kinkema *et al.*, 2000). Es wurde eine erhöhte Konzentration an Azelainsäure im Phloemsaft von *Arabidopsis* detektiert, die ursächlich für eine erhöhte SA-Akkumulation in entferntem Gewebe zu sein scheint. Zudem ist eine Mutante des *azelaic acid induced 1* (*AZII*) – Gens nicht mehr in der Lage Reaktionen der SAR zu entwickeln. Deshalb wird auch Azelainsäure als mögliches mobiles Signal der SAR in *Arabidopsis* angesehen (Jung *et al.*, 2009). Als mobiles, über das Phloem transportiertes Signal, welches die SAR induzieren könnte, wird in Tabak Methylsalizylat gehandelt (Park *et al.*, 2007). Diese Substanz wird im SAR-Gewebe durch die Methylsalizylat-Esterase *salicylate binding protein 2*, *SABP2*, gebunden und SA freigesetzt (Kumar und Klessig, 2003; Forouhar *et al.*, 2005).

Nichtpathogene Wurzelbakterien, wie Rhizobakterien, induzieren die sogenannte *rhizobacteria-mediated induced systemic resistance* (ISR) (van Loon *et al.*, 1998). ISR ist abhängig von Jasmonat und Ethylen und führt zur Aktivierung des Pflanzendefensins *PDF1.2* (Penninckx *et al.*, 1996) und auch basischer PR-Gene wie *PR2* und *PR3* (Linthorst, 1991). Außerdem konnte auch hier eine Abhängigkeit von *NPR1* (Pieterse *et al.*, 1998) gezeigt werden. SAR ist im Allgemeinen gegen biotrophe Pathogene effektiv, während die ISR gegen nekrotrophe Pathogene und Insekten wirkt, deren Abwehr durch jasmonat- und ethylenabhängige Signaltransduktionen reguliert wird (Pieterse *et al.*, 2009).

1.2 Perzeptionssysteme für die Erkennung von Pathogenen

Um die verschiedenen Reaktionen des pflanzlichen Immunsystems auslösen zu können, müssen entweder MAMPs/DAMPs im Rahmen der PTI oder Effektoren der Pathogene im Falle der ETI erkannt werden (s. Kap. 1.1.1 und Kap. 1.1.3). Hierfür dienen den Pflanzenzellen, wie oben bereits erwähnt, verschiedene Rezeptoren bzw. Rezeptorsysteme. Bei der Erkennung von MAMPs/DAMPs bezeichnet man die Rezeptoren als Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) und die Erkennung mikrobieller Effektoren im Rahmen der ETI erfolgt über sogenannte Resistenzproteine (R-Proteine) (Jones und Dangl, 2006).

Pflanzen besitzen wahrscheinlich mehr PRRs als tierische Organismen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass den Pflanzen kein adaptives Immunsystem zur Verfügung steht. Die bekannten pflanzlichen PRRs weisen sehr unterschiedliche Strukturen auf (Boller und Felix, 2009; Postel und Kemmerling, 2009). So wird z.B. β -Glukan von Oomyceten in Sojabohne durch die extrazelluläre Glukanase, *β -glucan-binding protein* *GBP*, die an die Plasmamembran assoziiert ist, gebunden (Mithöfer *et al.*, 2000; Fliegmann *et al.*, 2004). Möglicherweise wird diese Glukanase dann von einem Rezeptorprotein erkannt (Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009). Die plasmamembranlokalisierten, rezeptorähnlichen Proteine (*receptor-like proteins*, RLPs) *EIX1/2* aus Tomate binden die ethyleninduzierende Xylanase *EIX* von *Trichoderma viride*,

einem Ascomyceten (Ron und Avni, 2004). CEBiP aus Reis ist ein Chitinbindeprotein, welches zu den LysM-RLPs zählt (Kaku *et al.*, 2006). In *Arabidopsis* wurde die LysM-rezeptorähnliche Kinase CERK1/LysM-RLK1 identifiziert, deren *knockout* chitininsensitiv ist (Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008). Eine Bindung von Chitin konnte jedoch nicht gezeigt werden. Spekulationen existieren dahingehend, dass ein CERK1-äquivalentes Protein in Reis und ein entsprechendes CEBiP-Protein in *Arabidopsis* existieren und somit ein Chitin-CEBiP-Komplex von CERK1 erkannt wird (Zipfel, 2008; Boller und Felix, 2009). Zu einer anderen Klasse membranlokalisierter Rezeptorproteine zählt der zuerst identifizierte, bereits erwähnte und sehr gut charakterisierte MAMP-Rezeptor *flagellin-sensing-2* (FLS2) (Gomez-Gomez und Boller, 2000). Dieses Protein ist eine leuzinreiche rezeptorähnliche Kinase (LRR-RLK, s.Kap. 1.4), die aus einer extrazellulären leuzinreichen (LRR-) Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Ser/Thr-Kinasedomäne aufgebaut ist (Gomez-Gomez und Boller, 2000).

Die LRR-RLKs FLS2 und der Elongationsfaktor-Tu-Rezeptor [EFR, (Zipfel *et al.*, 2006)] weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu Rezeptoren aus Säugern auf, die in immunabwehr- und entwicklungspezifische Reaktionen involviert sind. So besteht der in *Drosophila* identifizierte, membranlokalisierte Rezeptor TOLL aus einer extrazellulären LRR-, einer Transmembran- und einer intrazellulären *TOLL/Interleukin-1 receptor like-* (TIR-) Domäne. Bei Bindung des prozessierten Proteins Spätzle an die LRR-Domäne wird der Rezeptor aktiviert und die Bildung antifungaler und antibakterieller Peptide induziert (Ip *et al.*, 1993; de Gregorio *et al.*, 2001; Irving *et al.*, 2001). Über die TIR-Domäne des Rezeptors wird nach Aktivierung eine Komplexbildung mit den Proteinen *Drosophila myeloid differentiation factor* (dMyD88), Tube und der zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase Pelle vermittelt (Medzhitov und Janeway, 2000; Hoffmann, 2003). Die *TOLL-like receptors* (TLRs) sind zu TOLL-homologe Rezeptoren aus Säugern und besitzen auch Funktionen in Immunreaktionen (Medzhitov *et al.*, 1997; Rock *et al.*, 1998; Aderem und Ulevitch, 2000). TLRs bestehen wie TOLL aus einer extrazellulären LRR-Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären TIR-Domäne und führen nach Erkennung verschiedener MAMPs zur Aktivierung von Abwehrreaktionen in Säugern (Takeda und Akira, 2005). TLR5 erkennt z.B. bakterielles Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001) und TLR4 detektiert an das *LPS-Bindeprotein*, LBP, gebundenes LPS (Takeda und Akira, 2003). Die Aktivierung der TLRs führt nach einer Assoziation mit dem Adapterprotein MyD88 und der zu Pelle homologen Kinase *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK) (Janssens und Beyaert, 2003) zur Induktion von Zytokinen und weiteren Stimulatoren des angeborenen Immunsystems. Pflanzliche Rezeptorkinasen wie FLS2 und EFR bilden zusammen mit den zytoplasmatischen Kinasen IRAK und Pelle aus Säugern eine monophyletische Gruppe (Shiu und Bleecker, 2001a).

Es bestehen jedoch auch einige signifikante Unterschiede in den Immunabwehrsystemen der verschiedenen Reiche. So sind z.B. die Kinasen IRAK und Pelle im Zytoplasma lokalisiert und werden erst nach Aktivierung des entsprechenden Rezeptors an die Membran rekrutiert und sind demnach kein Bestandteil des Rezeptormoleküls. Außerdem wird durch den Flagellinrezeptor TLR5 ein anderes Epitop des Flagellins erkannt, als im Falle der Bindung an den pflanzlichen Flagellinrezeptor FLS2 (Donnelly und Steiner, 2002). Dies lässt zusammen mit den geringen

Sequenzhomologien der LRR-Domänen von TLR5 und FLS2 darauf schließen, dass diese Formen der Nicht-Selbsterkennung sehr effizient sind und unabhängig voneinander entstanden sind (Nürnberger *et al.*, 2004).

Im tierischen System wurden auch intrazelluläre MAMP-Rezeptoren, die *nucleotide binding oligomerization domain proteins* (NODs) beschrieben. Diese bestehen im Normalfall aus drei Domänen, einer N-terminalen Effektorbindedomäne, einer Nukleotidbindedomäne und einer C-terminalen Ligandenbindedomäne, die meistens eine LRR-Domäne kodiert (Inohara und Nunez, 2003). Durch NOD1 und NOD2 werden Peptidoglykane (PGNs) von grampositiven Bakterien erkannt und hierdurch Apoptose-Reaktionen ausgelöst (Girardin *et al.*, 2003; Inohara *et al.*, 2003). In Pflanzen konnten solche intrazellulären MAMP-Rezeptoren bislang noch nicht identifiziert werden. Es gibt jedoch Rezeptorproteine (R-Proteine), die strukturell den NOD-Faktoren ähneln. Diese R-Proteine sind aber in die Erkennung mikrobieller Faktoren im Rahmen der ETI in Pflanzen involviert (s.Kap. 1.1.3). In der Regel sind R-Proteine *nucleotide binding site leucine-rich repeat*- (NBS-LRR-) Proteine, die zudem eine N-terminale *coiled-coil*- (CC-) oder TIR-Domäne kodieren (Cohn *et al.*, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004). Die TIR-, CC- und LRR-Domänen können Protein-Protein-Interaktionen ermöglichen, die NBS-Domäne kann die Nukleotide ATP oder GTP binden und vermutlich ist die ATPase oder GTPase-Aktivität für die Funktion der R-Proteine notwendig (Bent, 1996; Tameling *et al.*, 2002; Torii, 2004). Die R-Proteine RLM1 (Staal *et al.*, 2006) und RPS4 (Gassmann *et al.*, 1999) sind z.B. TIR-NBS-LRR-Proteinen und RPM1 zählt zu den CC-NBS-LRR-Proteinen (Grant *et al.*, 1995). Es wurden auch verkürzte R-Gene identifiziert, die dann TIR-NBS- oder TIR-X-Proteine darstellen. Es wird angenommen, dass diese Proteine als Adaptoren, wie z.B. dMyD88 in *Drosophila*, zwischen R-Proteinen und weiteren Proteinen fungieren (Meyers *et al.*, 2002). Hierzu zählt u.a. das TIR-NBS-Protein RLM3, das Resistenz gegenüber *L. maculans* vermittelt (Staal und Dixelius, 2008). Es gibt jedoch auch R-Proteine, die eine andere Struktur aufweisen. So sind die *Cf*-Proteine aus Tomate in der Plasmamembran verankerte LRR-Proteine mit einem kurzen zytoplasmatischen Sequenzabschnitt (Thomas *et al.*, 1998). Das R-Protein Pto ist eine im Zytoplasma lokalisierte Kinase und das R-Protein Xa21 aus Reis ist eine membranständige LRR-Kinase, die eine dem FLS2-Rezeptor ähnliche Struktur besitzt (Song *et al.*, 1995; Scofield *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1998).

In Pflanzen werden demnach im Allgemeinen vergleichbare strukturelle Module wie im Immunsystem der Säuger und von *Drosophila* eingesetzt. Hierdurch können sowohl MAMPs im Falle der PTI als auch Avr-Proteine im Rahmen der ETI detektiert werden (Nürnberger *et al.*, 2004). In jedem Fall werden aber durch die Aktivierung der Rezeptoren Abwehrreaktionen induziert, die ein Eindämmen der Pathogene ermöglichen. Diese Reaktionen sind im nächsten Kapitel beschrieben.

1.3 Reaktionen auf zellulärer Ebene

Die Erkennung verschiedener PAMPs und Effektoren löst in der Pflanzenzelle bestimmte Reaktionen aus, die eine Abwehr des Pathogens erlauben. Im Allgemeinen ähneln sich die ausgelösten Prozesse in der PTI und ETI qualitativ (Ingle *et al.*, 2006).

Die Aktivierung bestimmter Ionenkanäle führt zum Einstrom von Protonen und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Im Gegenzug werden K^{+} - und Cl^{-} -Ionen ausgeschleust (Mathieu *et al.*, 1991; Nürnberger *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000; Romeis *et al.*, 2000). Dies resultiert in einer Alkalisierung des Mediums. Die veränderten Ionenkonzentrationen führen zur Aktivierung der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) (Doke und Miura, 1995; Blume *et al.*, 2000). Hierzu zählen Wasserstoffperoxid, Hydroxyl- und Superoxid-Anionen. Die schnelle Freisetzung der ROS wird auch als *oxidative burst* bezeichnet (Mehdy, 1994; Lamb und Dixon, 1997). ROS können direkt toxisch auf die Pathogene im Apoplasten wirken und induzieren zudem weitere Abwehrreaktionen wie den hypersensitiven Zelltod (*hypersensitive reaction*, HR). Die HR wird vor allem als Abwehrreaktion in der ETI ausgelöst und äußert sich durch lokales Absterben der Zellen an der Pathogeninfektionsstelle (Greenberg, 1997) und ist damit nur gegen biotrophe Organismen wirksam. Auch die Produktion von Glutathion-S-Transferasen und die Expression spezifischer Abwehrgene in umliegenden Zellen wird aktiviert (Elstner *et al.*, 1996; Lamb und Dixon, 1997). Außerdem führt die ROS-Bildung zur Vernetzung von Zellwandstrukturproteinen. Die ROS-Produktion wird vermutlich durch plasmamembranständige NADPH-Oxidasen und Peroxidasen katalysiert (Bolwell *et al.*, 2002).

Ein weiterer gasförmiger Signaltransmitter ist freies Stickstoffmonoxid, NO. Bisher konnte in Pflanzen noch keine NO-Synthase identifiziert werden, es gibt jedoch Hinweise auf eine Rolle von Plastiden im NO-Stoffwechsel (Gas *et al.*, 2009). Durch NO werden sekundäre Signaltransmitter wie cGMP und cAMP aktiviert (Durner *et al.*, 1998). Außerdem führt NO dazu, dass die ROS-Konzentration für einen längeren Zeitraum nicht absinkt. Somit lösen NO und ROS die HR synergistisch aus (Delledonne *et al.*, 2001; de Pinto *et al.*, 2002). Durch NO werden weiterhin auch Gene des Phenylpropanweges, über den beispielsweise Lignin und Phytoalexine synthetisiert werden, reguliert (Delledonne *et al.*, 1998; Zeier *et al.*, 2004). Lignifizierung dient neben Kalloseauflagerung zur Papillenbildung und Einlagerung anderer phenolischer Substanzen in die Zellwand zu deren Verstärkung (Tronchet *et al.*, 2009). Unter Phytoalexinen versteht man niedermolekulare Verbindungen, die eine antimikrobielle Wirkung besitzen und von der Wirtszelle nach Pathogenkontakt über den Shikimatweg synthetisiert werden (Elstner *et al.*, 1996). Hierzu zählt z.B. Camalexin aus *Arabidopsis*, das nach Pathogeninfektion akkumuliert (Hammerschmidt, 2003).

Durch PAMP- oder Pathogeninfektionen werden Mitogen-aktivierte Proteinkinase- (MAPK-) Kaskaden (Asai *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2002; Kroj *et al.*, 2003) und auch Calcium- oder Calcium/Calmodulin- abhängige Signalwege (Romeis *et al.*, 2001) induziert. Im Falle der durch Flg22 ausgelösten Aktivierung von FLS2 ist bekannt, welche MAPK angesprochen werden. Es erfolgt eine Signaltransduktion über AtMEKK1, AtMKK4 bzw. 5 und dann werden MPK3,

MPK4 und MPK6 aktiviert (Asai *et al.*, 2002; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Durch diese MAPK-Kaskade werden im Anschluss bestimmte WRKY- (Tryptophan, Arginin, Lysin, Tyrosin) Transkriptionsfaktoren, die spezifisch Gene mit W-Box-tragenden Promotoren induzieren (Eulgem *et al.*, 1999), aktiviert. Im speziellen Fall sind das WRKY22 und 29 (Asai *et al.*, 2002). Hierdurch wird wiederum die Expression der Gene *PR1* und *PR5* induziert (Ingle *et al.*, 2006). *Pathogenesis-related* (PR-) Proteine werden bei Pathogenbefall exprimiert. Es sind kleine basische oder saure Proteine, die in 14 Familien unterteilt werden (van Loon und van Strien, 1999). Dazu zählen neben Proteinen ohne bekannte Funktion unter anderem Chitinasen, Proteinaseinhibitoren, Glukanasen, Defensine und Peroxidasen. Durch die Erkennung des MAMPs Flg22 und auch bei Infektionen mit einer *Pseudomonas* Typ-III-Sekretionsmutante wird die Expression weiterer Abwehrgene induziert. Erstaunlicherweise werden in beiden Fällen die gleichen Gene angesprochen. So wird unter anderem die Expression verschiedener Mustererkennungsrezeptoren, wie FLS2, induziert (Zipfel *et al.*, 2004; Jones und Dangl, 2006).

Auch Phytohormone spielen in der Pathogenantwort eine Rolle. Es ist bekannt, dass im Allgemeinen biotrophe Pathogene sensitiv auf Immunabwehrreaktionen reagieren, die durch Salizylat (SA) reguliert werden (Spoel *et al.*, 2007). Nekrotrophe Pathogene dagegen werden durch Jasmonat- (JA) und Ethylen- (ET) abhängige Signalwege kontrolliert (Spoel *et al.*, 2007). Jasmonate steuern auch Reaktionen bei der Abwehr herbivorer Insekten und bei Verwundungsreaktionen (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). In vielen Fällen sind die Signalwege, die durch SA bzw. JA/ET reguliert werden, antagonistisch. JA und ET dagegen agieren synergistisch (Kunkel und Brooks, 2002; Glazebrook, 2005). So führt z.B. die Aktivierung des SA-Weges durch *P. syringae* zu einer Unterdrückung des JA-Signalweges und infizierte Blätter zeigten eine erhöhte Suszeptibilität gegen den nekrotrophen Pilz *A. brassicicola* (Spoel *et al.*, 2007). Es hat sich jedoch gezeigt, dass eine sehr hohe Vernetzung zwischen diesen Signalwegen herrscht und die SA und JA/ET-Signaltransduktion nicht immer antagonistisch reguliert wird (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). *Pto* DC3000 nutzt jedoch die antagonistische Regulation von JA- und SA-Signalwegen aus, um die Wirtspflanze erfolgreich infizieren zu können. Salizylatabhängige Abwehrreaktionen, die die Abwehr des hemibiotrophen Pathogens *Pto* DC3000 ermöglichen, werden beispielsweise im Rahmen der ETS antagonistisch durch Modifikation des pflanzlichen Jasmonatweges durch das Pathogen unterdrückt. (Kloek *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003; Nickstadt *et al.*, 2004). So aktiviert dieses Pathogen mittels des Effektorproteins avrB den Jasmonatsignalweg (He *et al.*, 2004). Auch durch bakterielle Toxine, wie Coronatin wird dieser Signalweg beeinflusst. Coronatin ähnelt strukturell Jasmonat, induziert jasmonatabhängige Reaktionen und inhibiert dadurch die von Salizylat abhängigen Abwehrreaktionen und erlaubt hiermit eine erfolgreiche Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen (Laurie-Berry *et al.*, 2006).

Mittlerweile ist bekannt, dass auch andere Hormone wie Abszisionsäure, Auxine, Gibbereline und Zytokine eine Rolle bei der Regulation von Pathogenabwehrreaktionen spielen (Navarro *et al.*, 2006; Walters und McRoberts, 2006; Wang *et al.*, 2007; Asselbergh *et al.*, 2008; Navarro *et al.*, 2008).

Es wird deutlich, dass zur Bekämpfung von Pathogenen von der Pflanze viele verschiedene Abwehrreaktionen induziert werden, was es den Pathogenen schwierig macht alle diese Strategien zu unterdrücken.

1.4 Rezeptorähnliche Kinasen (RLKs)

Um Abwehrreaktionen auslösen zu können, müssen Pflanzen die Anwesenheit der Pathogene perzipieren können. Einige der bereits erwähnten pflanzlichen Immunrezeptoren zählen zur großen Gruppe der rezeptorähnlichen Kinasen (RLKs). Im Genom von *Arabidopsis* wurden mehr als 610 RLKs annotiert. Diese bilden zusammen mit den Tyrosin-Kinasen Pelle und IRAK aus *Drosophila* und Säugern eine monophyletische Gruppe, die RLK/Pelle-Familie. Zu diesen RLKs werden ca. 200 zytoplasmatische (RLCKs) und 400 membranständige Kinasen (RLKs) gerechnet (Shiu und Bleecker, 2001a; Shiu und Bleecker, 2003). RLKs bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Ser/Thr-Kinasedomäne. Die RLCKs hingegen sind im Zytoplasma lokalisierte Kinasen ohne extrazelluläre Domänen.

Die RLKs in *Arabidopsis* werden aufgrund der verschiedenen extrazellulären Domänen und der Homologie der Kinasedomänen in 46 Unterfamilien eingeteilt (Shiu und Bleecker, 2003). So gibt es z.B. die LysM-RLKs, die eine extrazelluläre LysM-Domäne tragen. Zu diesen zählt der bereits erwähnte putative Chitinrezeptor CERK1 (Miya *et al.*, 2007). Die SRK mit einer Selbstinkompatibilitäts- (S-) Domäne ist an der Aktivierung der Selbstinkompatibilität in *Brassica* beteiligt (Stein *et al.*, 1991). Die RLK WAK1 besitzt eine extrazelluläre wall-associated kinase- (WAK-) ähnliche Domäne. Dieses Protein kann kovalent an Pektin der Zellwand binden (Wagner und Kohorn, 2001) und hat möglicherweise eine Funktion in der Pathogenabwehr (He *et al.*, 1998). Die LRR-RLK BRI1 aus *Arabidopsis* trägt eine extrazelluläre leuzinreiche (LRR-) Domäne und ist an der Steroidhormonperzeption beteiligt (Li und Chory, 1997), während für die LRR-RLK ERECTA aus *Arabidopsis* eine Beteiligung an Wachstumsprozessen und an Immunabwehrreaktionen gezeigt werden konnte (Torii *et al.*, 1996; Godiard *et al.*, 2003; Llorente *et al.*, 2005). In den extrazellulären Domänen der RLKs finden sich außerdem proline extensine-like receptor kinases- (PERK-) ähnliche Domänen und Thaumatin-Domänen (Shiu und Bleecker, 2001b). An diesen Beispielen wird deutlich, dass von einigen RLKs die Funktion schon bekannt ist und diese Rezeptoren in viele unterschiedliche pflanzliche Regulationsprozesse involviert sein können (Shiu und Bleecker, 2001b). Demnach werden mit wenigen strukturellen Motiven viele unterschiedliche Prozesse gesteuert.

Die größte Unterfamilie bilden die leuzinreichen rezeptorähnlichen Kinasen (LRR-RLKs) mit etwa 235 Proteinen (Shiu und Bleecker, 2001b). Die LRR-Domäne schließt sich an ein N-terminales Signalpeptid an und besteht aus sogenannten leuzinreichen Wiederholungen, die nach dem Konsensus L--L--L--L--L--N-L-G-IP-- aufgebaut sind. (- ist hierbei ein beliebiger Aminosäurerest). Zu den LRR-RLKs zählen einige sehr gut charakterisierte Proteine wie CLV1, das in die Meristementwicklung involviert ist (Clark *et al.*, 1993) und die Mustererkennungsrezeptoren FLS2 und EFR, die für ihre Funktion in Immunabwehrreaktionen bekannt sind (Zipfel *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). Der Flagellinrezeptor FLS2 ist an der

Plasmamembran mit einer weiteren LRR-RLK, *BRI1-associated receptor kinase* (BAK1), kolokalisiert und ca. 2 Min nach Flg22-Induktion in *Arabidopsis* dimerisiert FLS2 mit BAK1 (Chinchilla *et al.*, 2007). Vermutlich befinden sich dann auch die Kinasedomänen der beiden Proteine in räumlicher Nähe und möglicherweise erfolgt eine Transphosphorylierung, die zur Initiierung der Flg22-abhängigen Signaltransduktion führt (Boller und Felix, 2009). BAK1 ist außerdem in brassinosteroidabhängige Prozesse involviert und dimerisiert auch mit dem Brassinosteroidrezeptor BRI1 in entwicklungspezifischen Reaktionen (Li *et al.*, 2002; Nam und Li, 2002). Wie die spezifische Interaktion von BAK1 mit den unterschiedlichen Rezeptoren nach verschiedenen Signalen gewährleistet wird, ist noch nicht bekannt. Der Brassinosteroidrezeptor BRI1 interagiert auch mit den RLCKs *BR-signaling kinases* (BSK1, BSK2 und BSK3). Diese RLCKs sind an der Plasmamembran lokalisiert, was vermutlich auf ein N-terminales Myristoylierungsmotiv zurückzuführen ist, und werden durch BRI1 phosphoryliert (Tang *et al.*, 2008). Es gibt noch weitere RLCKs deren Funktionen bekannt sind. So besitzen z.B. die *botrytis-induced kinase 1* (BIK1) und die *protein kinase 1b* (TPK1b) eine Rolle in der Abwehr nekrotropher Pilze wie *B. cinerea* (Veronese *et al.*, 2006; AbuQamar *et al.*, 2008). PBS1 ist eine RLCK der Gruppe VII, die durch den bakteriellen Effektor avrPphB gespalten wird und die durch das Resistenzgen RPS5 überwacht wird (Shao *et al.*, 2003), also eine Funktion in Reaktionen der ETI besitzt.

Für einige Rezeptorkinasen ist demnach bekannt welche Funktionen sie besitzen. Es gibt jedoch noch eine beträchtliche Anzahl an RLKs und RLCKs deren Aufgabe und Wirkmechanismus noch nicht aufgeklärt wurde.

1.5 Ziel der Arbeit

Im Genom von *Arabidopsis* sind mehr als 600 *receptor-like kinases* (RLKs) kodiert. Zu diesen werden membranständige RLKs und zytoplasmatische RLCKs gerechnet. Einige dieser Proteine sind an der Regulation von Immunreaktionen beteiligt. So spielt die zytoplasmatische Kinase BIK1 eine Rolle in der Abwehr nekrotropher Pilze und der Flagellinrezeptor FLS2 vermittelt Reaktionen der PAMP-induzierten Immunität (PTI). LRR-RLKs, wie FLS2, besitzen eine vergleichbare modulare Struktur wie die tierischen Immunrezeptoren TOLL aus *Drosophila* und die TOLL-ähnlichen Rezeptoren aus Säugern, durch die die primären Reaktionen der angeborenen Immunabwehr in Tieren ausgelöst werden. Da die Expression bekannter RLKs wie FLS2 und BAK1 durch Pathogeninfektion oder Elizitorbehandlung in *Arabidopsis* aktiviert wird (Postel *et al.*, 2009), wäre es denkbar, dass auch andere pathogeninduzierte RLKs bzw. RLCKs eine Funktion in der pflanzlichen Immunabwehr besitzen. Basierend auf dieser Hypothese wurde in dieser Arbeit eine pathogeninduzierte RLK, das *defense-related receptor kinase 3-* (DRK3-) Protein, in Bezug auf seine Funktion in der Immunabwehr eingehend untersucht. Hierfür wurden mittels reverser Genetik die Auswirkungen veränderter DRK3-Expressionslevel auf die Pathogenität verschiedener pilzlicher und bakterieller Organismen ermittelt. Die Charakterisierung der molekularen Eigenschaften dieser Kinase sollte außerdem einen Einblick in die Funktionsweise des Proteins erlauben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden im Allgemeinen von Amersham Biosciences (Freiburg), Biorad (München), Fluka (Buchs, CH), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Duchefa (Haarlem, NL), Molecular Probes Inc. (Eugene, USA), Sigma (Steinheim) oder von der Firma Brenntag Chemiepartner GmbH NL (Plochingen) bezogen. Die für die verwendeten Nährmedien benötigten Substanzen stammten von Difco Lab (Detroit, USA), Invitrogen (Carlsbad, USA), Merck, Sigma, Duchefa, Formedium (Norfolk, UK) oder Oxoid (Wesel). Für Nukleinsäuremodifikation benötigte Enzyme wurden von Biomaster (Köln), GibcoBRL (Karlsruhe), Invitrogen, Stratagene (Heidelberg), New England Biolabs (Beverly, USA), Promega (Mannheim) und Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) geliefert. Die verwendeten Primer wurden von MWG (Ebersberg) synthetisiert. Außerdem wurden von Amersham Biosciences Blottingmembranen bezogen. Radiochemikalien wie [γ - 32 P]-ATP und [α - 32 P]-dCTP wurden von Hartmann Analytic (Braunschweig) geliefert. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, durch eine MILLI-Q-Apparatur (Direct-Q™ Tap-Fed Water Systems, Millipore, Schwalbach) filtriertes Wasser, das nach Autoklavieren als H₂O_{dd} bezeichnet wurde, verwendet.

2.1.2 Nährmedien

Nach Abkühlen auf 60°C wurde den Medien, gemäß Tabelle 2.1, die für die Selektion erforderlichen Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugegeben. In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Nährmedien aufgelistet. Es wurden entweder flüssige Nährmedien eingesetzt oder aber zu den Bakterien- und Pilzmedien 15 g/l Bacto-Agar (Difco Lab), zu ½ MS – Medium 8 g/l Agar-Select (Sigma) oder zu Hefemedien 10 g/l Agar (Oxoid) hinzugefügt.

Tabelle 2-1 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 µg/ml
Chloramphenicol	25 µg/ml
Gentamycin	25 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Rifampicin	50 µg/ml (aus 25 mg/ml in Methanol)
Spectinomycin	100 oder 200 µg/ml
Tetracyclin	12,5 µg/ml (aus 12,5 mg/ml in Ethanol)

Tabelle 2-2 Verwendete Nährmedien

Medium	Inhaltsstoffe
LB	10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l NaCl
King's B	20 g/l Glycerol; 40 g/l Proteose-Pepton; nach dem Autoklavieren 10 ml/l 10 % (w/v) K ₂ HPO ₄ und 10 ml/l 10 % (w/v) MgSO ₄ steril filtriert zugeben
SOC	20 g/l Trypton; 5 g/l Hefeextrakt; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl (vorgelöst); pH 7 mit NaOH einstellen; autoklavieren und 10 mM MgSO ₄ und 20 mM α-D-Glukose steril filtriert zugeben
YPDA	10 g/l Hefeextrakt; 20 g/l Bacto-Pepton; 2 % (w/v) α-D-Glukose; pH 6 - 6,3 mit KOH einstellen
MSCol	4,3 g/l MS-Salz (Invitrogen); 1 mg/l Nikotinsäure; 1 mg/l Pyridoxin-HCl; 1 mg/l Thiamin-HCl; 100 mg/l myo-Inositol; 30 g/l Saccharose; pH 5,8; nach dem Autoklavieren Zugabe von 1 mg/l 2,4-D (1 mg vorgelöst in 1 ml Ethanol)
PDB	12 g/l PD (Kartoffel-Glukose, Duchefa)
Hafer-Bohne	34 g/l frisch gemahlene Bohnenmehl; 17 g/l Haferkleie mit Keim (Alnatura); 8,5 g/l Saccharose; auf ca. 1 l Wasser auffüllen; aufkochen, ½ h bei 95 °C quellen lassen, durch ein Metallsieb rühren, auf 1 l mit Wasser auffüllen und autoklavieren
Tomate-Malz	250 g/l Tomatenextrakt (0,5 kg Tomatenblätter mit dem Mixer mit 1 l Wasser zerkleinern, autoklavieren); 10 g/l Malzextrakt
SD-W	6,7 g/l YNB; 1,926 g/l Dropout W (Formedium); 20 g/l α-D-Glukose; pH 5,8 mit KOH einstellen
SD-L	6,7 g/l YNB; 1,622 g/l Dropout W (Formedium); 20 g/l α-D-Glukose; pH 5,8 mit KOH einstellen
SD-LW	6,7 g/l YNB; 1,546 g/l Dropout LW (Formedium); 20 g/l α-D-Glukose; pH 5,8 mit KOH einstellen
SD-HLW	6,7 g/l YNB; 1,926 g/l Dropout SD-HALW (Formedium); 20 g/l α-D-Glukose; 15 mg/l Adenin; pH 5,8 mit KOH einstellen
SD-HALW	6,7 g/l YNB; 1,926 g/l Dropout SD-HALW (Formedium); 20 g/l α-D-Glukose; pH 5,8 mit KOH einstellen

2.1.3 Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen

Die verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind mit ihren Genotypen in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2-3 Verwendete Bakterien- und Pilzstämmen

Spezies	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	F-(ϕ 80dlacZ Δ M15) Δ (lacZYA-argF)U169 endA1 recA1 hsdR17(r K- m K+) deoR thi-1phoA supE44 glnV44 λ - gyrA96 relA1 F-
	ccdB Survival TM -T1R	F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG tonA::Ptrc -ccdA (Invitrogen)
	BL21-AI TM OneShot [®]	F-ompT hsdSb(rb-mb-) gal dcm araB::T7RNAP-tetA (Invitrogen)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	<i>Pto</i> DC3000	Rif ^r COR ⁺
	<i>Pto</i> DC3000 avrRpm1	pVSP61-avrRpm1, Rif ^r Tet ^r (Bisgrove <i>et al.</i> , 1994)
	<i>Pto</i> DC3000 hrcC ⁻	Rif ^r Kan ^r (Deng <i>et al.</i> , 1998)
	<i>Pto</i> DC3000 Δ avrPto/PtoB	Rif ^r Kan ^r (Lin und Martin, 2005)
	<i>Pto</i> DC3661	Rif ^r Kan ^r (Moore <i>et al.</i> , 1989)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	<i>Pph</i> NPS3121	Rif ^r (Saettler <i>et al.</i> , 1989)
	<i>Pph</i> 1448a race 6	Rif ^r (Taylor <i>et al.</i> , 1996)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90	T-DNA ⁻ vir ⁺ Rif ^r pMP90 Gent ^r (Koncz und Schell, 1986)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Y187	MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , met ⁻ , gal80 Δ , MEL1, URA3::GAL1 _{UAS} - GAL1 _{TATA} -lacZ (Clontech)
	AH109	MAT α , trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ , gal80 Δ , LYS2::GAL1 _{UAS} -GAL1 _{TATA} -HIS3, GAL2 _{UAS} -GAL2 _{TATA} -ADE2, URA3::MEL1 _{UAS} -MEL1 _{TATA} -lacZ, MEL1 (Clontech)

Es wurden außerdem die Pilzstämmen *Alternaria brassicicola* (MUCL20297) und *Botrytis cinerea* (B05-10) verwendet.

2.1.4 Verwendete Plasmide

Alle für diese Arbeit benötigten Plasmide sind in Tabelle 2.4 charakterisiert.

Tabelle 2-4 Verwendete Plasmide

Vektor	Charakteristika	Verwendung
pDONR201/7	ori pUC rrnB T2 rrnB T1 attP1 und attP2 ccdB Cm ^r Kan ^r / Gent ^r	Eingangsvektoren für Gateway®-Klonierung (Invitrogen)
pDEST15	pT7 RBS GST-tag attR1 und attR2 ccdB Cm ^r tT7 bla Promotor Amp ^r pBR322 origin ROP orf	Expressionsvektor für aminoterminele GST- Fusion (Invitrogen)
pK7FWG2	p35S t35S eGFP attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Kan ^r Sm/Sp ^r	Binärer Vektor für carboxyterminale eGFP- Fusion (VIB, http://www.vib.be)
pB7GWIWG2(II)	p35S t35S attR1 und attR2 attR2 und attR1 ccdB Cm ^r Spec ^r	Binärer Vektor für <i>silencing</i> mittels RNA- Interferenz (VIB)
pB2GW7	p35S t35S attR1 und attr2 ccdB Cm ^r BASTA ^r	Binärer Vektor für Überexpression in Pflanzen (VIB)
p2GWR7	p35S t35S rfp attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Amp ^r	Vektor für carboxyterminale RFP-Fusion (VIB)
pUC-SPYNE	p35S t35S n-yfp c-myc Amp ^r	Vektor für carboxyterminale N-YFP-Fusion (Walter <i>et al.</i> , 2004)
pUC-SPYCE	p35S t35S c-yfp HA Amp ^r	Vektor für carboxyterminale C-YFP-Fusion (Walter <i>et al.</i> , 2004)
pKGWD.0	t35S attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Kan ^r Spec ^r prolD egfp	Binärer Vektor für Komplementationsstudien (VIB)
cF203	p35S GFP5 (S65T) trcbs p35S Kan ^r	Kontrollvektor für Lokalisationsexperimente in Protoplasten (K. Schumacher)
pGBKT7	2 μ ori f1ori pUC ori pADH1 t _{T7} & ADH1 GAL4 BD c-Myc Kan ^r TRP1	Expressionsvektor für aminoterminele GAL4BD- Fusionsproteine des Hefe-Dihybrid-Systems (Clontech)

pGADT7	2 μ ori pUC ori pADH1 tADH1 GAL4 AD HA LEU2 Amp ^r	Expressionsvektor für aminoterminaler GAL4-AD-Fusionsproteine des Hefe-Dihybrid-Systems (Clontech)
pGBKT7-GW	2 μ ori f1ori pUC ori attR1 und attR2 ccdB Cm ^r pADH1 T _{T7} & ADH1 GAL4 BD c-Myc Kan ^r TRP1	Gateway®-Expressionsvektor für aminoterminaler GAL4BD-Fusionsproteine des Hefe-Dihybrid-Systems (s. Kap. 2.6.9)
pGADT7-GW	2 μ ori pUC ori attR1 und attR2 ccdB Cm ^r pADH1 tADH1 GAL4 AD HA LEU2 Amp ^r	Gateway®-Expressionsvektor für aminoterminaler GAL4AD-Fusionsproteine des Hefe-Dihybrid-Systems (s. Kap. 2.6.9)
pGWB20	p35S t35S 10xmyc attR1 und attR2 ccdB Cm ^r Hyg ^r Kan ^r	Binärer Vektor für carboxyterminale myc-Fusionsproteine

2.1.5 Verwendetes Pflanzenmaterial

In den durchgeführten Analysen wurden *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen des Ökotyps Columbia 0 (WT-Col-0) verwendet. Außerdem wurden verschiedene *knockout*-Linien, die eine T-DNA-Insertion in einem bestimmten Gen tragen, von NASC (NASC, *Nottingham Arabidopsis Stock Center*, <http://nasc.nott.ac.uk>) bezogen. In dieser Arbeit wurden *drk3-1* (N851646), *hom1-1* (N549165) und *hom1-2* (N814595) verwendet. *drk3-1* wurde von der *Knockout Facility der University of Wisconsin* (Krysan *et al.*, 1999), *hom1-1* wurde vom SALK-Institut (Alonso *et al.*, 2003) hergestellt und *hom1-2* ist Teil der *Syngenta Arabidopsis Insertion Library* (SAIL)-Kollektion (McElver *et al.*, 2001).

2.2 Anzuchsbedingungen

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

2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle *E. coli* Stämme entweder auf LB-Agar im Inkubator bei 37°C oder in LB-Medium bei 37°C und 180 Upm für 18 h kultiviert. Je nach Bakterienstamm und transformiertem Plasmid wurden zur Selektion die entsprechenden Antibiotika in den benötigten Konzentrationen (s. Tabelle 2.2) zugegeben.

2.2.2 Anzucht von *Pseudomonas spp.*

Die *Pseudomonaden* wurden auf King's B-Agar oder in Flüssigkultur in King's B-Medium bei 200 Upm bei 28°C für 18 h kultiviert. Je nach *Pseudomonaden*-Stamm wurden dem Nährmedium die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

2.2.3 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens des Stammes GV3101 wurde auf LB-Agar oder in LB-Medium mit Rifampicin, Gentamycin und dem zur Vektorselektion benötigten Antibiotikum angezogen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte bei 28°C und die Flüssigkultur wurde bei 28°C und 180 Upm kultiviert.

2.2.4 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefen wurden entweder in YPDA-Medium, auf YPDA-Agar oder dem jeweiligen Selektionsmedium angezogen. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte in Abhängigkeit des verwendeten Mediums für 2 Tage bis 6 Wochen bei 30°C. Flüssigkulturen wurden bei 30°C und 230 Upm angezogen.

2.2.5 Anzucht von *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*

Alternaria brassicicola wurde alternierend auf PDB-Medium und Hafer-Bohne-Medium bei RT im Dunkeln angezogen. *Botrytis cinerea* wurde auf Tomate-Malz-Agar bei 22°C und Dauerlicht angezogen. Die Sporen beider Pilze wurden nach ca. 14 Tagen geerntet. Hierzu wurden die Platten mit 0,1 % Tween 20 überschichtet und mit einem Drigalski-Spatel die Oberfläche abgerieben. Die Sporen wurden durch Miracloth (Cal Biochem, LaJolla, USA) gefiltert und zweimal mit sterilem Wasser gewaschen. Die Sporenzahl wurde mit einem Hemazytometer bestimmt und dann eine Sporenkonzentration von 4×10^7 Sporen/ml eingestellt. Anschließend wurde 1 Vol. 50 % Glycerol zugegeben und die Sporen bei -80°C gelagert.

2.2.6 Anzucht von *A.thaliana* Zellkulturen

In vivo Lokalisationsexperimente wurden in *Arabidopsis thaliana* var. Columbia 0 (WT-Col-0) Protoplasten (s. Kap. 2.3.3), die aus Zellkulturen gewonnen wurden, durchgeführt. Die Zellen wurden hierfür im Dunkeln bei 26°C und 120 Upm in MSCol-Medium angezogen und einmal wöchentlich in neues Medium umgeimpft. Die Kultivierung erfolgte durch die zentrale Einrichtung für Pflanzentransformation des ZMBP der Universität Tübingen.

2.2.7 Anzucht der Versuchspflanzen

Die Samen der Versuchspflanzen wurden auf dampfsterilisierter GS90-Erde (Gebr. Patzer), die zuvor mit Vermikulit gemischt worden war, ausgesät. Nach zweitägiger Stratifikation bei 4°C im Dunkeln erfolgte die Anzucht in Pflanzenkammern. Je nach Versuchsbedingungen wurden die Pflanzen entweder unter Kurztags- oder Langtagsbedingungen angezogen. Bei Kurztagsverhältnissen wurden die Pflanzen einem 8 h Licht- ($150 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) / 16 h Dunkel-Rhythmus ausgesetzt, unter Langtagsverhältnissen waren es 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Die Temperatur betrug in allen Fällen 22°C und die Luftfeuchte lag bei 40-60 %.

2.3 Transformationen

2.3.1 Transformation von *E.coli*

Zur Transformation wurden bei -80°C aufbewahrte Aliquots chemisch kompetenter DH5 α -Zellen oder BL21-AI™OneShot®-Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der zu transformierenden Vektor-DNA und kurzem Mischen wurde der Ansatz 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit DH5 α -Zellen 90 Sek. bzw. mit BL21-AI™OneShot®-Zellen 30 Sek. im 42°C warmen Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und nach Aufnahme in 500 μ l bzw. 250 μ l SOC-Medium für eine Stunde bzw. eine halbe Stunde bei 37°C und 180 Upm inkubiert. Von dieser Bakteriensuspension wurden dann je 50 und 500 μ l bzw. 200 μ l auf die entsprechenden selektiven LB-Agar-Platten ausgestrichen und diese dann für 18 h bei 37°C kultiviert.

2.3.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Agrobakterien des Stammes GV3101 wurden in einer 1 ml Übernachtkultur in LB-Medium bei 28°C und 180 Upm angezogen und damit 200 ml LB-Medium angeimpft. Diese Kultur wurde bei 28°C und 180 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,5 bis 0,8 kultiviert und dann bei 2650 x g für 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA, pH 8,0) gewaschen, in 1/10 Vol. LB resuspendiert und in 250 μ l Aliquots aufgeteilt und diese dann nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert. Nach Auftauen auf Eis, wurde zu den 250 μ l Aliquots die zu transformierende Plasmid-DNA gegeben und diese Bakterien-DNA-Suspension dann für 5 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Transformationsansatz in flüssigem Stickstoff 5 Min. gefroren und weitere 5 Min. in einem 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte eine zweistündige Inkubation unter Schütteln (180 Upm) bei RT. Die *Agrobakterien* wurde dann 5 Min. bei 4500 x g und 4°C pelletiert und zu einem Endvolumen von 450 μ l in LB-Medium wieder resuspendiert. Es wurden dann je 50 und 400 μ l auf den entsprechenden selektiven LB-Agar Platten ausplattiert und diese für 48 h bei 28°C inkubiert.

2.3.3 Transformation von *A. thaliana* Protoplasten

Die Protoplasten einer drei Tage alten Vorkultur (10 ml) wurden bei 400 x g für 5 Min. geerntet und zweimal mit Zellwandverdauungspuffer ohne Enzyme (8 mM CaCl₂; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) gewaschen. Anschließend wurden die Pellets in 7 ml Zellwandverdauungspuffer (1 % (w/v) Zellulase; 0,25 % (w/v) Mazerozym; 8 mM CaCl₂; 0,4 M Mannitol; pH 5,5) aufgenommen und in eine Petrischale gegeben. Nach sechsstündiger Inkubation bei 26 °C und 50 Upm wurden die Protoplasten geerntet und nochmals mit Zellwandverdauungspuffer ohne Enzyme gewaschen (100 x g, 5 Min.). Das Zellpellet wurde nach Entfernen des Überstands in der verbleibenden Lösung vorsichtig resuspendiert und langsam unter Zugabe von 10 ml W5-Lösung (154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 5 mM α -D-Glukose; pH 5,8 - 6,0) equilibriert. Nach erneuter Zentrifugation bei 100 x g für 5 Min. und Aufnahme in 10 ml W5-Lösung, wurde ein Aliquot abgenommen und 20 Min. bei 4°C im

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

In dieser Arbeit wurden zu Lokalisationsstudien die Protoplasten mit den Vektoren pK7FWG2 bzw. p2GWR7 (s. Tabelle 2.4), in die zuvor mittels Gateway[®]-Rekombination (s.Kap. 2.4.7) die cDNA des *DRK3*-Gens bzw. des *RLM3*-Gens kloniert worden war, transformiert. Durch diese Vektoren wurden die entsprechenden GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine in den Protoplasten exprimiert. Zur Überprüfung der Transformationseffizienz und der Lokalisation wurde außerdem der Vektor cF203 (von K. Schumacher freundlicherweise zur Verfügung gestellt), in dem GFP5 (S65T) unter Kontrolle eines 35S-Promotors steht, eingesetzt. Die Herstellung und die Transformation der Protoplasten wurden von der zentralen Einrichtung für Pflanzentransformation des ZMBP der Universität Tübingen durchgeführt.

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

Mit den entsprechenden, selektionierten *Agrobakterien* (s. Kap. 2.4.8.2) wurden Transformationen von *A. thaliana* Pflanzen durchgeführt (Clough und Bent, 1998). Die Bakterien wurden dazu in 500 ml Übernachtskulturen in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen, diese dann pelletiert und die Bakterienpellets in 5 %-iger (w/v) Saccharoselösung zu einer OD₆₀₀ von 0,8 aufgenommen. Nach Zugabe von 0,02 % (v/v) Silwet L-77, wurden *Arabidopsis* Pflanzen, die erst seit kurzem in Blüte standen, 3 Sek. in die Bakterienlösung eingetaucht und dann für 24 h mit einer Plastiktüte abgedeckt. Diese Pflanzen lies man dann abreifen und selektionierte die erhaltenen Samen hinsichtlich des Transformationserfolges mittels Kanamycin oder Glufosinat (BASTA, Hoechst).

2.3.5 Transformation von *N.benthamiana* mittels *Agrobacterium tumefaciens*

Die entsprechenden *Agrobakterien* (s. Kap. 2.4.8.2) wurden in 10 ml Kulturen über Nacht bei 28 °C und 180 Upm angezogen. Die Zellen wurden pelletiert (4500 x g, 4 °C, 5 Min.) und die Pellets mit 10 mM MgCl₂ gewaschen und anschließend zu einer OD₆₀₀ von 1 in einer Lösung aus 10 mM MgCl₂ und 150 µM Acetosyringon aufgenommen. Die zu infiltrierenden Bakterien wurden zu gleichen Teilen mit p19-tragenden *Agrobakterien* gemischt. p19 ist ein *Silencing*-inhibitor aus *tomato bushy stunt virus* (TBSV), so dass die Expressionsrate der zu transformierenden Proteine erhöht werden kann (Himber *et al.*, 2003). Die Suspension wurde 2 h bei RT inkubiert und danach mit einer nadellosen Spritze in die Blattunterseite von ca. 5 Wochen alten Tabakpflanzen infiltriert. Die Blätter wurden nach 2 bzw. 3 Tagen geerntet und mit

flüssigem Stickstoff gemörsert. Anschließend erfolgte eine Proteinextraktion für Co-Immunoprecipitationsexperimente (s.Kap 2.6.13).

2.3.6 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Es wurde ein nach (Gietz *et al.*, 1995) modifiziertes Protokoll verwendet. Eine 10 ml Kultur des Hefestammes AH109 wurde in YPDA über Nacht bei 30°C und 230 Upm angezogen und damit 50 ml YPDA-Medium zu einer Zelldichte von $2,5 \times 10^8$ / 50 ml (eine OD₆₀₀ von 0,1 entspricht 1×10^6 Zellen) inokuliert. Diese Kultur wurde dann bei 30°C und 230 Upm für ca. 5 h, bis eine Zelldichte von 2×10^7 erreicht war, geschüttelt. Nach Pelletieren der Hefen bei 1700 x g und 4°C für 15 Min. und einmaligem Waschen mit Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM NaEDTA; 0,1 M Lithiumacetat pH 7,5; sterilfiltriert), wurde das Pellet zu 1 ml Endvolumen in Waschpuffer aufgenommen und für 30 Min. bei 30°C inkubiert. Der Transformationsmix bestehend aus 240 µl 50 % (w/v) PEG3350 (Sigma; sterilfiltriert), 30 µl 10 x TE (0,1 M Tris/HCl pH7,5; 10 mM NaEDTA; sterilfiltriert), 30 µl 10 x LiAc (1 M Lithiumacetat pH7,5; sterilfiltriert), 8 µl ssDNA (10 mg/ml Lachssperma-DNA in 0,02 M Tris/HCl, pH 7,6; ultraschallbehandelt; 5 Min. bei 95°C) und 0,25 µg zu transformierender DNA wurde zu einem 50 µl Aliquot der bei 30°C inkubierten Hefezellen gegeben. Diese Suspension wurde nach Mischen weitere 30 Min. bei 30°C inkubiert und dann erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 10 Min. Nachdem die Hefen 25 Sek. bei 17900 x g pelletiert und in 0,5 ml 0,9 %-iger (w/v) Natriumchloridlösung resuspendiert worden waren, wurde die Suspension auf den entsprechenden selektiven Platten ausplattiert und für ca. 48 h bei 30°C inkubiert.

2.3.7 Hefe-Paarung

Der Hefestamm Y187, der mit den entsprechenden Konstrukten transformiert worden war, die in einem Hefe-Dihybrid-Screen (s. Kap. 2.6.9) analysiert werden sollten, wurde in einer 12 ml Kultur in SD-W (mit 20 µg/ml Kanamycin) über Nacht bei 30 °C und 230 Upm angezogen. Mit dieser Kultur wurden 200 ml SD-W (mit 20µg/ml Kanamycin) inokuliert und diese 24 h bei 30 °C und 230 Upm wachsen gelassen. Wenn eine OD₆₀₀ > 0,8 erreicht war, wurden die Zellen bei 600 g für 5 Min. pelletiert und in 3 ml SD-W aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit einem Hemazytometer bestimmt und sollte $> 1 \times 10^9$ cfu/ml sein. Diese Suspension wurde mit 45 ml 2 x YPDA (mit 50 µg/ml Kanamycin) und mit einem 1 ml Aliquot der hergestellten cDNA-Bibliothek in AH109 (s.Kap. 2.4.14) gemischt und in einem 2 l Kolben bei 30 °C, 30 Upm 24 h inkubiert. Der Ansatz wurde bei 1000 g und 10 Min. bei RT zentrifugiert und der Kolben wurde zweimal mit je 50 ml 0,5 x YPDA (mit 50 µg/ml Kanamycin) gewaschen und dieses Medium zum Resuspendieren des Pellets benutzt. Nach erneuter Zentrifugation (1000 g, 10 Min., RT) wurde das Pellet in 10 ml 0,5 x YPDA (mit 50 µg/ml Kanamycin) resuspendiert. Das Gesamtvolumen von Zellen und Medium wurde bestimmt und jeweils 100 µl einer 1:10000, 1:1000, 1:100 and 1:10 der Mischung auf SD-L, SD-W und SD-LW ausplattiert. Die restliche Mischung wurde auf SD-HLW bzw. SD-HALW ausplattiert und für 5 Tage bis 6 Wochen bei 30°C inkubiert. Auf SD-HLW ausplattierte Proben wurden mit einem Samstempel auf SD-HALW umgesetzt und erneut bei 30°C inkubiert.

Die Paarungseffizienz wurde anschließend berechnet. Hierfür bestimmte man die Überlebensfähigkeit der gepaarten Partner (KBE/ausplattiertes Volumen (ml) x Verdünnungsfaktor = Zahl der überlebenden KBE/ml). Der Stamm mit der geringeren Überlebensrate ist der limitierende Partner (sollte AH109 sein). Die Paarungseffizienz setzt sich zusammen aus: Zahl der KBE/ml der diploiden Zellen pro Zahl der KBE/ml des limitierenden Partners x 100.

2.4 DNA-Analytik

2.4.1 Isolierung genomischer DNA aus *Arabidopsis* Pflanzen

Drei bis vier Blätter der betreffenden *Arabidopsis* Pflanzen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wurde mit einem Plastikpistill, der in flüssigem Stickstoff vorgekühlt war, gemörsert. Das Pulver wurde mit 1 ml Extraktionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA pH 8,0; 500 mM NaCl; 1,5 % (w/v) SDS) versetzt. Nach zehninütiger Inkubation bei 65°C erfolgte die Zugabe von 300 µl 5 M Kaliumazetatpuffer (60 % (v/v) 5 M Kaliumazetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure) und dreißigminütige Inkubation auf Eis. Danach wurden alle festen Bestandteile bei 20800 x g und 4°C 10 Min. herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 800 µl PCI (Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) und vorsichtigem Mischen wurde wiederum zentrifugiert (20800 x g, 4°C, 5 Min.) und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aus diesem wurde durch Zugabe von 500 µl Isopropanol die DNA gefällt und anschließend bei 20800 x g und 4°C in 10 Min. herunterzentrifugiert. Das gebildete Pellet wurde mit 500 µl eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, zentrifugiert (20800 x g, 4°C, 5 Min.), getrocknet und in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen und bei 4°C gelagert.

2.4.2 Plasmid-Präparation aus *E.coli* DH5a

2.4.2.1 Plasmid-Minipräparation aus DH5a-Zellen mittels alkalischer Lyse

Für Anwendungen, die nicht allzu hohe Reinheit der Probe erforderten, wurde Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse extrahiert. Dazu wurden 3 ml Übernachtskulturen der entsprechenden Bakterien in LB-Medium mit selektiven Antibiotika bei 37°C und 180 Upm angezogen. Je 2 ml dieser Kulturen wurden pelletiert und das Pellet in 100 µl Puffer P1 (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM EDTA; 0,1 g/l RNase) resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µl des Puffers P2 (200 mM NaOH; 1 % (w/v) SDS), 5 Min. Inkubation bei RT, Zugabe von 100 µl P3 (3 M Kaliumazetat pH 5,5) und 10 Min. Inkubation auf Eis, wurden sowohl Zelltrümmer als auch ausgefallene Proteine bei 20800 x g und RT für 15 Min. abzentrifugiert. Aus dem wässrigen Überstand wurde die DNA mit 300 µl Isopropanol gefällt und anschließend abzentrifugiert (20800 x g, 4°C, 20 Min.). Das Pellet wurde nach dem Waschen mit eiskaltem 70 %-igem (v/v) Ethanol und der vollständigen Trocknung in 50 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,5 aufgenommen und bei -20°C gelagert.

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

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Probe erforderten, wurde Plasmid-DNA mit dem *QIAprep spin Miniprep kit* der Firma QIAGEN nach den Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurde nach alkalischer Lyse der Bakterien die Plasmid-DNA über einen säulenchromatographischen Schritt gereinigt.

2.4.2.3 Plasmid-Midipräparation mittels *QIAGEN Tip 100 Midiprep kit*

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit und große Mengen der Probe erforderten, wurde Plasmid-DNA aus 100 ml Übernachtskulturen des entsprechenden Bakterienstammes mittels des *QIAGEN Tip 100 Midiprep kits* nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.4.2.4 Plasmid-Minipräparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Plasmid-Minipräparation aus den entsprechenden *Agrobakterien* wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 1000 x g und RT 3 Min. pelletiert. Nachdem das Pellet in 100 µl Lösung I (450 g/l Glukose; 200 g/l Lysozym; 0,25 M EDTA; 0,5 M Tris/HCl pH 7,5) resuspendiert und diese Suspension 30 Min. bei RT inkubiert worden war, wurden 200 µl alkalische SDS-Lösung (200 µM NaOH; 1 % (w/v) SDS) zugegeben und vorsichtig durch Invertieren gemischt. Nach 30 Min. Inkubation bei RT wurden 30 µl alkalisches Phenol (1 ml Phenol; 60 µl 1 M NaOH) zugegeben, schnell gemischt und sofort 150 µl Kaliumazetatpuffer (60 % (v/v) 5 M Kaliumazetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure) hinzugefügt. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer und ausgefallenen Proteine bei 20800 x g und RT für 10 Min. wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohl im Verhältnis 25:24:1) gemischt und abzentrifugiert (20800 x g; RT; 5 Min.). Die wässrige Phase wurde wiederum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 1 Vol. Chloroform gemischt und zentrifugiert (20800 x g; RT; 10 Min.). Aus der so gewonnenen wässrigen Phase wurde dann mit 500 µl Isopropanol die Plasmid-DNA 5 Min. bei RT gefällt. Nach Zentrifugation (20800 x g; 4°C; 15 Min.) wurde das resultierende Pellet mit 500 µl eiskaltem 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 40 µl H₂O_{dd} gelöst.

2.4.2.5 Plasmid-Minipräparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Es wurde eine 10 ml Übernachtskultur des entsprechenden Hefeklones angezogen (s. Kap. 2.2.4), bei 1700 x g und 4°C für 5 Min. zentrifugiert. Die Hefezellen im Pellet wurden anschließend in 100 µl STET-Puffer (8 % (w/v) Saccharose; 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 5 % (v/v) Triton X-100) aufgenommen und mit Hilfe von 200 mg Glasperlen unter 5 Min. vortexen zerkleinert. Nach Zugabe weiterer 100 µl STET-Puffer, dreiminütigem Aufkochen im Wasserbad und Abkühlen auf Eis, wurde die Probe bei 20800 x g und 4°C für 10 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von ½ Vol. 7,5 M Ammoniumazetat die Proteine bei -20°C (1 h) gefällt. Nach erneuter Zentrifugation bei 20800 x g und 4°C für 10 Min. und Überführung des Überstandes in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß, wurden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 2 Vol. eiskaltem

Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (20800 x g; 4°C; 15 Min.) wurde das Pellet mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl H₂O_{dd} aufgenommen.

2.4.3 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration in Lösung

Zur Nukleinsäurekonzentrations- und Reinheitsbestimmung wurde ein Spektrophotometer (Ultrospec 2100 pro, Amersham) benutzt. Die Bestimmung erfolgte in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 10 mm gegen H₂O_{dd}. RNA oder DNA kann bei einer UV-Wellenlänge von 260 nm photometrisch quantifiziert werden. Dabei entspricht eine optische Dichte von 1 (OD₂₆₀ = 1) bei einer Schichtdicke der Quarzküvette von 10 mm einer Konzentration von 40 µg RNA/ml bzw. 50 µg dsDNA/ml.

2.4.4 Restriktion

Es wurden 2 bis 4 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10 x Reaktionspuffer mit H₂O_{dd} auf 19,75 µl aufgefüllt und 0,25 µl Restriktionsenzym hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 4 bis 16 h inkubiert und dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.4.5 Ligation

Für Ligationsreaktionen wurde durch Restriktion (s. Kap. 2.4.6) verdaute und durch Aufreinigung aus einem Agarosegel (s. Kap. 2.4.11) gewonnene Vektor-DNA und zu ligierendes Insert verwendet. Es sollten Vektor und Insert im Verhältnis 1:3 eingesetzt werden. Die Konzentration der Liganden schätzte man auf einem Agarosegel ab. Es wurden eine Einheit Vektor mit drei Einheiten Insert, 1 µl 10 x Ligase-Puffer (NEB) mit H₂O_{dd} zu 9 µl aufgefüllt und 1 µl T4-Ligase (NEB) hinzugefügt und dieser Ansatz über Nacht bei 16°C inkubiert. 4 µl dieses Ansatzes wurden dann in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert (s. Kap. 2.3.1).

2.4.6 Fällung von DNA mit Ethanol

Um mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA mittels PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1) aufzureinigen, wurde 1 Vol. PCI zur fällenden DNA gegeben. Nach Mischung und Zentrifugation (20800 x g, 5 Min., RT) wurde der wässrige Überstand abgenommen und mit 0,1 Vol. 3 M Natriumazetat und 2 Vol. kaltem 100% -igem Ethanol versetzt. Der Ansatz wurde 16 h bei -20°C inkubiert und anschließend bei 20800 x g, 10 Min., 4°C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in ein entsprechendes Volumen H₂O_{dd} aufgenommen.

2.4.7 Klonierung mit der Gateway®-Klonierungstechnologie

Mit je 0,2 µM Adapterprimer-5' und Adapterprimer-3' (siehe Anhang 7.1), die an entsprechende Sequenzabschnitte des zu klonierenden Gens binden, wurde in einer ersten PCR (s. Kap. 2.4.9) unter Einsatz von weniger als 0,3 µmol genomischer DNA (s. Kap. 2.4.1), cDNA oder Plasmid-DNA, 0,125 mM dNTP-Gemisch, 1 x Pfu-Puffer (Promega) und 0,075 U/µl Pfu-Polymerase (Promega) mit dem Programm: 94°C 2 Min., 10 x: 94°C 15 Sek., T_{anneal} 45 Sek., 72°C 2 Min. pro kb; 4°C ∞, der entsprechende Bereich amplifiziert. In einer zweiten PCR wurde dann mit den Gateway®-Primern attB1adapter-5' und attB2adapter-3' (siehe Anhang 7.1) die

Adapter-Rekombinase-Erkennungssequenz am 5´ und am 3´-Ende verlängert (4 µl PCR1, 0,8 µM attB1adapter-5´, 0,8 µM attB2adapter-3´, 0,125 mM dNTP-Gemisch, 1 x Pfu-Puffer, 0,075 U/µl Pfu-Polymerase; Programm: 94°C 2 Min.; 5x: 94°C 15 Sek., 45°C 45 Sek., 72°C 2 Min. pro kb; 20x: 94°C 15 Sek., 55°C 45 Sek., 72°C 2 Min. pro kb und 72°C für 7 Min. und 4°C ∞). Dieses PCR-Produkt wurde mittels Gelelektrophorese (s. Kap. 2.4.10) aufgetrennt und aus dem Gel eluiert (s. Kap. 2.4.11). Die DNA-Konzentration im Eluat wurde spektrophotometrisch bestimmt (s. Kap. 2.4.3).

Etwa 100 fmol des Eluats wurden über Gateway®-BP-Rekombination in den Vektor pDONR201 oder in pDONR207, die in *E.coli* ccdB-Zellen propagiert wurden, rekombiniert. Hierzu wurden 100 fmol Insert, 100 fmol pDONR201/7, 1 x BP-Rekombinationspuffer (Invitrogen) mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) zu 8 µl Endvolumen aufgefüllt und 2 µl BP-Klonasemix (Invitrogen) hinzugegeben und diese Mischung dann 16 h bei 25°C inkubiert. Nach Inaktivierung des Reaktionsansatzes mit 1 µl Proteinase K (Invitrogen) für 10 Min. bei 37°C, wurden 4 µl in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert und diese auf LB-Agar mit Kanamycin bzw. Gentamycin selektioniert. Der so erzeugte Eingangsvektor wurde durch Restriktionsanalysen (s. Kap. 2.4.4) und Sequenzierung (s. Kap. 2.4.12) geprüft und dann für weitere Gateway®-LR-Rekombinationsreaktionen genutzt. Dazu wurden 100-300 ng des Eingangsvektors mit 300 ng des jeweiligen Expressionsvektors (Karimi *et al.*, 2002), 1 x LR-Rekombinationspuffer (Invitrogen) mit TE-Puffer zu einem Endvolumen von 8 µl aufgefüllt und 2 µl LR-Klonasemix (Invitrogen) hinzugefügt, gemischt und ca. 16 h bei RT inkubiert. Auch hier wurden nach zehnmütiger Inaktivierung mit Proteinase K bei 37°C 4 µl des Ansatzes in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert. Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem für den Expressionsvektor spezifischen Antibiotikum. Zur Kontrolle wurde auch auf LB-Agar mit Kanamycin bzw. Gentamycin selektioniert, um auszuschließen, dass ein Eingangsvektor kotransformiert wurde. Die Gateway®-kompatiblen Vektoren, die für LR-Reaktionen genutzt wurden, sind pDEST15, pK7FWG2, pB7GWIWG2(II), pB2GW7, pGWB20 p2GWR7, pGBKT7-GW, pGADT7-GW und pKGWD.0 (siehe Tabelle 2.4).

2.4.8 Klonierungsstrategien

2.4.8.1 Klonierung der Vektoren für BiFC

Für Bimolekulare Fluoreszenzkomplementationsstudien (BiFC, s. Kap. 2.6.12) mussten die zu analysierenden Konstrukte von *RLM3* und *DRK3* in die Vektoren pUC-SPYNE und pUC-SPYCE (s. Kap. 2.1.4) kloniert werden. Hierzu wurde das Gesamtlängenkonstrukt von *RLM3* von dem cDNA-Klon RAFL25-36-H06 mit den Primern XbaI-4g16690-5K und XhoI-4g16690-3OS (s. Anhang 7.1) mittels PCR (s. Kap. 2.4.9) amplifiziert, mit den Restriktionsenzymen XbaI und XhoI geschnitten (s. Kap. 2.4.4), mittels Agarosegelelektrophorese (s. Kap. 2.4.10) aufgetrennt, das entsprechende Fragment aus dem Gel isoliert (s. Kap. 2.4.11) und in die geschnittenen Vektoren pUC-SPYNE, pUC-SPYNE153Stop (K.Weckermann) und pUC-SPYCE ligiert (s. Kap. 2.4.5). Die Kinasedomäne der *DRK3* wurde mit den Primer BamHI-4g10390-5KD und XhoI-4g10390-3OS (s. Anhang 7.1), das Gesamtlängenkonstrukt der *DRK3* mit den Primern BamHI-

4g10390-5K und XhoI-4g10390-3OS (s. Anhang 7.1) und der N-terminale Abschnitt der *DRK3* mit den Primern BamHI-4g10390-5K und XhoI-4g10390-3N (s. Anhang 7.1) von cDNA amplifiziert und mit den Enzymen XhoI und BamHI geschnitten. Diese Fragmente wurden wie für die *RLM3*-Sequenz beschrieben in die Vektoren pUC-SPYNE bzw. pUC-SPYCE kloniert.

2.4.8.2 Klonierung verschiedener Konstrukte zur Pflanzentransformation

Zur stabilen Transformation von *A. thaliana* wurden die entsprechenden binären Vektoren aus den Ausgangsplasmiden (s. Tabelle 2.4) mittels Gateway®-System von Invitrogen (s. Kap. 2.4.7) hergestellt. Zur Erzeugung eines binären Überexpressionsvektors wurde die cDNA-Sequenz des *DRK3*-Gens mit Stopcodon mittels PCR (s. Kap. 2.4.9.1) mit den Primern attB14g10390-5K und attB24g10390-3M (s. Anhang 7.1) amplifiziert und nach einer zweiten PCR mit den Primern attB1adapter-5' und attB2adapter-3' und Klonierung in pDONR201 in den Vektor pB2GW7 (s. Kap. 2.1.4) rekombiniert. Um Pflanzen zu erzeugen, in denen die Expression des *DRK3*-Gens mittels RNA-Interferenz inaktiviert wird, wurde mit den Primern attB1At4g10390-i-5 und attB2At4g10390-i-3 ein Sequenzabschnitt (s. Anhang 7.5) der *DRK3* amplifiziert und in pB7GWIWG2(II) (s. Kap. 2.1.4) kloniert. Um die *knockout*-Linie der *DRK3* komplementieren zu können, wurde ein Fragment des Promotors (890 bp) zusammen mit der Gensequenz der *DRK3* von genomischer DNA von WT-Col-0 Pflanzen amplifiziert (s. Anhang 7.6) und in den Vektor pKGWD.0 kloniert (s. Kap. 2.1.4).

Die Vektoren wurden zuerst in *E. coli* transformiert (zur Vermehrung, s. Kap. 2.3.1) und im Anschluss über Plasmid-Minipräparation (s. Kap. 2.4.2) isoliert. Die Gateway®-Eingangsvektoren (jeweiliger Sequenzabschnitt des *DRK3*-Gens in pDONR201) wurden mittels Restriktionsanalyse (s. Kap. 2.4.4) und Sequenzierung (s. Kap. 2.4.12) geprüft. Alle weiteren Vektoren wurden durch Restriktionsanalyse verifiziert. Diese Vektoren wurden dann in *Agrobakterien* GV3101 transformiert (s. Kap. 2.3.2). Um die erfolgreiche Transformation der *Agrobakterien* zu prüfen, wurden *Agrobakterien* Plasmid-Minipräparationen (s. Kap. 2.4.2.4) durchgeführt und die erhaltene Plasmid-DNA in *E. coli* retransformiert und nach Minipräparation durch Restriktion analysiert. Die entsprechenden *Agrobakterien* wurden dann zur Transformation von *Arabidopsis* verwendet (s. Kap. 2.3.4).

2.4.9 Polymerasekettenreaktion - PCR

Das Gemisch für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen bestand, sofern nicht anders angegeben, aus 0,5 µM 5'- und 3'-Primern (MWG oder Metabion), 0,125 mM dNTP Gemisch (Biomaster), 1x Taq-Polymerase Puffer (Biomaster), 1 µl genomischer DNA oder cDNA aufgefüllt mit H₂O_{dd} zu 19 µl und 0,05 U/µl Taq-Polymerase (Biomaster). Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Allgemeinen mit folgendem Programm:

94°C für 2 Min.,

22-40x: 94°C für 15 Sek., T_{anneal} für 30 Sek., 72°C für 30 Sek. pro kb

und dann 72°C für 10 Min. und 4°C für ∞.

Die Reaktionen wurden mit dem Gerät PTC-200 der Firma MJ Research (Waltham, USA) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer und die benutzten Anlagerungstemperaturen (T_{anneal}) sind in Anhang 7.1 aufgelistet.

2.4.9.1 PCR auf cDNA

Zur relativen Quantifizierung der Expressionsstärke des *DRK3*-Gens wurde durch reverse Transkription (s. Kap. 2.5.3) hergestellte cDNA als Matrize für PCR mit Primern, die spezifisch einen Sequenzabschnitt des *DRK3*-Gens amplifizieren, benutzt. Zur Kontrolle wurde ein Fragment des Elongationsfaktors *EFl α* mit den Primern *efl α -as* und *efl α -s* (s. Anhang 7.1) in 22 Zyklen mit der $T_{\text{anneal}} = 56^{\circ}\text{C}$ amplifiziert. Durch diese PCR wurde die Menge an cDNA bestimmt, die in der genspezifischen PCR eingesetzt werden sollte. In dieser wurde dann ein bestimmtes Fragment aus dem *DRK3*-Gen mit den jeweiligen Primern bei einer T_{anneal} von 61°C amplifiziert. Durch Vergleich der Bandenstärke konnten Expressionsunterschiede analysiert werden. Wenn die Expression des *DRK3*-Gens durch Verwundung induziert wurde, wurde zusätzlich eine PCR mit den *OPR3*-spezifischen Primern *Opr3-3'* und *Opr3-5'* (s. Anhang 7.1) durchgeführt, um die Wundinduktion zu überprüfen.

2.4.9.2 Genotypisierung

Um festzustellen, welche Pflanzen der verwendeten *knockout*-Linien tatsächlich eine homozygote T-DNA-Insertion aufweisen, wurden Pflanzen aus dem von NASC erhaltenem Saatgut (s. Kap. 2.1.5) herangezogen (s. Kap. 2.2.7) und aus diesen genomische DNA (s. Kap. 2.4.1) isoliert. Auf der genomischen DNA wurden dann 2 verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt, die Aufschluss über das homozygote Vorkommen der T-DNA-Insertion liefern sollten.

In einer ersten Reaktion wurden Primer verwendet, die 5' und 3' der Insertionsstelle binden und diese genspezifisch umschließen. Diese PCR liefert Aufschluss über das Vorhandensein des intakten Wildtyp-Gens (WT-PCR). In einer zweiten Reaktion wurde ein Primer benutzt, der 5' der Insertionsstelle bindet und ein zweiter, der spezifisch in der T-DNA-Insertion bindet (KO-PCR). In dieser PCR wird also Aufschluss über das Vorhandensein der T-DNA-Insertion erhalten. Die für diese PCR-Reaktionen gewählten Bedingungen sind in Tabelle 2.5 gezeigt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Anhang 7.1 dargestellt.

Tabelle 2-5 Für die Genotypisierung verwendete Primer mit der dazugehörigen Anlagerungstemperatur (T_{anneal}), der benutzten Zyklenzahl und der erwarteten Produktgröße

Linie	PCR	Primer 3'	Primer 5'	T_{anneal}	Zyklen	Produktgröße (bp)
<i>drk3-1</i>	WT	At4g10390-3'	NeuAt4g10390-5'	61°C	30	1034
	KO	P745	NeuAt4g10390-5'	58°C	30	~ 800
<i>hom1-1</i>	WT	At1g33260-3'	At1g33260-5'	53°C	30	600
	KO	Lba1	At1g33260-5'	55°C	30	~ 500
<i>hom1-2</i>	WT	At1g33260-3'	At1g33260-5'	53°C	30	600
	KO	SailLB	At1g33260-5'	55°C	30	~ 400

2.4.9.3 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Mutation einer putativen Myristoylierungsstelle im *DRK3*-Gen wurde eine ortsgerechte Mutagenese der cDNA des *DRK3*-Gens im Eingangsvektors pDONR201 durchgeführt. Hierbei wurde das Codon GGA (kodiert für Glyzin 24) an Position 24 des *DRK3*-Gens zum Codon GCT (kodiert für Alanin) mutagenisiert (Sequenz siehe Anhang 7.8). Es wurden die Primer At4g10390G-Amut-for und At4g10390G-Amut-rev (s. Anhang 7.1) verwendet. 100 ng Plasmid-DNA wurden mit je 2 μ M Primer, 0,2 mM dNTP-Gemisch, 1 x PfuUltra™-Puffer mit H₂O_{dd} zu einem Volumen von 49 μ l aufgefüllt und mit 2,5 U PfuUltra™High-Fidelity DNA Polymerase (Stratagene) gemischt. Anschließend wurde eine PCR mit dem Programm: 95°C 1 Min.; 18 x: 95°C 50 Sek., T_{anneal} 50 Sek., 68°C 2 Min. pro kb; 68°C 7 Min. und 4°C ∞ durchgeführt. Zur Entfernung des nicht mutagenisierten Ausgangsvektors wurde der Ansatz 1 h mit 10 U *DpnI* bei 37°C inkubiert. Hiervon wurden 2 μ l zur Vermehrung in kompetente *E.coli* DH5 α -Zellen (s. Kap. 2.3.1) transformiert. Die erfolgreiche Mutagenese wurde mittels Restriktionsanalyse und Sequenzierung überprüft. Das mutierte Insert wurde anschließend in einer Gateway®-LR-Reaktion (s. Kap. 2.4.7) in pK7FWG2 rekombiniert und zur Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten (s. Kap. 2.3.3) genutzt.

2.4.10 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Durch die Agarosegelelektrophorese kann DNA nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Maschenweite des Gels ist abhängig von dem eingesetzten Prozentsatz an Agarose. An die pufferüberschichteten Gele wird eine elektrische Spannung angelegt, wodurch die negativ geladenen Nukleinsäuremoleküle abhängig von ihrer Größe unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten zeigen und somit aufgetrennt werden können.

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

2.4.11 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.4.12 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Der entsprechende DNA-Abschnitt wurde mittels PCR (s. Kap. 2.4.9) von einem entsprechenden Plasmid oder genomischer DNA amplifiziert, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (s. Kap. 2.4.11). Die Sonden wurden mit dem *Amersham*

Megaprime DNA labeling kit nach Angaben des Herstellers mit 1850 MBq [α - 32 P] dCTP von Hartmann Analytik radioaktiv markiert. Überschüssige Nukleotide wurden durch Gelfiltration mittels Sephadex G-50 (GE Healthcare) abgetrennt.

2.4.13 Southern-blot

Für Southern-blot-Analysen wurde genomische DNA von der *knockout*-Linie *drk3-1* isoliert (s. Kap. 2.4.1) und über Nacht mit dem entsprechenden Enzym geschnitten (70 μ l genomische DNA, 10 μ l 10 x Restriktionspuffer, 5 μ l Enzym und 15 μ l H₂O_{ad}). Nach Fällung mit Ethanol (s. Kap. 2.4.6) wurde ein zweiter Restriktionsverdau durchgeführt und die DNA anschließend bei 100 V ca. 3 h mittels einem 1 %-igem Agarosegel (s. Kap. 2.4.10) aufgetrennt. Mit alkalischem Transferpuffer (0,4 M Natriumhydroxid; 1 M Natriumchlorid) wurde die DNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham Biosciences) mit Kapillarblottechnik übertragen. Die Membran wurde danach mit Neutralisationspuffer (0,5 M Tris/HCl pH 7,2; 1 M Natriumchlorid) 3 x 10 Min. gewaschen und 2 h bei 80°C gebacken, so dass die DNA an die Membran gekoppelt wurde. Nach einstündiger Prähybridisierung der Membran mit *ExpressHyb* (Clontech) bei 60°C wurde die radioaktiv markierte Sonde (s. Kap. 2.4.12) zugesetzt und über Nacht im Rotationsinkubator bei 60°C belassen. Anschließend wurde die Membran 2 x 30 Min. mit Waschlösung I (2 x SSC; 0,1% SDS) bei RT und 2 x 30 Min. mit Waschlösung II (0,2 x SSC; 0,1% SDS) je nach gewünschter Stringenz bei 50 bis 65°C gewaschen. Die Membran wurde in SaranTM-Folie eingepackt und die eingebaute Radioaktivität durch 24-stündiges Exponieren eines *PhosphoImager Screens* (Kodak) mittels Autoradiographie detektiert. Zur Aufnahme der Autoradiographien wurde ein *PhosphoImager FMBIO III Multi View* der Firma Hitachi verwendet.

2.4.14 Herstellung einer cDNA-Bibliothek

Zur Herstellung einer pathogeninduzierten cDNA-Bibliothek wurden 5 Wochen alte im Kurztag angezogene *Arabidopsis Col-0* Pflanzen verwendet. Die Bakterienstämme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000 (virulent), *Pto* avrRpm1 (avirulent), *Pto* hrcC⁻ (apathogen) und *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*, Nichtwirtspathogen) wurden in 50 ml Übernachtskultur in King's B-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen (s. Kap. 2.2.2). Die Bakterien wurden bei 1300 x g, 4°C für 6 Min. pelletiert und die Pellets zweimal mit 10 mM MgCl₂ gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht 1 x 10⁸ KBE/ml) eingestellt. Diese Bakteriensuspensionen wurden in Blätter der *Arabidopsis* Pflanzen mit Hilfe einer nadellosen Spritze infiltriert und dann Blattmaterial nach 2, 6 und 24 h geerntet und RNA isoliert (s. Kap. 2.5.1) und diese gemischt. Mit dem *NucleoTrap® mRNA-kit* (Macherey-Nagel) wurde mRNA aus dieser Probe nach Angaben des Herstellers isoliert. Mit einem oligo-dT-Primer (CDSIII) wurde hieraus cDNA nach Angaben des Herstellers isoliert (*MatchmakerTM Library Construction & Screening kit*, Clontech). Diese wurde dann in den Hefestamm AH109 mit pGADT7-Rec cotransformiert und *in vivo* rekombiniert. (*MatchmakerTM Library Construction & Screening kit*, Clontech). Die Hefen wurden aliquotiert

und bei -80°C gelagert und für die Suche nach Interaktoren mit dem Hefe-Dihybrid-System (s. Kap. 2.6.9) eingesetzt.

2.4.15 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung der jeweiligen Gateway®-Eingangsvektoren in pDONR201 wurde jeweils 1 µg DNA aus einer Plasmid-Minipräparation (s.Kap. 2.4.2.2) mit den entsprechenden Primern (pDONR-for oder pDONR-rev) an MWG (Ebersberg) gesandt.

2.4.16 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Daten, die nach Sequenzierung erhalten wurden, wurden mittels der Lasergene DNA*STAR Software ausgewertet. Außerdem wurde zu weiteren Sequenzanalysen das öffentlich zugängliche Programm ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) genutzt.

2.5 RNA-Analytik

2.5.1 Isolierung von RNA aus Blattmaterial

Es wurden pro Probe 2 Blätter in ein 2 ml Reaktionsgefäß geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Plastikpistill gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (Invitrogen) wurde das Gemisch unter Vortexen aufgetaut und 5 Min. bei RT belassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, etwa 15 Sek. gemischt und 3 Min. bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 20800 x g und 4°C für 15 Min. wurde die obere wässrige Phase in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 Vol. Isopropanol und zehnmütiger Inkubation bei RT gefällt. Das nach Zentrifugation (20800 x g, 4°C, 10 Min.) erhaltene Pellet wurde mit 75 %-igem (v/v) Ethanol (in DEPC-behandeltem H₂O) gewaschen, getrocknet und in 30 µl DEPC-behandeltem H₂O [0,1 % (w/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) in Wasser lösen, über Nacht bei RT rühren, autoklavieren] wieder gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt (s. Kap. 2.4.3)

2.5.2 DNaseI-Verdau isolierter RNA

Zu etwa 5 µg RNA, die aus einer Trizol-Präparation (s. Kap. 2.5.1) erhalten wurden, wurde 1 x DNaseI-Puffer (Roche) gegeben und zu 50 µl mit DEPC-behandeltem H₂O aufgefüllt und 2 µl DNaseI (RNase frei, Roche 10 U/µl) hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde 30 Min. bei 37°C inkubiert und die Proteine durch Zugabe von 1 Vol. PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1) extrahiert. Nach Zentrifugation bei 20800 x g, 4°C, 10 Min. wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Natriumazetatlösung und 2 Vol. Ethanol bei -20°C in 18 h gefällt. Das durch Zentrifugation (20800 x g, 4°C, 15 Min.) erhaltene RNA-Pellet wurde mit 75 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 15 µl DEPC-behandeltem H₂O aufgenommen.

2.5.3 Reverse Transkription

Zur reversen Transkription wurde 1 µg RNA aus einer DNaseI-behandelten (s. Kap. 2.5.2) RNA-Präparation verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels MMuLV (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*) Reverser Transkriptase (Fermentas). Dazu wurden 1 µg RNA mit 0,8 µM Oligo dT-Primer und 1,9 µM dNTP-Gemisch mit DEPC-behandeltem H₂O zu einem Endvolumen von 13 µl aufgefüllt. Nach fünfminütiger Inkubation bei 65°C und Abkühlen auf Eis wurden noch 1 x MMuLV RT-Puffer (Fermentas) und 1 µl MMuLV Reverse Transkriptase hinzugefügt und mit 2 µl DEPC-behandeltem H₂O zu einem Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde dann 50 Min. bei 42°C und 5 Min. bei 94°C inkubiert und im Anschluss auf Eis abgekühlt. Mit der so gewonnenen cDNA konnten mittels PCR mit *EFlα*- und *DRK3*-genspezifischen Primern relative Quantifizierungen durchgeführt werden (s. Kap. 2.4.9.1).

2.5.4 RNA-Agarosegel

Um RNA mittels Gelelektrophorese aufzutrennen wurde ein 1 %-iges Formaldehyd-Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde 1 % Agarose in 1 x MOPS (0,02 M MOPS; 0,005 M Natriumacetat; 0,001 M EDTA; pH 7,2; mit DEPC behandelt, autoklaviert) aufgeköcht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde 5 % (v/v) einer 37 %-igen Formaldehydlösung hinzugegeben und das Gel in den Gelschlitten gegossen. 5 µg RNA wurden mit 5 x RNA-Ladepuffer (0,75 ml Formamid; 0,15 ml 10 x MOPS; 0,24 ml 37 %ige Formaldehydlösung; 0,1 ml H₂O; 0,1 ml Glycerol; 0,08 ml 10 % (w/v) igen Bromphenolblaulösung) versetzt, 10 Min. bei 65 °C inkubiert, auf Eis abgekühlt und eine Elektrophorese 1,5 h bei 80 V in 1 x MOPS durchgeführt.

Die Zugabe von Ethidiumbromid zu den Proben zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/µl ermöglichte die Visualisierung der RNA im Gel mittels eines UV-Transilluminators

2.5.5 Northern-blot

Für einen Northern-blot wurden 5 µg RNA mit 5 x RNA-Ladepuffer in einem Formaldehyd-Agarosegel (s. Kap. 2.5.4) aufgetrennt. Mit 10 x SSC (1,5 M Natriumchlorid; 0,075 M Natriumcitrat; pH 7 mit HCl) wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham) mit Kapillarblottechnik übertragen. Die Membran wurde 2 h bei 80°C gebacken, so dass die DNA an die Membran gekoppelt wurde. Nach einstündiger Prähybridisierung der Membran mit *ExpressHyb* (Clontech) bei 65°C wurde die radioaktiv markierte Sonde (s. Kap. 2.4.12) zugesetzt und über Nacht im Rotationsinkubator bei 65°C belassen. Anschließend wurde die Membran 2 x 30 Min. mit Waschlösung I (2 x SSC; 0,1 % SDS) bei RT und 2 x 30 Min. mit Waschlösung II (0,2 x SSC; 0,1% SDS) je nach gewünschter Stringenz bei 50 bis 65°C gewaschen. Die Membran wurde in SaranTM-Folie eingepackt und die eingebaute Radioaktivität durch 24-stündiges Exponieren eines *PhosphoImager Screens* (Kodak) mittels Autoradiographie detektiert. Zur Aufnahme der Autoradiographien wurde ein *PhosphoImager FMBIO III Multi View* der Firma Hitachi verwendet.

2.5.6 Dot-Blot

Jeweils 5 µg RNA wurden mit 5 x RNA-Ladepuffer (0,75 ml Formamid; 0,15 ml 10 x MOPS; 0,24 ml 37%ige Formaldehydlösung; 0,1 ml H₂O; 0,1 ml Glycerol) versetzt, 10 Min. bei 65°C inkubiert. Für Dot-Blot-Analysen wurde die Apparatur *Minifold I* der Firma Schleicher & Schuell verwendet. Es wurde eine Lage Filterpapier und darüber eine Nylonmembran (Amersham) eingespannt und die Vertiefungen der Apparatur mit 300 µl 10 x SSC durch Vakuumanlegen gespült. Die Proben wurden in 300 µl 10 x SSC in die Vertiefung eingefüllt und die Flüssigkeit auch mittels Vakuum durchgezogen. Die Membran wurde anschließend bei 80 °C 2 h inkubiert. Es erfolgte eine Färbung der Membran mit Methyleneblau (0,5 M Natriumacetat, pH 5,2; 0,04% Methyleneblau) für 5 Min. und danach wurde zum Entfärben ca. 3 Min. mit H₂O_{dd} gewaschen. Durch die Färbung konnte die RNA-Beladung überprüft werden. Danach erfolgten Prähybridisierung und Hybridisierung mit der entsprechenden markierten Sonde wie in Kap. 2.5.5 beschrieben.

2.6 Protein-Analytik

2.6.1 Proteinexpression in *E.coli*

Die cDNA-Sequenz der putativen Kinasedomäne und die cDNA-Sequenz des gesamten *DRK3*-Gens wurden mittels Gateway®-System (s. Kap. 2.4.7) in den Vektor pDEST15 (s. Tabelle 2.4) kloniert. Hierdurch wurde die Kinasedomäne und das Gesamtlängenkonstrukt aminoterminal an GST (Glutathion-S-Transferase) fusioniert. Diese Vektoren wurden in *E.coli* BL21AI™ Zellen transformiert (s. Kap. 2.3.1). Mit einem entsprechend positiv selektionierten und geprüften Klon, wurde eine 5 ml Übernachtskultur bei 37°C und 180 Upm angezogen. Mit dieser wurde anschließend eine 50 ml Kultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei 37°C und 180 Upm inkubiert bis eine OD₆₀₀ von 0,45 erreicht war. Nachdem die Kultur in zwei 25 ml Kulturen geteilt worden war, erfolgte in einer der beiden Kulturen die Induktion der Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 0,01 % (w/v) L-Arabinose. Anschließend wurden die Kulturen für 45 Min. bei 28°C und 180 Upm bzw. für 3 h bei 22°C und 180 Upm inkubiert.

2.6.2 Zellaufschluss

2.6.2.1 Zellaufschluss von BL21AI™-Zellen

Nach Induktion der Expression des GST-Fusionsproteins durch Zugabe von 0,01 % (w/v) L-Arabinose zu den entsprechenden BL21AI™-Kulturen (s. Kap. 2.6.1) und anschließender Inkubation für 45 Min. bei 28°C und 180 Upm bzw. für 3 h bei 22°C und 180 Upm, wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 2200 x g und 4°C für 5 Min. pelletiert. Die Pellets wurden in 1 ml Lysispuffer (3 mM KH₂PO₄; 47 mM K₂HPO₄; 400 mM NaCl; 100 mM KCl; 10 % (v/v) Glycerol; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 10 mM Imidazol und 100 µg/ml Lysozym; pH 7,8 mit HCl) resuspendiert und 15 Min. auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen im 42°C warmen Wasserbad, erfolgte eine Beschallung der Proben mit Ultraschall Impulsen mit einer Ausgangskontrolle von 2 für zweimal 10 Sek. (Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury). Danach wurden die nicht löslichen

Bestandteile durch Zentrifugation bei 20800 x g, 4°C und 3 Min. abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Pellet wurde in 100 µl 1 x SDS-Probenpuffer (50 mM Tris/HCl pH6,8; 2 % (w/v) SDS; 5 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 10 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) aufgenommen und für spätere Analysen mittels SDS-PAGE bei -20°C aufbewahrt.

2.6.2.2 Zellaufschluss von *Saccharomyces cerevisiae*

5 ml Kulturen transformierter Hefezellen des Stammes AH109 wurden über Nacht bei 30 °C und 230 Upm angezogen. Die Kulturen wurden für gerichtete Hefe-Dihybrid-Experimente (s. Kap. 2.6.10 **Error! Reference source not found.**) verwendet. Die verbleibenden Kulturen wurden auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt und jeweils 2 ml Kultur herunterzentrifugiert (20800 x g, RT, 2 Min.) und die Pellets in 60 µl 1 x SDS-Probenpuffer (s. Kap. 2.6.2.1) aufgenommen und auf eine SDS-PAGE (s. Kap. 2.6.5) aufgetragen und Western-blot-Analysen durchgeführt (s. Kap. 2.6.7).

2.6.2.3 Zellaufschluss von *A. thaliana* Protoplasten

2 ml Kulturen transformierter *A. thaliana* Protoplasten (s. Kap. 2.3.3) wurden bei 20800 x g für 1 Min. bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer (s. Kap. 2.6.2.1) aufgenommen und 5 Min. bei 95°C inkubiert. Der Überstand wurde mit 5 ml Methanol über Nacht bei -20°C inkubiert um restliche Proteine zu fällen. Danach wurde dieser Überstand 15 Min bei 20800 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet mit 20 µl 1 x SDS-Probenpuffer (s. Kap. 2.6.2.1) 5 Min. bei 95°C inkubiert und mit dem ersten Pellet vereinigt. Im Anschluss wurden Western-blot-Analysen durchgeführt (s. Kap. 2.6.7).

2.6.3 Proteinaufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Nach der Expression von GST-Fusionsproteinen in BL21AI™-Zellen (s. Kap. 2.6.1) und Zellaufschluss (s. Kap. 2.6.2.1) konnten die Fusionsproteine über *Glutathion Sepharose 4B* (GS4B, Amersham Bioscience) affinitätschromatographisch aufgereinigt werden. Die Reinigung erfolgte nach den Herstellerangaben. Die Expressions- und Reinigungseffizienz wurde mittels SDS-PAGE (s. Kap. 2.6.5) und anschließender Coomassie-Färbung (s. Kap. 2.6.6) oder Western-blot (s. Kap. 2.6.7) ermittelt.

2.6.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

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

2.6.5 Natriumdodezylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach dem Protokoll von Laemmli (Laemmli, 1970) als diskontinuierliche Elektrophorese nach den Angaben von Sambrook und Russell (Sambrook und

Russell, 2001) durchgeführt. Dabei werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Als Acrylamid-Bisacrylamid-Gemisch (37,5:1) wurde eine *Rotiphorese Gel30-Lösung* von der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte mit 10, 12 oder 15 %-igen Trenngelen und 5 %-igen Sammelgelen in Minigelelektrophoresekammern der Firma BioRad in 1 x Tris-Glyzin Elektrophorese-Puffer (5 x Tris-Glyzin Elektrophorese-Puffer: 125 mM Tris; 1,25 M Glyzin pH 8,3; 1 % (w/v) SDS) bei 25 mA/Gel und maximaler Spannung. Die zu analysierenden Proben wurden in 1 x SDS Probenpuffer (s. Kap. 2.6.2.1) 5 Min. bei 95°C denaturiert und nach Abzentrifugation (20800 x g, RT, 1 Min.) auf das Gel aufgetragen. Die Gele wurden anschließend einer Coomassiefärbung (s. Kap. 2.6.6) unterzogen oder für Western-blots (s. Kap. 2.6.7) genutzt. Als Größenstandard wurde *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) verwendet.

2.6.6 Proteinfärbung mit Coomassie Brillant Blau R-250

Zur Kontrolle der Gelbeladung und Prüfung der Reinigungseffizienz wurden Proteine in SDS-Gelen durch Inkubation unter Schütteln ca. 1 h in Coomassie Brillant Blau R-250 Lösung (0,125 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R-250; 50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) angefärbt. Überschüssiger Farbstoff wurde durch zweimalige, dreißigminütige Inkubation in Entfärbelösung I (50 % (v/v) Methanol; 10 % (v/v) Essigsäure) und anschließende Inkubation in Entfärbelösung II (5 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure) entfernt. Das Gel wurde dann entweder auf Blottingpapier mit einem Gelrockner bei 80°C für 2 h getrocknet oder nach dreißigminütiger Inkubation in Trockenlösung (30 % (v/v) Methanol; 5 % (v/v) Glycerol; 65 % (v/v) H₂O) in Gelrocknerfolie (Promega) gewickelt und zur Trocknung in einen Rahmen eingespannt.

2.6.7 Western-blot

Zum Nachweis bestimmter Proteine wurden Western-blots mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die zu analysierenden Proben wurden jeweils mittels SDS-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.6.5) aufgetrennt und mittels einer Apparatur von BioRad nach Herstellerangaben elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham) übertragen. Es erfolgte im Anschluss eine Inkubation für 1 h bis über Nacht bei 4°C in Blockinglösung [5 % (w/v) Milchpulver in PBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1 % (v/v) Tween 20)]. Der jeweilige Antikörper wurde in der entsprechenden Konzentration (s. Tabelle 2-6) in Blockinglösung verdünnt und die Membran darin 1 h bei RT bis über Nacht bei 4°C inkubiert. Sofern notwendig wurde nach Waschen der Membran mit PBST eine Inkubation mit einer sekundären Antikörperlösung vorgenommen. Nachdem die Membran dreimal 10 Min. mit PBST bei RT gewaschen worden war, erfolgte die Detektion der gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP) mittels dem *ECL Western Blotting Detection Kit* (Amersham Biosciences) nach Herstellerangaben. Die Chemolumineszenz wurde durch Auflegen eines Röntgenfilmes (*Amersham Hyperfilm ECL*) und anschließender Entwicklung nachgewiesen.

Tabelle 2-6 Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper und entsprechende Verdünnungen

Antikörper	Detektion von	Verdünnung	Sek. Antikörper	Verdünnung
α - GST-HRP (RPN1237, Amersham)	GST	1:5000		
α - myc (O. Plauz, Tübingen)	myc-tag	1:5000	α - mouse-HRP (A4789, Sigma)	1:10000
α - HA (11867423001, Roche)	HA-tag	1:2000	α - mouse-HRP (A4789, Sigma)	1:10000
α - YFP (S. de Vries, Wageningen)	YFP, GFP	1:5000	α - rabbit-HRP (A9169, Sigma)	1:35000

2.6.8 Kinaseaktivitätstest

Zu Kinaseaktivitätsuntersuchungen wurde sowohl ein Fusionsprotein bestehend aus GST und der Kinasedomäne des DRK3-Proteins, als auch ein Fusionsprotein bestehend aus GST und dem DRK3-Gesamtlängenprotein verwendet. Diese wurden in BL21AITM-Zellen exprimiert (s.Kap. 2.6.1; 2.6.2.1) und mittels GST-Affinitätschromatographie gereinigt (s.Kap. 2.6.2.3).

Für die Kinaseaktivitätsexperimente wurde 1 μ l [γ -³²P]-ATP (12,5 μ Ci) mit 1 μ g des jeweiligen Fusionsproteines mit oder ohne 1 μ g des zu testenden Substrates (MBP [Sigma M1891], Casein [Sigma C4765] + 0,01% TritonX-100 oder Histon [Sigma H5505]) zu 30 μ l mit dem entsprechendem Kinasepuffer (50 mM HEPES; 1 mM DTT; 10 μ M ATP und 10 mM MgCl₂ oder 10 mM MnCl₂ oder 10 mM MnCl₂ + 10 mM MgCl₂ oder 10 mM MgCl₂ + 1 mM CaCl₂) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C bzw. RT inkubiert und nach Zugabe von 7,5 μ l 5 x SDS-Probenpuffer (s. Kap. 2.6.2.1) für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht, um die Reaktion zu stoppen. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (s. Kap. 2.6.5) aufgetrennt und das Gel nach Coomassie-Färbung (s. Kap. 2.6.6) im Geltdrockner auf Blottingpapier getrocknet. Im Anschluss wurde die eingebaute Radioaktivität durch 24-stündiges Exponieren eines *PhosphorImager Screens* (Kodak) mittels Autoradiographie detektiert. Zur Aufnahme der Autoradiographien wurde ein *PhosphorImager FMBIO III Multi View* der Firma Hitachi verwendet.

2.6.9 Suche nach Interaktionspartnern mittels des Hefe-Dihybrid-Systems

Das Hefe-Dihybrid-System bietet die Möglichkeit Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen zu detektieren und zu analysieren. Der Hefe-GAL4-Transkriptionsfaktor wird in diesem System verwendet, da dieser aus einer DNA-Bindedomäne (GAL4BD) und einer Transkriptionsaktivierungsdomäne (GAL4AD) besteht, die leicht getrennt voneinander exprimiert werden können. Über die DNA-Bindedomäne werden GAL-Promotoren erkannt und sequenzspezifisch gebunden, die Transkriptionsaktivierungsdomäne hingegen erlaubt die Rekrutierung verschiedener Komponenten, die für die Initiation der Transkription von Bedeutung sind. Dieses System erlaubt es eine cDNA-Bibliothek auf positive Interaktoren eines beliebigen

Proteins zu testen. Hierzu wird eine beliebige cDNA-Bibliothek in den Vektor pGADT7-Rec rekombiniert, so dass GAL4AD-Fusionsproteine in Hefe exprimiert werden können. Das zu testende Protein wird in den Vektor pGBKT7-GW und ist damit als GAL4BD-Fusion in Hefe exprimierbar (s. Abb. 2-1). Anschließend wird ein Hefe-Dihybrid-Screen durchgeführt. Bei Interaktion zweier Fusionsproteine kann die Funktionalität des GAL4-Proteins wieder hergestellt werden. Dies resultiert in der Aktivierung verschiedener Reportergene im Hefegenom. Es werden drei Reportergene, die von verschiedenen GAL-Promotoren reguliert werden, aktiviert. Der *GAL1*-Promotor kontrolliert das *HIS3*-Gen, durch dessen Produkt ein Defekt in der Histidinbiosynthese komplementiert werden kann. Das *ADE2*-Gen wird von dem *GAL2*-Promotor reguliert, durch dessen Aktivierung ein Defekt in der Adeninbiosynthese komplementiert werden kann. Außerdem befindet sich das für β -Galaktosidase kodierende *MEL1*-Gen unter der Kontrolle des *MEL1*-Promotors (s. Abb. 2-1). Auf Interaktion kann demnach mittels Adenin- und Histidin-Mangelmedien (SD-HALW) selektioniert werden.

Aus den Vektoren pGBKT7 und pGADT7 von Clontech (s. Kap. 2.1.4) wurden mittels des Gateway® Vector Conversion kits von Invitrogen nach Angaben des Herstellers die gatewaykompatiblen Vektoren pGBKT7-GW und pGADT7-GW (s. Kap. 2.1.4) kloniert. Die cDNA des N-Terminus, der Kinasedomäne bzw. des gesamten *DRK3*-Gens wurde in den Vektor pGBKT7-GW durch Gateway®-Klonierung (s. Kap. 2.4.7) rekombiniert und somit die *bait*-Vektoren hergestellt. Der Hefestamm Y187 (s. Kap. 2.1.3) wurde mit den *bait*-Vektoren transformiert, wobei die Selektion der positiven Transformanden auf SD-T-Medium erfolgte. Zur Verifizierung der Klone wurde eine Hefe-Minipräparation (s. Kap. 2.4.2.5) durchgeführt und die erhaltene Plasmid-DNA in *E.coli* DH5 α -Zellen retransformiert (s. Kap. 2.3.1). Nach Plasmid-Minipräparation (s. Kap. 2.4.2.1) wurde die Plasmid-DNA durch Restriktionsanalysen (s. Kap. 2.4.4) überprüft. Um Autoaktivierungsreaktionen ausschließen zu können, wurden positiv selektierte Hefeklone auch auf Interaktionsselektionsmedien SD-HLW und SD-HALW ausgestrichen.

Es wurde außerdem eine cDNA-Bibliothek aus pathogeninduzierten *Arabidopsis* WT-Col-0-Pflanzen in dem Hefestamm AH109 hergestellt (s. Kap. 2.4.14). In dieser werden die cDNA-Fragmente mit der GAL4AD kodiert.

Mittels Hefe-Paarung (s. Kap. 2.3.7) konnten die Hefestämme Y187, die die verschiedenen *DRK3-bait*-Konstrukte tragen mit dem Stamm AH109, der die cDNA-Bibliothek enthält, kombiniert werden. Auf SD-HALW bzw. SD-HLW wachsende Kolonien wurden genauer analysiert. Die Benutzung des Selektionsmedium SD-HALW führt zu einer höheren Stringenz, hat aber den Nachteil, dass schwächer interagierende Klone nicht identifiziert werden können. Deshalb wurde auch das Medium SD-HLW genutzt. Somit konnten mehr positive Klone identifiziert werden. Diese wurden anschließend auf SD-HALW umgesetzt und nur diejenigen Klone weiteranalysiert, die auch in der Lage waren auf diesem Medium zu wachsen. Alle Klone wurden erneut auf SD-HALW umgesetzt und aus den überlebenden Kolonien wurden Plasmide isoliert (s. Kap. 2.4.2.5) und in DH5 α -Zellen retransformiert (s. Kap. 2.3.1). Die aus diesen Zellen isolierten Plasmide (s. Kap. 2.4.2.1) wurden mittels PCR auf Vorhandensein eines Inserts

(Primer 5'ADLDinsert und 3'ADLDinsert, s. Anhang 7.1) und auf Codierung der autoaktivierenden bzw. im falschen Leserahmen kodierten Gene At4g03280 (*PETC*), At1g08450 (*CRT3*) und At2g38240 (putative Anthocyanidinsynthase) getestet (s. Kap. 3.6.2, Primer T7 und At4g03280-R bzw. At1g08450-R bzw. At2g38240-R, s. Anhang 7.1). Klone, die ein Insert enthielten und keines der getesteten autoaktivierenden Gene kodierten, wurden mit dem Primer T7 (s. Anhang 7.1) ansequenziert (s. Kap. 2.4.15) und das enthaltene Insert mittels *NCBI blast* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) identifiziert.

Zur Kontrolle der Funktionalität des Systems wurde parallel der Kontrollvektor pGBKT7-53 von Clontech in Y187-Zellen transformiert. Ein positiv selektionierter Hefeklon wurde dann mit AH109 mit pGADT7-T (Clontech) gepaart (s. Kap. 2.3.7). Von pGBKT7-53 wird das Maus-Tumorsuppressorgen p53 als Fusion mit GAL4BD und von pGADT7-T das Gen des großen T-Antigens des SV40 Tumovirus als Fusion mit GAL4AD kodiert. p53 und das T-Antigen sind für ihre Interaktionsfähigkeit bekannt und können deshalb zur Kontrolle verwendet werden (Li und Fields, 1993).

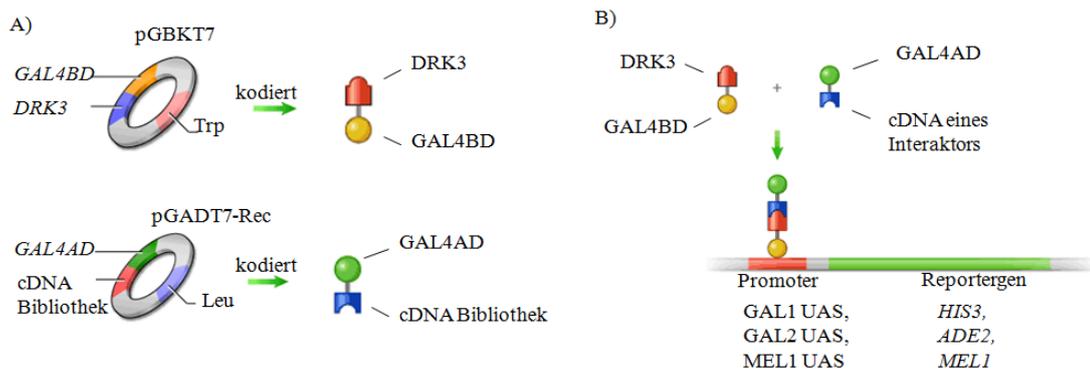


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung der Funktionsweise des Hefe-Dihybrid-Systems

A) Es sind die eingesetzten Vektoren und die kodierten Fusionsproteine dargestellt.

B) Es wird gezeigt, dass die Interaktion des DRK3-Proteins mit einem beliebigen Protein der cDNA-Bibliothek zur Aktivierung verschiedener Reportergene im Hefegenom führt. (Abb. modifiziert nach <http://www.bioteach.ub.ca>)

2.6.10 Gerichtete Hefe-Dihybrid-Experimente

Um die Interaktion zwischen verschiedenen Protein im gerichteten Hefe-Dihybrid-Experiment zu testen, wurden die jeweiligen Kandidaten in den Hefestamm AH109 kotransformiert und dann ein Wachstumstest auf Interaktionsselektionsmedium (SD-HALW) durchgeführt.

Es wurden jeweils drei Klone der zu testenden Transformanden 24 h bei 30 °C und 230 Upm angezogen und die OD₆₀₀ gemessen. Alle Klone wurden auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt und diese erneut kontrolliert. Es wurden jeweils drei Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000) hergestellt und 7,5 µl hiervon auf SD-LW bzw. SD-HALW aufgetropft. Wachstum wurde nach 2 Tagen auf SD-LW und nach 4-6 Tagen auf SD-HALW dokumentiert.

Um die Expression der DRK3-Proteinfragmente in den transformierten Zellen zu prüfen, wurde parallel ein Hefeaufschluss (s. Kap. 2.6.2.2) und anschließend ein Western-blot (s. Kap. 2.6.7) mit den verwendeten Klonen durchgeführt.

2.6.11 Lasergestützte Konfokalmikroskopie

Zur Analyse der zellulären Lokalisation verschiedener DRK3-Proteinfragmente bzw. des RLM3-Proteins *in vivo*, wurden die entsprechenden kodierenden Sequenzen mittels Gateway®-Rekombination (s. Kap. 2.4.7) in den Vektor pK7FWG2 bzw. p2GWR7 kloniert (s. Kap. 2.1.4). Nach Transformation in *Arabidopsis* Protoplasten (s. Kap. 2.3.3) wurde die Lokalisation der exprimierten GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine analysiert. Das eGFP- bzw. RFP-Fluoreszenzsignal wurde mit dem Laserkonfokalmikroskop *TCS SP2* von Leica (Heidelberg) und der vom Hersteller mitgelieferten *Software Leica Confocal Software, Version 2.5* visualisiert. Die eGFP-Fluoreszenz wurde dabei mit einem Argon/Krypton Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht bei 500-530 nm detektiert. Die RFP-Fluoreszenz wurde mit 561 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 570-630 nm aufgenommen. Außerdem wurden BiFC-Studien (s. Kap. 2.6.12) durchgeführt und hierbei die YFP-Fluoreszenz mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt und die Detektion erfolgte zwischen 525-600 nm.

2.6.12 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC)

Interaktionsstudien wurden mittels BiFC durchgeführt. Bei diesem System werden zwei zu testende Proteine als Fusion mit dem N- bzw. C-terminalen Teil eines YFP-Proteins in *Arabidopsis* Protoplasten exprimiert. Die verwendeten Vektoren sind pUC-SPYNE bzw. pUC-SPYCE (Walter *et al.*, 2004). Weder die N- noch die C-terminale Hälfte des YFP-Proteins sind in der Lage alleine YFP-Fluoreszenz zu zeigen. Wenn aber die beiden Teile des YFP-Proteins in räumliche Nähe kommen, wird die YFP-Fluoreszenz wiederhergestellt. Räumliche Nähe der beiden Hälften kann durch Interaktion der Fusionsproteine erreicht werden (s. Abb. 2-2).

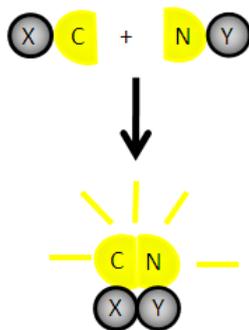


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung der Funktionsweise von BiFC

In *Arabidopsis* Protoplasten werden zwei Fusionsproteine coexprimiert. Ein Protein X wird mit dem C-terminalen Teil und ein Protein Y mit dem N-terminalen Teil des YFP-Proteins exprimiert. Interagieren X und Y, so kommen der C- und der N-terminale Teil von YFP in enge räumliche Nachbarschaft und YFP-Fluoreszenz kann angeregt werden.

Es sollte getestet werden, ob die DRK3 mit RLM3 interagiert. Hierfür wurden die entsprechenden Fragmente in die Vektoren pUC-SPYNE, pUC-SPYNE153Stop (K.Weckermann) bzw. pUC-SPYCE kloniert (s. Kap. 2.4.8.1). Diese Plasmide wurden dann in Protoplasten transformiert (s. Kap. 2.3.3) und mittels Konfokalmikroskopie (s. Kap. 2.6.11) die YFP-Fluoreszenz analysiert.

2.6.13 Co-Immunopräzipitation aus transient transformierten *N. benthamiana*-Pflanzen

Eine weitere Methode um die Interaktion der DRK3 mit RLM3 zu testen waren Co-Immunopräzipitationsexperimente aus transient transformierten *N.benthamiana* Pflanzen. Es wurden die zu analysierenden Sequenzen der DRK3 und von RLM3 mittels Gateway®-

Rekombination (s. Kap. 2.4.7) in die Vektoren pK7FWG2 bzw. pGWB20 kloniert, so dass die entsprechenden eGFP bzw. myc-Fusionsproteine in Tabak exprimiert werden konnten. Diese Konstrukte wurden erst in *Agrobacterium tumefaciens* (s. Kap. 2.3.2) und diese danach in Tabak transformiert (s. Kap. 2.3.5). Blattmaterial wurde nach 2 bis 3 Tagen geerntet und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Es wurden jeweils 100 mg Blattmaterial mit 200 µl Proteinextraktionspuffer [50mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 % Triton, 1 *protease inhibitor cocktail tablet* von Roche (04693124001 complete mini) / 10 ml] versetzt und weiter gemörsert. Anschließend wurden 400 µl Proteinextraktionspuffer (ohne Triton) zugefügt. 40 µl *anti-c-myc-Agarose conjugate* (A7470, Sigma) wurden nach Angaben des Herstellers 5 Mal mit 1 ml 1 x PBS (50 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) gewaschen und der Proteinextrakt hinzugegeben. Der Ansatz wurde 1,5 h bei 4 °C auf dem Rotationsmischer inkubiert. Die c-myc-Agarose wurde danach 4 Mal mit 1 x PBS gewaschen, mit 40 µl 1 x SDS-Probenpuffer 5 Min. bei 95 °C aufgekocht und dann mittels SDS-PAGE (s. Kap. 2.6.5) aufgetrennt. Es wurde je ein Western-blot mit einem anti-myc- bzw. einem anti-GFP-Antikörper (s.Kap. 2.6.7) durchgeführt.

2.7 Phänotypische Pflanzenversuche

2.7.1 Analyse des Expressionsmusters des *DRK3*-Gens in *Arabidopsis*

Um das Expressionsmuster des *DRK3*-Gens nach bestimmten Behandlungsmethoden zu analysieren, wurden *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen verschiedenen Bedingungen ausgesetzt (s. unten) und im Anschluss zu verschiedenen Zeiten Blattmaterial geerntet und daraus RNA (s. Kap. 2.5.1) isoliert. Dann wurde cDNA mittels reverser Transkription hergestellt (s. Kap. 2.5.3). Durch genspezifische PCR (s. Kap. 2.4.9.1) und anschließende Auftrennung der Produkte in einem 1,2 %-igem (w/v) Agarosegel (s. Kap. 2.4.10), konnte das Expressionsniveau des *DRK3*-Gens bei den verschiedenen Bedingungen verglichen werden.

Zur Analyse des Expressionsmusters des *DRK3*-Gens nach Pathogeninokulation, wurden je 2 Blätter 6 Wochen alter *Arabidopsis* WT-Col-0 Pflanzen, die unter Kurztagsbedingungen angezogen worden waren, mit verschiedenen Pathogenen infiltriert. Die Bakterienstämme *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000 (virulent), *Pto* avrRpm1 (avirulent), *Pto* hrcC⁻ (apathogen) und *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*, Nichtwirtspathogen) wurden in 50 ml Übernachtskultur in King's B-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen (s. Kap. 2.2.2). Die Bakterien wurden bei 1300 x g, 4°C für 6 Min. pelletiert und die Pellets zweimal mit 10 mM MgCl₂ gewaschen. Anschließend wurden die Bakterien mit 10 mM MgCl₂ auf eine OD₆₀₀ von 0,2 (entspricht 1 x 10⁸ KBE/ml) eingestellt. Diese Bakteriensuspensionen wurden in die Blattunterseite mit Hilfe einer nadellosen Spritze infiltriert und dann je 2 Blätter pro Probe von je 3 Pflanzen nach 6 und 24 h geerntet. Zur Kontrolle wurde eine 10 mM MgCl₂-Lösung infiltriert und auch drei Proben von unbehandelten Pflanzen geerntet.

Zur Analyse des Expressionsmusters des *DRK3*-Gens nach Verwundung, wurden *Arabidopsis* WT-Col-0 Pflanzen 6 Wochen unter Kurztagsbedingungen angezogen (s. Kap. 2.2.6). Es wurden pro Pflanze je 2 Blätter durch Schneiden mit einer Rasierklinge und anschließendes Quetschen

mit einer Pinzette verletzt und je 2 Blätter pro Probe von je 3 Pflanzen pro Zeitpunkt geerntet. Das Material wurde nach 0 Min., 30 Min., 1 h und 24 h geerntet.

6 Wochen alte WT-Col-0 Pflanzen wurden für die Analyse des Expressionsmusters des *DRK3*-Gens nach Hormonbehandlung mit einer 50 μ M Methyljasmonat-Lösung (aus einer 50 mM Stammlösung in absolutem Ethanol verdünnt zu 50 μ M in 5 mM Tris/HCl pH 7,5 und 0,005 % (v/v) Silwet L-77) besprüht. Kontrollpflanzen wurden mit einer Lösung aus der entsprechenden Menge absolutem Ethanol in 5 mM Tris/HCl pH 7,5 und 0,005 % (v/v) Silwet L-77 besprüht. Es wurden je 2 Blätter pro Probe von je 3 Pflanzen nach 0 Min., 1 h, 3 h und 24 h geerntet.

2.7.2 Infektionsstudien mit verschiedenen Pathogenen

Es wurden mit einer *DRK3-knockout*-Linie, *DRK3-sense*- und RNA-Interferenz-Linien (s. Kap. 3.2) verschiedene Pathogeninfektionsstudien durchgeführt. Für alle Versuche mit pflanzlichen Pathogenen wurden 6 Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Es wurden Bakterienwachstumsversuche mit verschiedenen *Pseudomonas* Stämmen und pilzliche Infektionsstudien mit den nekrotrophen Pilzen *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* durchgeführt.

2.7.2.1 Bakterienwachstum in planta

Es wurden 6 Wochen alte, unter Kurztagbedingungen angezogene *Arabidopsis* Pflanzen verwendet. Die benötigten *Pseudomonas* Kulturen wurden in 50 ml Übernachtskultur in King's B-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen (s. Kap. 2.2.2) und anschließend bei 1300 g, 4 °C für 10 Min. pelletiert und 2 x mit 10 mM $MgCl_2$ gewaschen und eine OD_{600} von 0,2 (entspricht 1×10^8 KBE / ml) eingestellt. Diese Suspension wurde dann auf 1×10^4 bzw. 1×10^5 KBE / ml verdünnt und auf der Blattunterseite mit einer nadellosen Spritze in jeweils ein Blatt pro Pflanze infiltriert. Proben wurden nach 0, 1, 2 und 4 Tagen genommen. Aus den infizierten Blättern wurden jeweils zwei Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestochen und in 100 μ l 10 mM $MgCl_2$ mit einem mechanischen Rührwerk (Heidolph RZR 2020) gemörsert. Die Suspension wurde 1:10, 1:100, 1: 1000, 1: 10^4 und 1: 10^5 in 10 mM $MgCl_2$ verdünnt und auf LB-Agar mit den entsprechenden Antibiotika (außerdem waren 50 μ g/ml Cycloheximid enthalten, um Pilzwachstum zu unterbinden) aufgetragen. Nach zweitägiger Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien gezählt. Es wurde das arithmetische Mittel der Parallelen und die jeweilige Standardabweichung bestimmt.

2.7.2.2 Pilzwachstum in planta

Alternaria brassicicola Sporen wurden präpariert (s. Kap. 2.2.5) und die Sporensuspension (1×10^6 Sporen/ml) auf 2 Blätter pro Pflanze getropft. Es wurden pro Blatt auf zwei Stellen 5 μ l Sporensuspension aufgebracht. Die Aufbewahrung der Pflanzen erfolgte danach bei 100 % Luftfeuchte. Nach entsprechenden Tagen wurde der Infektionsgrad der Pflanzen nach (Kemmerling *et al.*, 2007) bestimmt.

Botrytis cinerea Sporen wurden, wie in Kap. 2.2.5 beschrieben, isoliert. 5 μ l Sporensuspension (5×10^5 Sporen/ml) in $\frac{3}{4}$ PDB-Medium wurden auf jeweils zwei Stellen pro Blatt

getropft. Die Pflanzen wurden anschließend bei 100 % Luftfeuchte aufbewahrt. Der Infektionsgrad wurde nach bestimmten Tagen wie für *Alternaria brassicicola* bestimmt.

2.7.3 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) - Färbung

Um die Entwicklung reaktiver Sauerstoffspezies zu detektieren, wurde eine DAB-Färbung durchgeführt. Es wurden jeweils zwei Blätter der zu untersuchenden Pflanzen mit 1×10^8 KBE/ml *Pto* DC3000 infiltriert und nach entsprechender Infektionszeit abgeschnitten und in 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) – Lösung (Sigma, 1 mg/ml) für ca. 2 Min. vakuumfiltriert. Die DAB-Lösung wurde abgenommen und die Blätter bei 100 % Luftfeuchte im Dunkeln für 5 h bei RT inkubiert. Danach wurde zur Entfärbung 70 % Ethanol dazu gegeben und nach mehrmaligem Wechseln des Ethanols die Blätter mit einem Durchlichtmikroskop analysiert.

2.7.4 Trypanblau-Färbung

Diese Färbung dient der Detektion von Zelltod in Blattgewebe. Es wurden jeweils zwei Blätter der zu untersuchenden Pflanzen mit 1×10^8 KBE/ml *Pto* DC3000 infiltriert und nach entsprechenden Tagen abgeschnitten und in Trypanblaulösung (10 ml Milchsäure, 10 ml Glycerol, 10 ml Aqua-Phenol, 10 ml H₂O_{dd}, 300 mg Trypanblau, 80 ml Ethanol) für 30 Sek. in einem kochenden Wasserbad inkubiert. Die Entfärbung der Blätter erfolgte anschließend mit 1 g/ml Chloralhydratlösung (Sigma). Die Blätter wurden nach vollständiger Entfärbung mit einem Durchlichtmikroskop analysiert.

2.7.5 Bestimmung des Hormongehaltes in *Arabidopsis*

Der Gehalt der verschiedenen Hormone Jasmonsäure, Salizylsäure, Indolessigsäure und Camalexin wurde von Karl Wurster, ZMBP Tübingen, bestimmt. Hierzu wurden alle Blätter von WT-Col-0- bzw. *drk3-1*-Pflanzen entweder mit 1×10^8 KBE/ml *Pto* DC3000, *Pto* ΔavrPto/PtoB oder 10 mM MgCl₂ als Kontrolle infiltriert. Nach 24 h wurden von jeder Pflanze ca. 250 mg Blattmaterial geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde von Karl Wurster der Gehalt an freier bzw. hydrolysiertes Jasmonsäure, Salizylsäure, Indolessigsäure und Camalexin bestimmt. Hierzu wurde das Pflanzenmaterial mit 5 mm Stahlkugeln in der Retschmühle 1 Min. bei 30 Hz unter flüssigem Stickstoff zerkleinert. Zu den Proben wurde jeweils 1,5 ml saures Ethylacetat (150 ml Ethylacetat, 200 µl Ameisensäure, 49,68 µl einer Stammlösung von 8 ng/µl 3- und 4-Hydroxybenzoesäure und 59,59 µl einer Stammlösung von 80 ng/µl Dihydrojasmonsäure als interner Standard) gegeben. Die Proben wurden 100 Min. bei 25°C inkubiert und nach Entfernung der Kugeln 10 Min. bei 20800 x g und RT zentrifugiert. 1 ml der Oberphase wurde abgenommen und nach Verdunstung von etwa 2/3 des Ethylacetates wurden die Proben über Nacht bei 100 mbar Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Die Unterphase wurde später weiterverarbeitet (s. unten). Den Proben wurde nun 70 µl N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA, Macherey & Nagel) zugesetzt, 60 Min. bei 40°C geschüttelt und zentrifugiert. Dann wurden die Proben in GC-MS Röhren überführt und 1 µl aus 70 µl injiziert. Die Analyse erfolgte mit GC/MS (*Agilent 6890 GC und Agilent 5973 single quad mass spectrometer*, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) über eine gesplittete

Injektionsmethode und eine SPB-50 Säule (30 m, 0.25 mm interner Durchmesser, *Supelco*, Sigma-Aldrich, München). Die GC-Ofen-Temperatur wurde 5 Min. auf 70°C gehalten, dann um 5°C pro Minute bis auf 280°C erhöht und für weitere 10 Min. auf 280°C gehalten. Helium diente als Trägergas mit einer Flussrate von 1 ml/Min. Die Detektion der Analyte erfolgte mit *electron ionization* (EI) *single quadrupole mass spectrometry* ausgeführt als *selected ion monitoring* (SIM).

Zur Bestimmung der gebundenen Hormone, wurde die Unterphase weiterverarbeitet. Nach ca. 40 minütiger Trocknung im Abzug, wurden 200 µl 3 M HCl zu den Proben gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Nach Neutralisation mit 3 M Ammoniaklösung, wurde 1 ml saures Ethylacetat hinzugegeben, um die hydrolysierten Verbindungen zu extrahieren. Die Proben wurden 100 Min bei 25 °C geschüttelt und 10 Min. bei 20800 x g und RT zentrifugiert. 700 µl der Oberphase wurden abgenommen und nach Verdunstung von ca. 2/3 des Ethylacetates über Nacht bei 100 mbar über Phosphorpentoxid getrocknet. Den Proben wurde nun wiederum 70 µl N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoracetamid (MSTFA, Macherey & Nagel) zugesetzt. Nach Schütteln für 60 Min. bei 40°C und Zentrifugation, wurden die Proben in GC-MS Röhrchen überführt und 1 µl aus 70 µl injiziert. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben.

2.7.6 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Programmes *Microsoft Office Excel* (© Microsoft Corporation) vorgenommen. Um zu testen, ob die Unterschiede zwischen verschiedenen Wertepaaren signifikant sind, wurde eine Einfaktorielle Varianzanalyse (Anova) durchgeführt. Als signifikant wurden p-Werte < 0,05 eingeschätzt.

2.8 Datenbankanalysen

Zur Analyse der Daten aus *Microarray*-Experimenten wurden diese aus dem *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) entnommen. Außerdem wurden die Datenbanken von *PlantsP* (<http://plantsp.sdsc.edu/>), *MIPS* (<http://mips.gsf.de/>), *TAIR* – *The Arabidopsis Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) und *ExpASY* (<http://www.expasy.org/>) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsmuster des *DRK3*-Gens

In Pflanzen laufen in unterschiedlichen Entwicklungsstufen, in verschiedenen Geweben und Organen und auch bedingt durch äußere Reize unterschiedliche Reaktionen ab. Folglich müssen bestimmte Gruppen von Genen oder ihre Produkte aktiviert bzw. deaktiviert werden, um eine bestmögliche Reaktion zu ermöglichen. Die Regulation kann unter anderem durch Veränderung der Transkriptmenge erfolgen.

Im Projekt *AtGenExpress* (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>) wurden die Transkriptmengen von *A. thaliana* Genen mittels *Microarray*-Experimenten entwicklungsabhängig und nach bestimmten Stressbedingungen detektiert. Die Daten sind unter anderem im *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) zugänglich und ermöglichen eine Visualisierung der Regulation verschiedener Gene auf Transkriptebene.

Aus diesen *Microarray*-Daten ging hervor, dass die Transkriptmenge von 49 rezeptorähnlichen Kinasen (RLKs) durch Pathogeninfektion oder PAMP-Exposition beeinflusst wird (Postel *et al.*, 2009). Eine dieser RLKs ist der PAMP-Rezeptor FLS2. Die Expression von FLS2 wird durch seinen Liganden flg22 induziert. Somit stellt sich die Frage, ob auch einige der anderen pathogen- oder elizitorinduzierten RLKs eine Funktion in Immunabwehrreaktionen besitzen. Eine der pathogeninduzierten RLKs unbekannter Funktion ist die Kinase *DRK3* (*defence-related receptor kinase 3*). Es wurde in dieser Arbeit zuerst geprüft, ob das *DRK3*-Gen tatsächlich eine Funktion in Abwehrreaktionen besitzt und diese dann genauer analysiert.

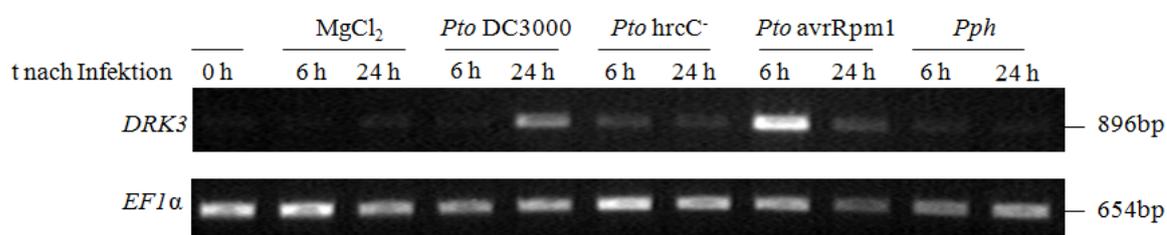
3.1.1 Aktivierung der Expression des *DRK3*-Gens durch Pathogene und Elizitoren

In Tabelle 3-1 sind die *Microarray*-Daten (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, TAIR-ME00331) der Expression des *DRK3*-Gens nach Pathogeninfektion in tabellarischer Form dargestellt. Es sind die relativen Werte in Bezug auf mit MgCl₂-Lösung-behandelte Kontrollpflanzen aufgelistet. Die absoluten Daten wurden von *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) entnommen und sind in Anhang 7.9 gezeigt. Es wird als Aktivierung der Genexpression angesehen, wenn die relativen Werte größer als zwei sind. Eine Repression der Transkription wird bei Werten kleiner 0,5 angesetzt. Es ist zu erkennen, dass eine 3,4- bzw. 4,2-fache Aktivierung der Transkription des *DRK3*-Gens durch das virulente Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000 6 bzw. 24 Stunden nach Inokulation erfolgt. Außerdem ist eine Aktivierung um das 2,3- bzw. 3,2-fache durch das avirulente Pathogen *Pto* avrRpm1 zu erkennen. Auch das Nichtwirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) bewirkt eine leichte Erhöhung der Expression des *DRK3*-Gens nach 24 h. Inokulation des apathogenen *Pto* hrcC, das eine Mutation im *hrcC*-Locus trägt und deshalb kein funktionelles Typ-III-Sekretionssystem ausbilden kann, führt jedoch zu keiner Erhöhung des Transkriptlevels in diesem Experiment.

Tabelle 3-1 Relative Werte der *Microarray*-Daten der pathogenabhängigen Expression des *DRK3*-Gens*

Zeit nach Infektion	6 h	24 h
<i>Pto</i> DC3000	3,4	4,2
<i>Pto</i> hrcC ⁻	0,7	1,5
<i>Pto</i> avrRpm1	2,3	3,2
<i>Pph</i>	0,8	2,2

Diese Ergebnisse konnten teilweise durch RT-PCR (s. Kap. 2.5.3; 2.4.9.1) bestätigt werden. In Abb. 3-1 ist zu erkennen, dass eine deutliche Induktion der Expression des *DRK3*-Gens durch Behandlung mit *Pto* DC3000 nach 24 h und *Pto* avrRpm1 nach 6 h erfolgt. Eine Induktion durch *Pph* konnte jedoch nicht gezeigt werden. Da in den Kontrollen keine Aktivierung der Transkription erfolgt, wird die Expression nicht durch die Art der Applikation beeinflusst, sondern wird eindeutig durch die Pathogeninfektion hervorgerufen.

Abbildung 3-1 RT-PCR nach Infiltration von *Pto* DC3000, *Pto* hrcC⁻, *Pto* avrRpm1 und *Pph*

Es wurden Blätter von *Arabidopsis* Col-0 Pflanzen mit 10^8 KBE/ml Bakteriensuspension des entsprechenden *Pseudomonaden*-Stammes oder 10 mM $MgCl_2$ -Lösung als Kontrolle inokuliert (s. Kap. 2.7.1). Nach 6 und 24 h wurde mittels semiquantitativer RT-PCR (s. Kap. 2.5.3, s. Kap. 2.4.9.1) mit den Primern NeuAt4g10390-5' und At4g10390-3' (s. Anhang 7.1) die Expression des *DRK3*-Gens bestimmt. Eine *EF1α*-spezifische PCR mit den Primern *ef1α-s* und *ef1α-as* (s. Anhang 7.1) diente dazu die eingesetzten cDNA-Mengen anzugleichen. Als Nullwert (0 h) wurde die Expression des *DRK3*-Gens in unbehandelten Blättern bestimmt. Es wurden zwei Wiederholungen des Experimentes durchgeführt.

Die MAMPs HrpZ (Lee *et al.*, 2001a), GST-NLP_{pp} (Fellbrich *et al.*, 2002), Flg22 (Felix *et al.*, 1999) oder LPS (Meyer *et al.*, 2001) wurden auch für *Microarray*-Analysen in *Arabidopsis* Pflanzen inokuliert. Als Kontrolle wurde GST für NLP_{pp}, eine Mg^{2+} / Ca^{2+} - Ionen enthaltende Lösung für LPS oder Wasser für HrpZ und Flg22 inokuliert und Blattmaterial nach 1 und 4 h geerntet (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, TAIR-ME00332). In Tabelle 3-2 sind die relativen Werte der Expression des *DRK3*-Gens in diesen Versuchen dargestellt. Im Anhang 7.9 sind die absoluten Expressionsdaten (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) aufgelistet. Durch keinen der Elizitoren wird eine Induktion oder Repression der Transkription des *DRK3*-Gens ausgelöst.

* Farbcode: gelb = 2-2,9-faches, orange = 3-3,9-faches, rot = mehr als 4-faches relatives Fluoreszenzsignal
blau = weniger als 0,5-faches relatives Fluoreszenzsignal

Tabelle 3-2 Relative Werte der *Microarray*-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Elizitor-Behandlung*

Zeit nach Inokulation	1 h	4 h
HrpZ	1,2	1
GST-NLP _{Pp}	1,5	0,9
Flg22	1,1	0,9
LPS	1,3	1

Die relativen Werte der Expression des *DRK3*-Gens nach Infektion von *Arabidopsis* Pflanzen mit Sporen des nekrotrophen Pilzes *Botrytis cinerea*, des biotrophen Pilzes *Erysiphe orontii* und des Oomyceten *Phytophthora infestans* sind in Tabelle 3-3 dargestellt (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, TAIR-ME00341, TAIR-ME00342, TAIR-ME00354). Es wird ersichtlich, dass die Expression des *DRK3*-Gens nach 18 und 48 h durch die Applikation der Sporenlösung von *Botrytis cinerea* deutlich induziert wird. Es ist jedoch keine Induktion der Expression des *DRK3*-Gens durch *E. orontii* oder *P. infestans* zu erkennen.

Tabelle 3-3 Relative Werte der *Microarray*-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Infektion mit *B. cinerea*, *E. orontii* und *P. infestans* (- dieser Wert wurde nicht bestimmt)*

Zeit nach Infektion	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h
<i>B. cinerea</i>	-	-	2,2	-	4,2
<i>E. orontii</i>	0,7	0,8	0,7	1	0,6
<i>P. infestans</i>	1,4	1,1	-	0,9	-

3.1.2 Expression des *DRK3*-Gens nach Hormonbehandlung und abiotischem Stress

Zu sieben Tage alten *Arabidopsis* Keimlingen in MS-Medium wurde 1 μ M Gibberellin, 10 μ M Abszissinsäure, 10 μ M Methyljasmonat, 1 μ M Indolessigsäure, 10 μ M 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) oder 10 nM Brassinolid zugesetzt und *Microarray*-Experimente durchgeführt (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, TAIR-ME00334, TAIR-ME00337, TAIR-ME00336, TAIR-ME00333, TAIR-ME00343, TAIR-ME00335). Die Ergebnisse der Expression des *DRK3*-Gens sind in Tabelle 3-4 zusammengefasst, die absoluten Daten (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) befinden sich in Anhang 7.9. Es ist eindeutig zu erkennen, dass die Expression des *DRK3*-Gens über den gesamten analysierten Zeitraum auf das bis zu 5,9-fache durch Behandlung mit Methyljasmonat aktiviert wird. Die Induktion durch Methyljasmonat konnte mit RT-PCR bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Außerdem scheint Abszissinsäure das Transkriptionslevel nach 3 h auf 1/3 zu vermindern.

* Farbcode: gelb = 2-2,9-faches, orange = 3-3,9-faches, rot = mehr als 4-faches relatives Fluoreszenzsignal
blau = weniger als 0,5-faches relatives Fluoreszenzsignal

Tabelle 3-4 Relative Werte der *Microarray*-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Hormonbehandlung*

Zeit nach Applikation	30 Min.	1 h	3 h
Abszinsäure	0,8	0,6	0,3
Gibberelin	1	0,9	1
Indolessigsäure	1,8	1,2	1,1
Brassinolid	0,7	1,3	0,8
ACC	0,8	1,1	0,9
Methyljasmonat	4,8	5,9	4

Um die Analyse des Expressionsmusters des *DRK3*-Gens abzuschließen, wurden auch Veränderungen der Transkriptmenge nach Behandlung mit abiotischen Stressoren charakterisiert (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, TAIR-ME00325, TAIR-ME00338, TAIR-ME00339, TAIR-ME00327, TAIR-ME00340, TAIR-ME00328, TAIR-ME00330). Laut diesen *Microarray*-Daten erfolgt eine Induktion der Expression des *DRK3*-Gens nach Verwundung nach einer halben bzw. einer Stunde auf das 5,4- bzw. 8,6-fache (s. Tabelle 3-5). Dies konnte durch RT-PCR bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Auch durch Trockenheit wird in *Microarray*-Experimenten die Transkriptmenge erhöht. Durch Hitzestress scheint eine Verringerung auf das 0,4-fache nach 30 Min. und durch Salzstress eine Erhöhung der Transkriptmenge des *DRK3*-Gens auf das 2,3-fache nach 24 h zu erfolgen.

Tabelle 3-5 Relative Werte der *Microarray*-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach abiotischem Stress*

Zeit nach Behandlung	30 Min.	1 h	24 h
Verwundung	5,4	8,6	1
Trockenstress	9,3	6,4	2
Osmotischer Stress	1	1,5	1,4
Salzstress	1,4	1,2	2,3
Oxidativer Stress	1,1	1,2	1,5
Hitzestress	0,4	0,6	1,2
Kältestress	1,3	1	1,1

3.2 Manipulation der Expression des *DRK3*-Gens in *Arabidopsis*

Um zu analysieren, ob die Ausschaltung des *DRK3*-Gens bzw. die erhöhte Expression des Gens zu einer veränderten Reaktion auf Pathogeninfektionen führen, wurden die entsprechenden Pflanzenlinien benötigt. Es wurde eine *DRK3*-T-DNA-Insertionslinie (*drk3-1*) von NASC (s. Kap. 2.1.5) erworben und analysiert. Diese Linie wurde dann auch mit einem genomischen Klon des *DRK3*-Gens unter Kontrolle des genspezifischen Promotors komplementiert, um eventuelle Unterschiede auf das Fehlen der *DRK3* zurückführen zu können. Außerdem wurden Pflanzen

* Farbcode: gelb = 2-2,9-faches, orange = 3-3,9-faches, rot = mehr als 4-faches relatives Fluoreszenzsignal, blau = weniger als 0,5-faches relatives Fluoreszenzsignal

hergestellt, in denen die Expression der *DRK3* durch RNA-Interferenz (Waterhouse *et al.*, 1998) herunterreguliert ist. Zusätzlich wurden *DRK3-sense*-Linien hergestellt, um auch die Auswirkungen einer erhöhten *DRK3*-Transkription testen zu können.

3.2.1 Analyse der T-DNA-Insertionslinie (*drk3-1*)

Die T-DNA-Insertionslinie *drk3-1* (N851646) wurde von NASC bezogen und trägt nach Vorhersagen durch die *Knockout Facility der University of Wisconsin* (Krysan *et al.*, 1999) eine Insertion an Position 994 in dem *DRK3*-Gen [s. Abb. 3-3 A) und Anhang 7.2]. Diese Mutation liegt in einem Col-0-Hintergrund vor. Zu Beginn wurde geprüft, ob die T-DNA-Insertion homozygot in beide Allele des Gens inseriert ist und ob noch ein funktionelles *DRK3*-Transkript in dieser Linie exprimiert werden kann. Es wurde auch analysiert wieviele sekundäre T-DNA-Insertionen in anderen Genen in dieser Linie vorhanden sind, um später Rückschlüsse ziehen zu können, in wieweit das *DRK3*-Gen für eventuelle phänotypische Effekte verantwortlich ist.

3.2.1.1 Genotypisierung der *drk3-1*

Um sicherzugehen, dass beide Allele des *DRK3*-Gens in der Linie *drk3-1* eine T-DNA-Insertion tragen, wurden mittels einer Genotypisierung (s. Kap. 2.4.9.2) homozygote *drk3-1*-Pflanzen identifiziert und für weitere Versuche verwendet. In Abb. 3-2 ist zu erkennen, dass von genomischer DNA dieser Pflanzen nur ein T-DNA-spezifisches Produkt amplifiziert werden kann (KO-PCR) und kein WT-Produkt (WT-PCR) mehr erhalten wird. Diese Pflanzen tragen also homozygot eine T-DNA-Insertion im *DRK3*-Gen.

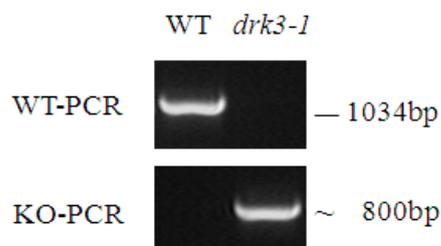


Abbildung 3-2 Genotypisierung der *drk3-1*

Genomische DNA (s. Kap. 2.4.1) von WT-Col-0- (WT) und *drk3-1*-Pflanzen wurde mittels Genotypisierung auf Vorhandensein der T-DNA-Insertion untersucht (s. Kap. 2.4.9.2). Es wurde jeweils eine WT-spezifische PCR mit den Primern NeuAt4g10390-5' und At4g10390-3' und eine KO-spezifische PCR mit dem Primerpaar NeuAt4g10390-5' und P745 durchgeführt (s. Kap. 2.4.9.2, Primer s. Anhang 7.1).

3.2.1.2 *DRK3*-Transkript in der *drk3-1*

Um zu überprüfen, ob in der *drk3-1* noch bestimmte Bereiche oder die vollständige Sequenz des *DRK3*-Gens exprimiert werden, wurden RT-PCRs (s. Kap. 2.5.3) mit verschiedenen Primerkombinationen (siehe Anhang 7.3) durchgeführt. Die Expression des *DRK3*-Gens wurde durch Verwundung induziert (s. Kap. 2.7.1) und Pflanzenmaterial 1 h danach geerntet.

In Abb. 3-3 B) sind diese RT-PCRs (s. Kap. 2.5.3) dargestellt und es ist deutlich zu erkennen, dass ein Fragment der *DRK3*, das 5' der T-DNA-Insertion liegt (Vor Insertion), in der *drk3-1* genauso stark wie in WT-Col-0-Pflanzen exprimiert wird. Ein Primerpaar, das die T-DNA-Insertionsstelle in der *drk3-1* umschließt, ergibt kein Produkt in PCR-Reaktionen auf cDNA von *drk3-1*-Pflanzen. Außerdem ist zu erkennen, dass ein Bereich, der sich an die T-DNA-Insertion anschließt (Nach Insertion), in der *drk3-1* nicht mehr exprimiert wird. Mit einem Northern-blot

(s. Abb. 3-3 C), in dem eine Sonde benutzt wurde, die 3' von der Insertion bindet (entspricht: Nach Insertion), konnte gezeigt werden, dass in *drk3-1*-Pflanzen kein *DRK3*-WT-Transkript mehr exprimiert wird.

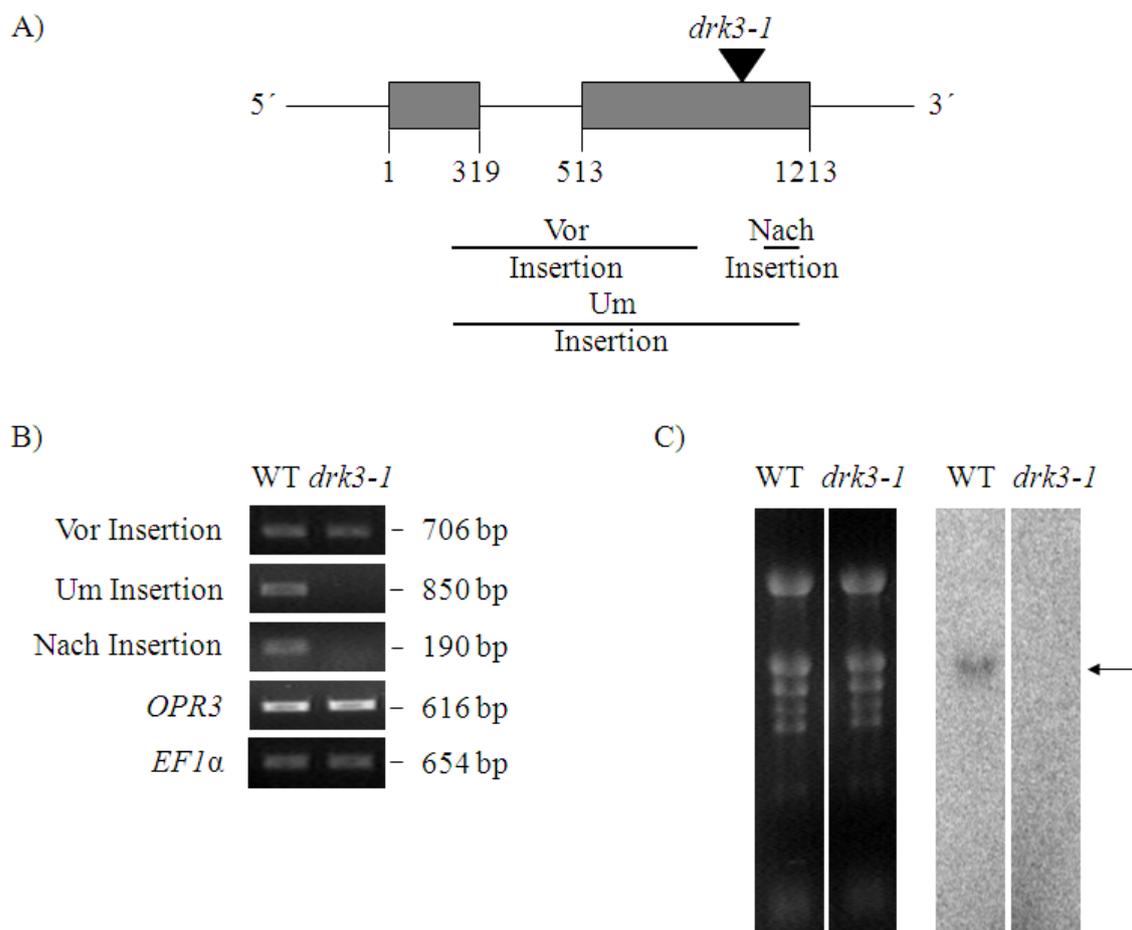


Abbildung 3-3 *DRK3*-Transkript in der *drk3-1*

A) Es ist das *DRK3*-Gen schematisch dargestellt. Das Gen enthält 2 Exons (graue Balken) und dazwischen liegt ein Intron (Strich). 5' und 3'UTR sind auch als Striche eingezeichnet. Die Insertion der T-DNA in *drk3-1*-Pflanzen ist angedeutet (schwarzes Dreieck). Mit Hilfe von Strichen ist gezeigt, welche Produkte in den verschiedenen PCR-Reaktionen in B) amplifiziert wurden.

Für B) und C) wurden Blätter 6 Wochen alter *Arabidopsis* WT-Col-0- und *drk3-1*-Pflanzen mit einer Rasierklinge wundinduziert (s. Kap. 2.7.1). RNA wurde nach 1 h isoliert (s. Kap. 2.5.1).

B) In semiquantitativen RT-PCR-Reaktionen (s. Kap. 2.5.3, s. Kap. 2.4.9.1) wurde die Expression des *DRK3*-Gens in WT-Col-0- (WT) und *drk3-1*-Pflanzen mit verschiedenen Primerkombinationen (s. Anhang 7.3) analysiert. Die PCR mit *EF1α*-genspezifischen Primern (s. Anhang 7.1) diente als Beladungskontrolle, die erfolgreiche Wundinduktion wurde mit *OPR3*-spezifischen Primern (s. Anhang 7.1) getestet.

C) Es wurde mit der isolierten RNA ein Northern-blot (s. Kap. 2.5.5) durchgeführt. Es ist das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel (links) und die Autoradiographie (rechts) gezeigt. Die Membran wurde mit einer *DRK3*-spezifischen Sonde, deren Sequenz „Nach Insertion“ in A) entspricht, hybridisiert.

3.2.1.3 Zahl der T-DNA-Insertionen

Mittels eines Southern-blots wurde getestet, ob weitere T-DNA-Insertionen in andere Gene der *drk3-1*-Pflanzen inseriert sind. Weitere Insertionen müssen bei späteren phänotypischen Analysen berücksichtigt werden. Es wurde genomische DNA aus WT-Col-0- und *drk3-1*-Pflanzen isoliert (s. Kap. 2.4.1), mit den Restriktionsenzymen *SacI* oder *EcoRI* verdaut und ein Southern-blot durchgeführt (s. Kap. 2.4.13). Die Hybridisierung erfolgte mit einer Sonde, die spezifisch für das in der T-DNA enthaltene Hygromycin-Resistenzgen ist (s. Anhang 7.4). In

Abb. 3-4 ist deutlich zu erkennen, dass die gewählte Sonde ausschließlich an genomische DNA der *drk3-1*-Linie und nicht unspezifisch an DNA-Fragmente aus WT-Pflanzen binden kann.

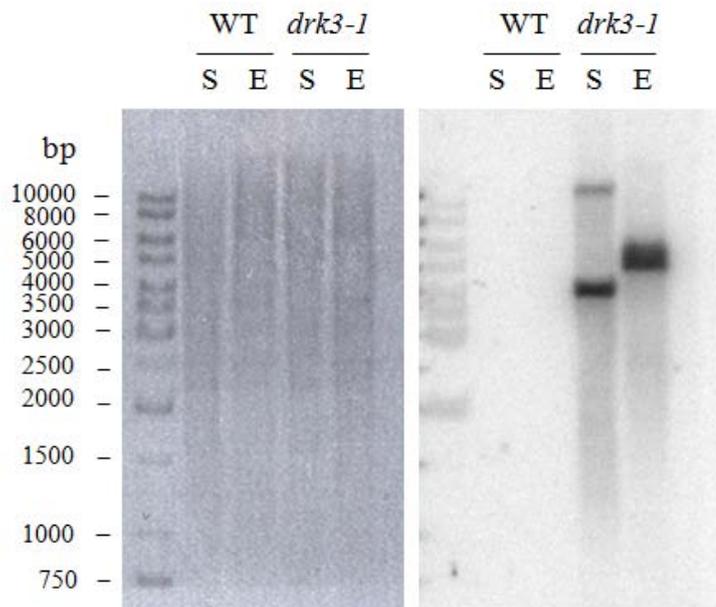


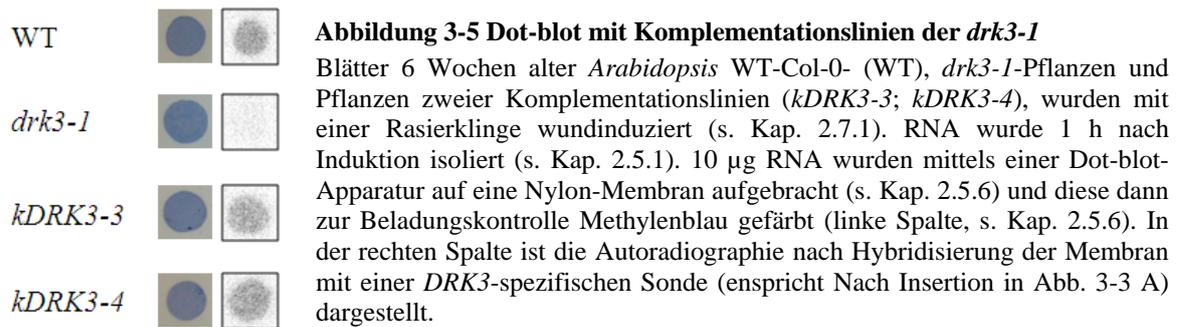
Abbildung 3-4 T-DNA-Insertionszahl in *drk3-1*-Pflanzen

Die T-DNA-Insertionszahl wurde in *drk3-1*-Pflanzen mittels eines Southern-blots (s. Kap. 2.4.13) bestimmt. Hierzu wurde genomische DNA von WT-Col-0- (WT) bzw. *drk3-1*-Pflanzen entweder mit *SacI* (S) oder mit *EcoRI* (E) geschnitten, auf einem 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt und mit einer T-DNA-spezifischen Sonde markiert (s. Kap. 2.4.12, s. Anhang 7.4). Links im Bild ist das ethidiumbromidgefärbte Agarosegel zu erkennen und rechts ist die Autoradiographie der Membran dargestellt.

Es wird deutlich, dass zwei T-DNA-Insertionen in *drk3-1*-Pflanzen vorhanden sind. Rückkreuzungen mit WT-Col-0-Pflanzen führten jedoch bisher noch nicht zum Verlust der zweiten Insertion. Möglicherweise sind die beiden Insertionen auf einem Chromosom gekoppelt und erschweren damit eine Trennung der beiden Insertionen. In diesem Fall müssen weitere Kreuzungen mit WT-Col-0-Pflanzen durchgeführt werden. Aufgrund der sekundären Insertion wurden *drk3-1*-Pflanzen mit einem genomischen *DRK3*-Klon komplementiert (s. Kap. 2.4.8.2). Durch diese Komplementation können phänotypische Unterschiede später eindeutig einem *drk3-1*-*knockout* zugewiesen werden.

3.2.2 Komplementation der *drk3-1*

Zur Komplementation von *drk3-1*-Pflanzen wurde ein genomischer Klon der *DRK3* unter Kontrolle des genspezifischen Promotors im Vektor pKGWD.0 verwendet (s. Kap. 2.4.8.2, s. Anhang 7.6). *drk3-1*-Pflanzen wurden mit diesem Klon mittels *Agrobakterien* transformiert (s. Kap. 2.3.4) und positive Transformanten mit Kanamycin selektioniert. Die Transkriptmenge des *DRK3*-Gens in diesen Linien wurde in einem Dot-blot (s. Kap. 2.5.6, s. Abb. 3-5) bestimmt und Pflanzen mit WT-ähnlicher Expression für weitere Analysen verwendet.



3.2.3 *DRK3*-RNA-Interferenz- und *DRK3-sense*-Pflanzen

Da nur eine *drk3*-T-DNA-Insertionslinie käuflich erhältlich war, wurden Pflanzen hergestellt, in denen die Expression des *DRK3*-Gens durch RNA-Interferenz herunterreguliert wird (s. Kap. 2.4.8.2). Somit sollten mindestens zwei unabhängige Linien erhalten werden, in denen die Expression des *DRK3*-Gens herunterreguliert ist. Außerdem wurden *DRK3-sense* Linien hergestellt, die eine erhöhte Expression des *DRK3*-Gens aufweisen (s. Kap. 2.4.8.2). In Abbildung 3-6 sind RT-PCR-Reaktionen dargestellt, die die Expression des *DRK3*-Gens in den verschiedenen Linien zeigen. Es wird deutlich, dass die *DRK3-sense*-Linien (*ovx*) in unbehandeltem Blattmaterial eine Erhöhung der Expression des *DRK3*-Gens zeigen. Nach Induktion der Expression des *DRK3*-Gens durch Verwundung wird im Gegensatz hierzu in *DRK3*-Interferenz Linien (*R*) die Expression des *DRK3*-Gens reduziert.

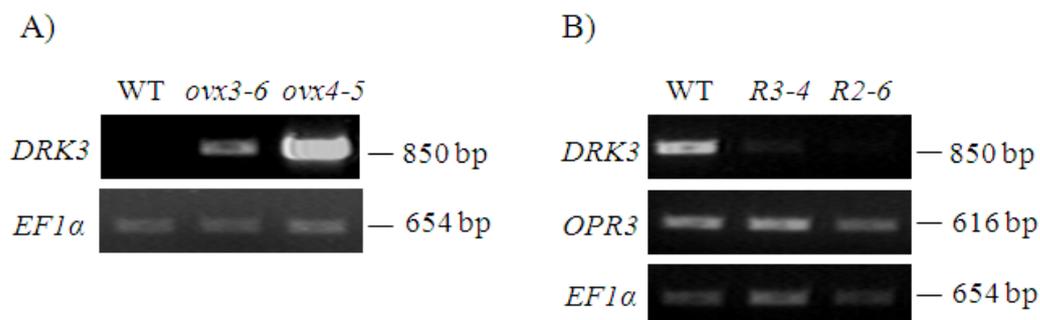


Abbildung 3-6 *DRK3*-Transkriptmenge in *DRK3-sense*- und *DRK3*-RNA-Interferenz-Pflanzen

A) Mit RNA aus WT-Col-0- (WT) und *DRK3-sense*- (*ovx*) Pflanzen wurden semiquantitative RT-PCR-Reaktionen durchgeführt (s. Kap. 2.5.3, s. Kap. 2.4.9.1). Es wurde je eine PCR mit den *DRK3*-genspezifischen Primern NeuAt4g10390-5' und At4g10390-3' (s. Anhang 7.1) bzw. mit *EF1α*-spezifischen Primern als Beladungskontrolle (s. Anhang 7.1) durchgeführt.

B) Die Expression des *DRK3*-Gens wurde durch Verwundung mit einer Rasierklinge (s. Kap. 2.7.1) in WT-Col-0- (WT) und *DRK3*-RNA-Interferenz- (*R*) Pflanzen induziert. 1 h nach Induktion wurde mit semiquantitativer RT-PCR (s. Kap. 2.5.3, s. Kap. 2.4.9.1) die Wundinduktion mit *OPR3*-spezifischen Primern (s. Anhang 7.1) überprüft und die Expression des *DRK3*-Gens mit den Primern NeuAt4g10390-5' und At4g10390-3' bestimmt. Die *EF1α*-spezifische PCR diente als Beladungskontrolle.

3.3 Phänotypische Analyse der *DRK3*-expressionsveränderten Linien

Die oben beschriebenen Pflanzenlinien mit unterschiedlichen *DRK3*-Transkriptmengen wurden für verschiedene phänotypische Analysen verwendet, um die mögliche Funktion des *DRK3*-Gens in Reaktionen der Pathogenabwehr zu untersuchen. Es bestanden keine makroskopischen Unterschiede dieser Pflanzen im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen in Bezug auf Form, Größe und Fertilität.

3.3.1 Wachstum verschiedener Pathogene *in planta*

Da die Expression des *DRK3*-Gens durch bakterielle Pathogene induziert wird, wurde vermutet, dass die *DRK3* eine Funktion in der Pathogenabwehr besitzt. Um dies genauer zu untersuchen, wurde das Wachstum von *Pseudomas*-Stämmen mit unterschiedlicher Pathogenizität in *drk3-1*- im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Es wurden der virulente Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000, der avirulente Stamm *Pto* avrRpm1, der Stamm *Pto* Δ avrPto/PtoB, die Coronatin-defiziente Mutante *Pto* DC3661 und das Nichtwirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) 1448a verwendet (s. Kap. 2.1.3).

Das virulente Pathogen *Pto* DC3000 zeigt signifikante Wachstumsunterschiede in WT-Col-0- im Vergleich zu *drk3-1*-Pflanzen und Linien, in denen die Expression des *DRK3*-Gens durch RNAi herunterreguliert wurde (s. Abb. 3-7). In *DRK3*-defizienten Pflanzen ist das bakterielle Wachstum signifikant gehemmt, und diese Pflanzen zeigen damit eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *Pto* DC3000. Die Unterschiede im Wachstum der Bakterien führten jedoch nicht zu einer veränderten Ausprägung von makroskopisch sichtbaren Infektionssymptomen, wie Chlorosen und wässrigen Läsionen, in *drk3-1*- im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen.

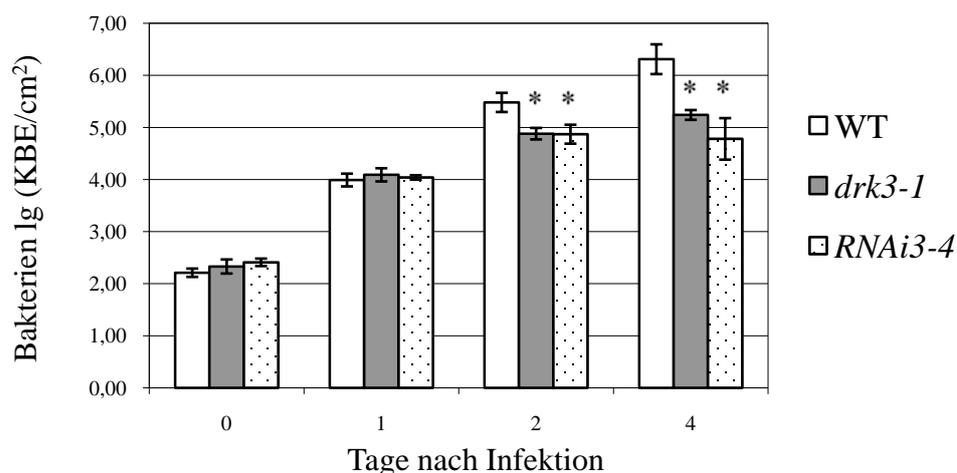


Abbildung 3-7 Bakterielleres Wachstum nach *Pto* DC3000 Infektion

Es ist das Wachstum von *Pto* DC3000 in WT-Col-0- (WT), *drk3-1*- und *RNAi3-4*- Pflanzen gezeigt. Die *Pseudomonaden* wurden in 6 Wochen alte Pflanzen in einer Konzentration von 1×10^4 KBE/ml infiltriert und die Bakterienzahl nach 0, 1, 2 und 4 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Mit einer einfaktorischen Varianzanalyse (ANOVA, s. Kap. 2.7.6) wurden die erhaltenen Wertepaare getestet. Signifikante Unterschiede zur WT-Kontrolle ($p < 0,05$) wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Um zu zeigen, dass die Wachstumsunterschiede von *Pto* DC3000 in *drk3-1*-Pflanzen nicht auf die sekundäre T-DNA-Insertion zurückzuführen sind (s. Kap. 3.2.1.3), wurden auch die *drk3-1*-Komplementationslinien (s. Kap. 3.2.2) in Bezug auf Wachstum von *Pto* DC3000 getestet. Es zeigte sich, dass der Wildtypphänotyp in den Komplementationslinien wiederhergestellt ist (s. Abb. 3-8) und damit der Defekt des *DRK3*-Gens die erhöhte Resistenz von *drk3-1*-Pflanzen gegenüber *Pto* DC3000 bedingt. Es wurden zwei unterschiedliche Komplementationslinien getestet, um sekundäre Lokalisationseffekte in diesen Pflanzen auszuschließen.

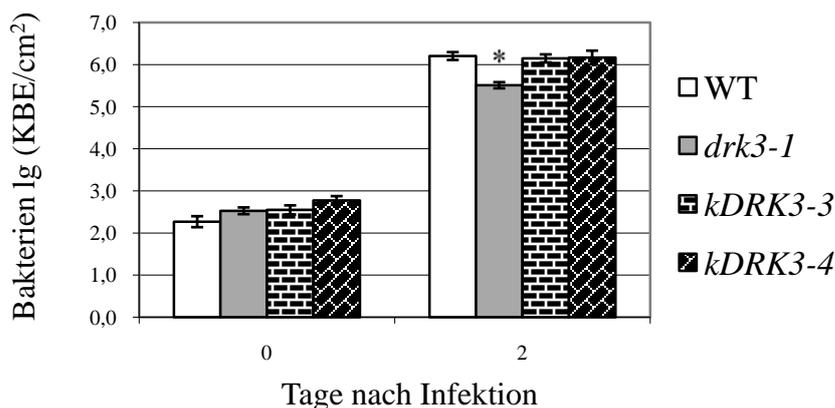


Abbildung 3-8 Komplementation des *drk3-1*-Phänotypes

Es ist das Wachstum von *Pto* DC3000 in WT-Col-0- (WT), *drk3-1*- und mit einem genomischen *DRK3*-Klon komplementierten (*kDRK3*)-Pflanzen gezeigt. Die Bakterien wurden in 6 Wochen alte Pflanzen in einer Konzentration von 1×10^4 KBE/ml infiltriert und die Bakterienzahl nach 0 und 2 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Signifikante Unterschiede (ANOVA, s. Kap. 2.7.6, $p < 0,05$) im Vergleich zum WT wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Weiterhin wurde das Wachstum von *Pto* DC3000 in *DRK3-sense*-Linien, die eine erhöhte *DRK3*-Expression aufweisen (s. Kap. 3.2.3), getestet. Es konnte eine erhöhte Anfälligkeit dieser Linien gegenüber dem bakteriellen Pathogen detektiert werden (s. Abb. 3-9). Somit zeigt sich hier der entgegengesetzte Effekt in Bezug auf veränderte Pathogenität im Vergleich zu der *drk3-1-knockout*-Linie.

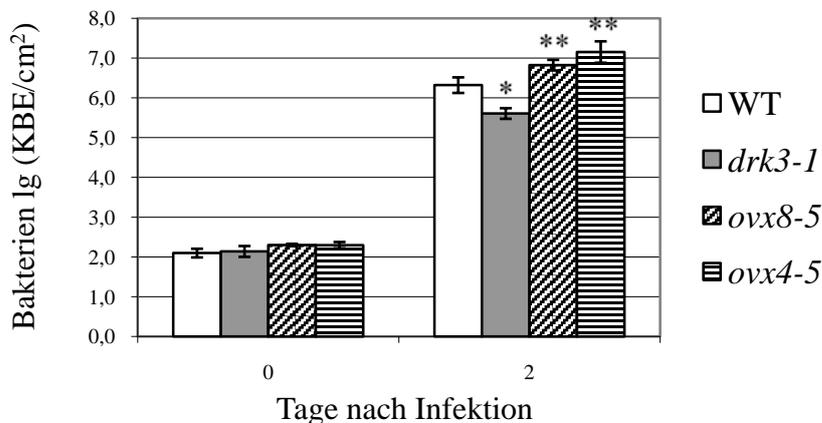


Abbildung 3-9 *Pto* DC3000 Wachstum in *DRK3-sense* Linien

Es ist das Wachstum von *Pto* DC3000 in WT-Col-0- (WT), *drk3-1*- und *DRK3-sense*- (*ovx*) Pflanzen gezeigt. Die Bakterien wurden in 6 Wochen alte Pflanzen in einer Konzentration von 1×10^4 KBE/ml infiltriert und die Bakterienzahl nach 0 und 2 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Signifikante Unterschiede (ANOVA, s. Kap. 2.7.6, $p < 0,05$) im Vergleich zum Wildtyp wurden mit „*“ gekennzeichnet. Mit „**“ gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Wildtypkontrolle mit $p < 0,005$.

Infektionen mit einem im Vergleich zu *Pto* DC3000 etwas weniger infektiösen Stamm, *Pto* Δ avrPto/PtoB, in dem die Effektorgene *avrPto* und *avrPtoB* deletiert sind (Lin und Martin, 2005), führte zu einer stark ausgeprägten Suszeptibilität der *DRK3-sense*-Linien im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen (s. Abb. 3-10). Eine erhöhte Resistenz der *drk3-1*-Mutanten im Vergleich zu WT-Col-0 ist jedoch gegenüber diesem Pathogen nicht signifikant ausgeprägt.

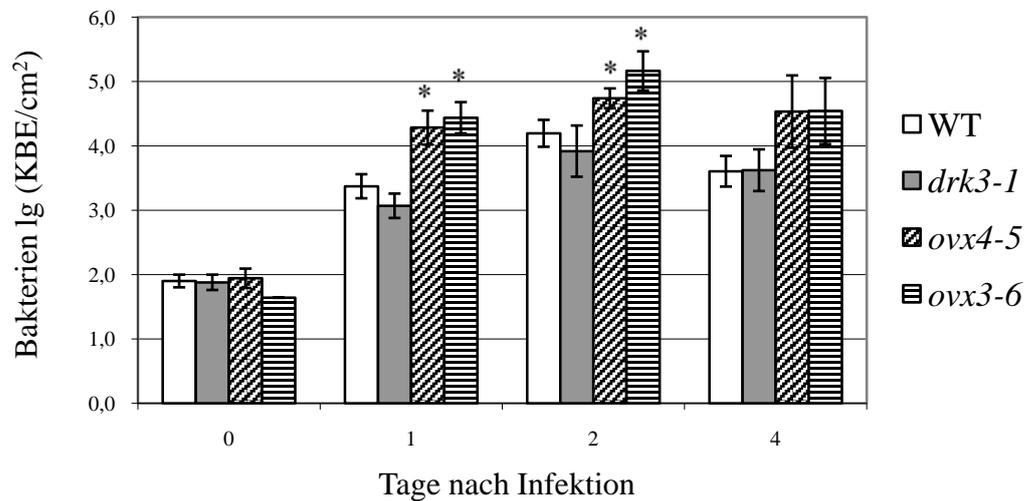


Abbildung 3-10 Wachstum von *Pto* Δ avrPto/PtoB in *DRK3-sense* Linien

Es ist das Wachstum von *Pto* Δ avrPto/PtoB in WT-Col-0- (WT), *drk3-1*- und *DRK3-sense* (*ovx*)- Pflanzen gezeigt. Die Bakterien wurden in 6 Wochen alte Pflanzen in einer Konzentration von 1×10^4 KBE/ ml infiltriert und die Bakterienzahl nach 0, 1, 2 und 4 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Signifikante Unterschiede (ANOVA, s. Kap. 2.7.6, $p < 0,05$) im Vergleich zur Wildtypkontrolle wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Das Nichtwirtspathogen *Pph* 1448a zeigt kein Wachstum in WT-Col-0-Pflanzen (s. Abb. 3-11), da dieser Stamm nicht in der Lage ist *Arabidopsis* zu besiedeln. Auch der avirulente Stamm *Pto* avrRpm1 ist eher schlecht in der Lage auf WT-Col-0-Pflanzen zu wachsen. Die Coronatin-defiziente Mutante *Pto* DC3661 vermehrt sich im Vergleich hierzu zwei Tage nach Infektion um den Faktor 1000 in WT-Col-0 Pflanzen. Man erkennt jedoch in keinem der hier gezeigten Experimente einen Unterschied im Wachstum der *Pseudomonaden* in WT- im Vergleich zu *drk3-1*-Pflanzen.

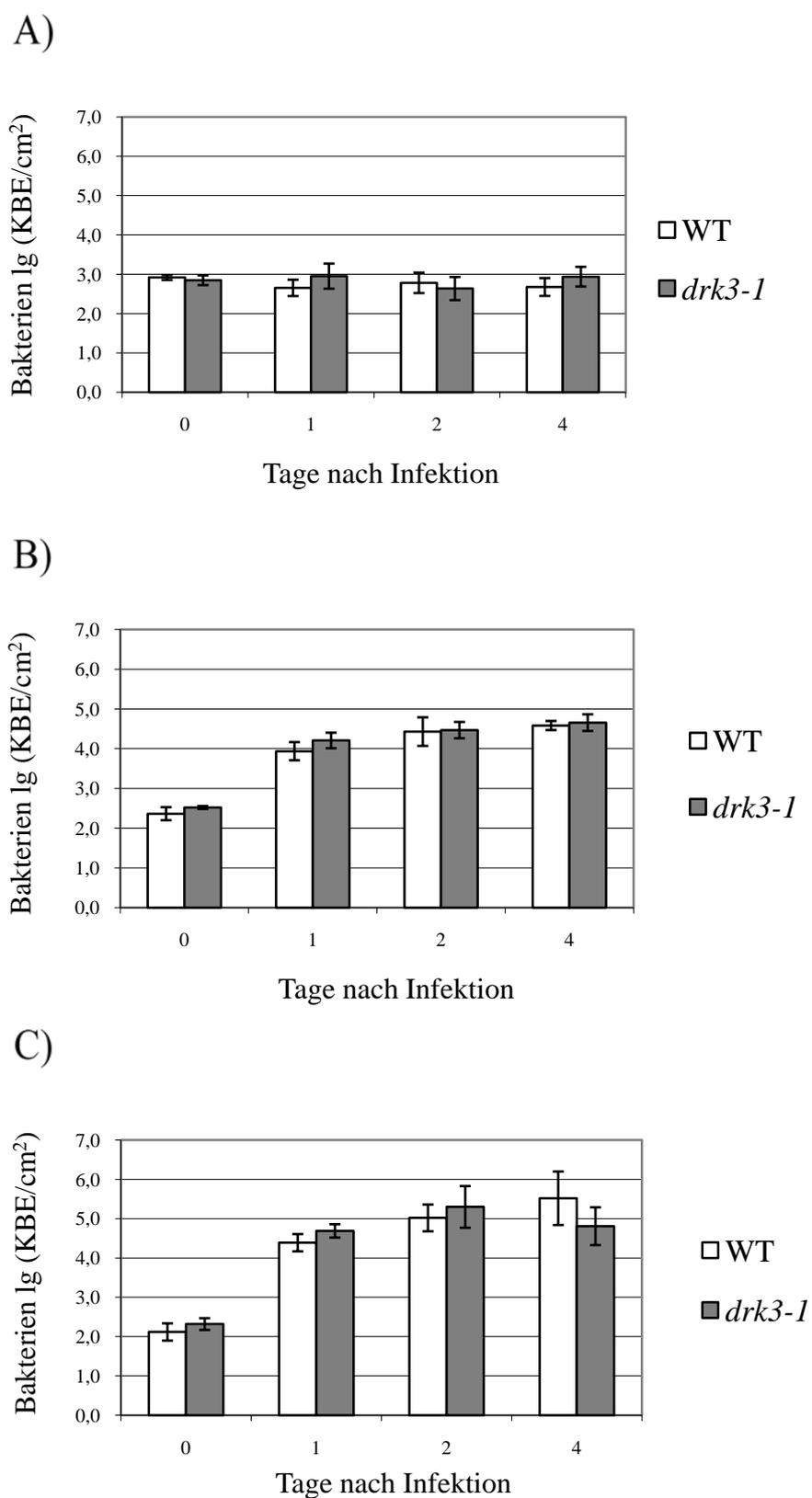


Abbildung 3-11 Wachstum verschiedener *Pseudomonas*-Stämme in WT- und *drk3-1*-Pflanzen

Es ist das Wachstum von A) *Pph* 1448a, von B) *Pto avrRpm1* und von C) *Pto* DC3661 in WT-Col-0- (weiße Balken) und in *drk3-1*- (graue Balken) Pflanzen gezeigt.

Die Bakterien wurden in A), B) und C) in einer Konzentration von 1×10^4 KBE/ml in 6 Wochen alte Pflanzen infiltriert und die Bakterienzahl nach 0, 1, 2 und 4 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die nekrotrophen Pilze *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea* wurden auch in Bezug auf ihre Pathogenität gegenüber *drk3-1*- im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen analysiert. Hierbei waren keine Infektionsunterschiede erkennbar (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Weitere Effekte in *drk3-1*-Pflanzen nach Infektion mit *Pto* DC3000

In Abb. 3-12 ist zu erkennen, dass nach *Pto* DC3000-Infektion in *drk3-1*-Pflanzen eine erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die mittels DAB-Färbung (s. Kap. 2.7.3) sichtbar gemacht werden kann, auftritt. Außerdem zeigt sich eine erhöhte Zelltodrate in dieser Linie im Vergleich zu WT-Pflanzen. Zelltod wurde mittels Trypanblau-Färbung detektiert (s. Kap. 2.7.4).

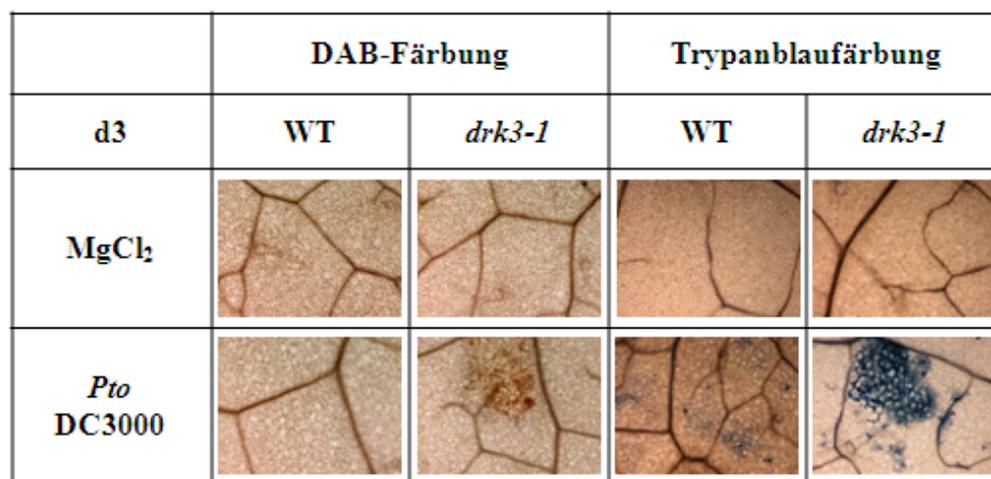


Abbildung 3-12 ROS- und Zelltodbildung nach *Pto* DC3000 Infektion

In Blätter 6 Wochen alter WT-Col-0- (WT) und *drk3-1*-Pflanzen wurde eine 10 mM MgCl₂-Lösung oder eine 1x10⁸ KBE/ml enthaltende *Pto* DC3000 Suspension infiltriert und Blätter nach 3 Tagen mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, s. Kap.2.7.3) bzw. Trypanblau (s. Kap. 2.7.4.2.7.3) gefärbt.

Da in Mutanten deren Pathogenabwehr gestört ist, die Expression verschiedener abwehrrelevanter Gene verändert sein kann, wurde die Transkriptakkumulation von *pathogenesis-related 1 (PR1)* (van Loon und van Strien, 1999), des Pflanzendefensins *PDF1.2* (Penninckx et al., 1996) und des jasmonatinduzierten vegetativen Speicherproteins *VSP1* (Guerineau et al., 2003) in *drk3-1*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Col-0 nach Infektion mit *Pto* DC3000 bestimmt. Hierbei zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expressionsstärke dieser Gene (Daten nicht gezeigt).

In Kooperation mit der Analytik des ZMBP der Universität Tübingen (K.Wurster, M. Stahl) wurde der Gehalt verschiedener pflanzlicher Hormone und an dem Phytoalexin Camalexin in *drk3-1*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen vor und nach Pathogeninfektion bestimmt (s. Kap. 2.7.5). Es konnten in diesem Experiment keine Unterschiede des Gehaltes an Indoleessigsäure und Camalexin festgestellt werden (nicht gezeigt). Die Konzentration an freier Salizylsäure ist in *drk3-1*-Mutanten leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht und auch der Jasmonatgehalt (frei und hydrolysiert) zeigt eine schwache Erhöhung in *drk3-1*-Pflanzen nach Pathogeninfektion mit *Pto* DC3000 und *Pto* DC3000 Δ *avrPto/PtoB* (s. Abb. 3-13). Diese Ergebnisse müssen jedoch noch durch Wiederholung des Versuches bestätigt werden.

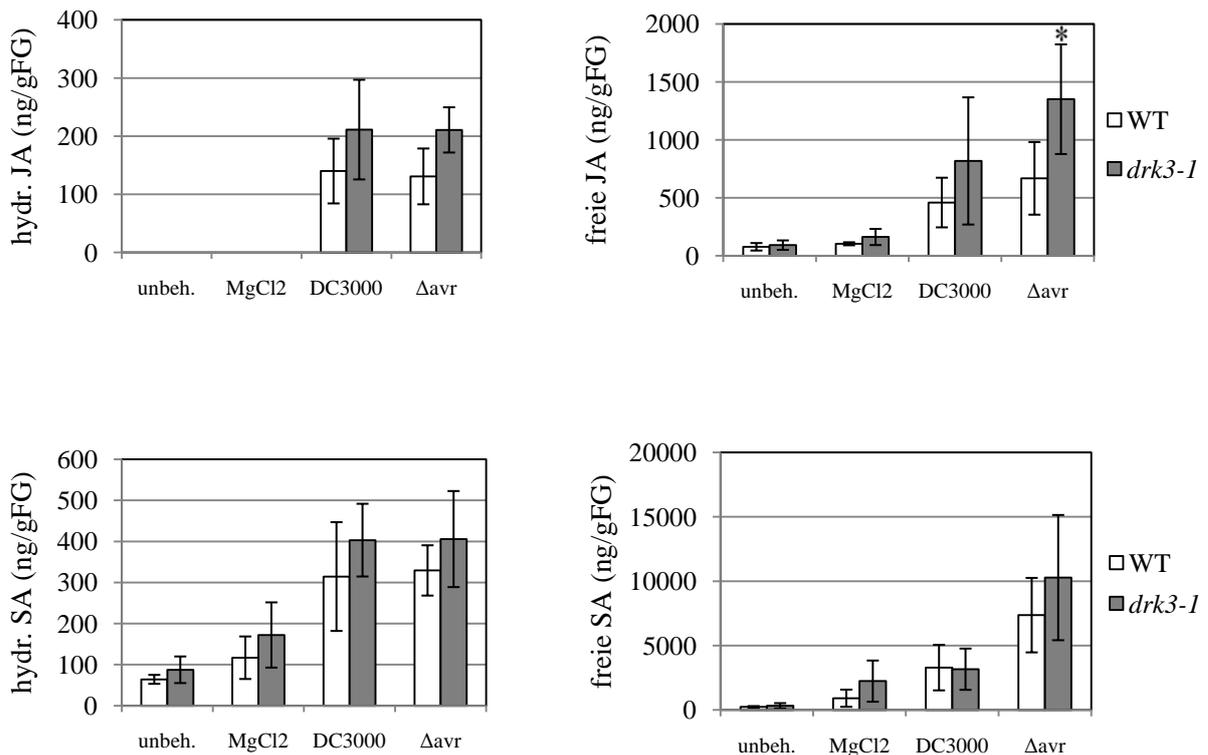


Abbildung 3-13 Hormongehalt in *drk3-1*-Pflanzen

In Blätter von 6 Wochen alten WT-Col-0- (WT) und *drk3-1*-Pflanzen wurden eine 1×10^8 KBE/ml enthaltende *Pto* DC3000 (DC3000) bzw. *Pto* ΔavrPto/PtoB (Δavr) Suspension oder 10 mM MgCl₂ (MgCl₂) infiltriert und Blätter nach 24 h geerntet und der Gehalt an freier und hydrolisierter (hydr.) Jasmon- (JA-) und Salizylsäure (SA) bestimmt (s. Kap. 2.7.5). Zudem wurde der Hormongehalt in unbehandelten Pflanzen (unbeh.) gemessen. Nicht gezeigte Werte lagen unterhalb der Detektionsgrenze. Es sind die Mittelwerte aus jeweils 6 unabhängigen Proben dargestellt. Signifikante Unterschiede (ANOVA, s. Kap. 2.7.6, $p < 0,05$) im Vergleich zur WT-Kontrolle wurden mit „*“ gekennzeichnet.

3.4 Struktur und modularer Aufbau des DRK3-Proteins

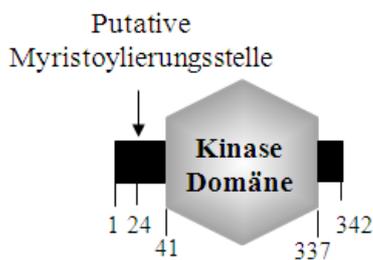


Abbildung 3-14 Struktur des DRK3-Proteins (entsprechend *Prosite Motif Scan* und *Pfam*)

Es ist die modulare Struktur des DRK3-Proteins zu erkennen. An einen kurzen N-terminalen Abschnitt (Aminosäure 1-40) schließt sich die Kinasedomäne an. Es folgt ein kurzer C-terminaler Abschnitt (Aminosäure 337-342). An Aminosäure 24 befindet sich eine mögliche Myristoylierungsstelle.

Die Gen- und Aminosäuresequenz der DRK3 wurden von *TAIR* (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://arabidopsis.org>) entnommen. Die Expression dieses Gens ist durch cDNA-Sequenzen, die nach Hormonbehandlung von Kalli (BX827842, BX836188, BX826909) und in verschiedenen Geweben (Yamada *et al.*, 2003) gefunden wurden, bestätigt. Das Protein besteht aus 342 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 37,8 kDa. Auf Grundlage dieser

Sequenzen lassen sich Vorhersagen bezüglich der Struktur und Funktion des kodierten Proteins treffen. In Abb. 3-14 ist die durch *Pfam* (Finn *et al.*, 2008) und *Prosit Motif Scan* (de Castro *et al.*, 2006) vorgeschlagene Domänenstruktur des DRK3-Proteins dargestellt. An einen kurzen N-terminalen Sequenzabschnitt schließt sich eine putative Serin/Threonin-Kinasedomäne von Aminosäure 41 bis einschließlich Aminosäure 336 an. Es befinden sich weitere 6 Aminosäuren am C-Terminus. Das Glyzin an Position 24 ist möglicherweise Bestandteil einer Myristoylierungssequenz. (s. Kap. 3.4.1).

Das Protein wird aufgrund der Sequenzhomologie der Kinasedomäne zur Familie der RLKs gezählt (Shiu und Bleecker, 2003). Es wird jedoch zu keiner der bestehenden Gruppen der RLKs bzw. RLCKs gerechnet, sondern bildet mit dem nächsten homologen Protein HOM1 eine eigene Gruppe. Diese beiden Proteine sind sich sehr ähnlich und besitzen denselben modularen Aufbau (s. Kap. 3.5).

3.4.1 Lokalisation des DRK3-Proteins in *Arabidopsis* Protoplasten

Da das DRK3-Protein aufgrund der Sequenzhomologie der Kinasedomäne zur Klasse der RLKs gerechnet wird, aber weder eine putative Transmembrandomäne noch eine extrazelluläre Domäne vorhanden ist, sollte die subzelluläre Lokalisation in *Arabidopsis* analysiert werden. Dazu wurden verschiedene cDNA-Fragmente des *DRK3*-Gens in den Vektor pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002) mittels Gateway®-Rekombination (s. Kap. 2.4.7) kloniert und diese Konstrukte dann in *Arabidopsis* Protoplasten transformiert (s. Kap. 2.3.3). In diesen wurde das entsprechende Fusionsprotein aus dem DRK3-Proteinfragment und einem C-terminalen eGFP unter Kontrolle eines 35S-Promotors exprimiert. Die eGFP-Fluoreszenz konnte mit Hilfe von lasergestützter Konfokalmikroskopie visualisiert werden (s. Kap. 2.6.10).

Im Überlagerungsbild aus eGFP-Fluoreszenz- und Durchlichtaufnahme in Abb. 3-15 ist zu erkennen, dass das Kontrollprotein GFP5 eindeutig im Zytoplasma und Nukleus der Protoplasten lokalisiert ist. Die Expression eines Gesamtlängen-DRK3-eGFP-Fusionsproteins (FL-DRK3-eGFP) in Protoplasten zeigt eine Lokalisation dieses Proteins an der Plasmamembran (s. Abb. 3-15).

Außerdem wurde nur die Kinasedomäne der DRK3 als eGFP-Fusion in Protoplasten exprimiert, um den Einfluss des N-Terminus auf die Lokalisation der DRK3 zu prüfen. Wie in Abb. 3-15 zu sehen ist, ist dieses Protein im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert. Somit hat der N-Terminus einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation des DRK3-eGFP-Proteins in *Arabidopsis* Protoplasten.

Durch *Prosit Motif Scan* (de Castro *et al.*, 2006) wurde vorhergesagt, dass die Aminosäure 24, ein Glyzin, des DRK3-Proteins Bestandteil einer Myristoylierungssequenz und damit möglicherweise myristoyliert sein könnte. Die putative Myristoylierungssequenz von Aminosäure 24 bis 29 im DRK3-Protein (GSGVTC) hat die Eigenschaften einer typischen Konsensussequenz für Myristoylierung. An Position 1 der Konsensussequenz, an der bevorzugt Myristoylierungen stattfinden, steht ein Glyzin, an Position 2 eine ungeladene Aminosäure, an Position 3 und 4 eine beliebige Aminosäure, an Position 5 ein kleiner, ungeladener Rest und an Position 6 kein Prolin (Towler *et al.*, 1988). Myristoylierung tritt jedoch nur am N-Terminus

eines Proteins auf. Der Myristoylierung müsste also eine Spaltung des DRK3-Proteins vorausgehen. Bei Eingabe der Proteinsequenz von Aminosäure 24 - 342 in die verschiedenen Vorhersageprogramme *Myristoylator* (<http://www.expasy.org/tools/myristoylator/>), *PlantsP* (<http://plantsp.sdsc.edu/myrist.html>) und *NMT* (http://mendel.imp.univie.ac.at/myristate/SUPL_predictor.htm) wurde in allen Programmen eine Myristoylierung des besagten Glyzins für wahrscheinlich erachtet. Um herauszufinden, ob die Membranlokalisierung des DRK3-Proteins auf Myristoylierung des Glyzins 24 nach Abspaltung der ersten 23 Aminosäuren zurückzuführen ist, wurde der Glyzinrest der Konsensussequenz an Position 24 im DRK3-Protein mutagenisiert (s. Kap. 2.4.9.3). Dazu wurde das für ein Glyzin kodierende Codon 24 GGA zu GCT (für Alanin kodierend) mutagenisiert. Es ist kein Unterschied in der Lokalisation des DRK3 (G24A)-Proteins und des Wildtypproteins in *Arabidopsis* Protoplasten erkennbar (s. Abb. 3-15). Beide eGFP-Fusionsproteine sind an der Plasmamembran lokalisiert.

Die Expression der 40 N-terminalen Aminosäuren des DRK3-Proteins als eGFP-Fusion in *Arabidopsis* Protoplasten zeigte jedoch auch eine zytoplasmatische Lokalisation dieses Fusionsproteins. Möglicherweise ist jedoch der N-terminale Bereich nicht oberflächenexponiert und im Innern des eGFP-Proteins versteckt.

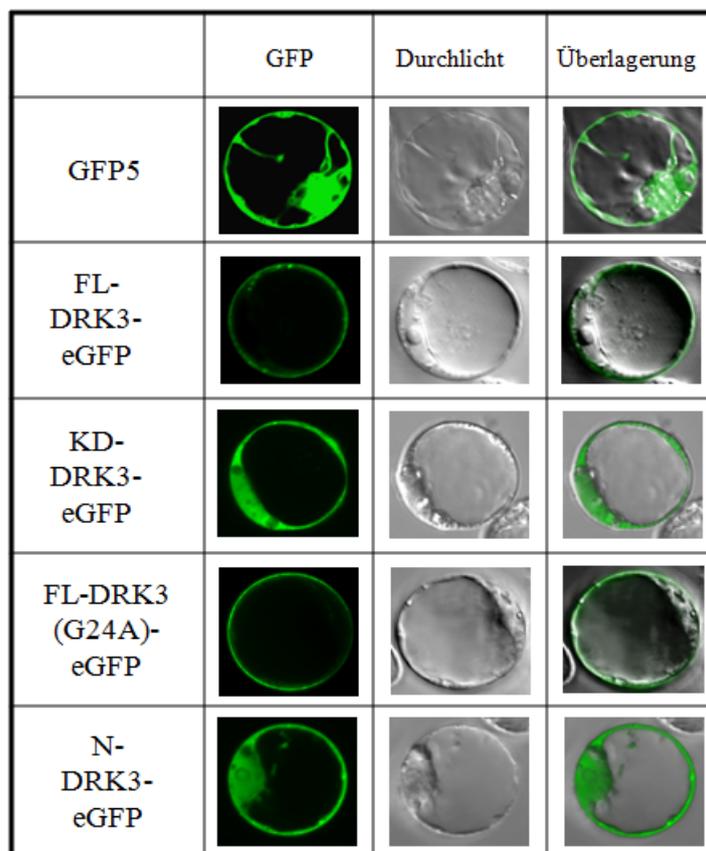


Abbildung 3-15 Lokalisation verschiedener DRK3-eGFP-Fusionsproteine

Es wurden *Arabidopsis* Protoplasten nach Transformation (s. Kap. 2.3.3) mit dem entsprechenden 35S:DRK3-eGFP-Fusions- oder 35S:GFP5-Konstrukt mittels lasergestützter Konfokalmikroskopie analysiert. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und die Detektion bei 500 – 530 nm (s. Kap. 2.6.10). Es sind jeweils das Fluoreszenzbild (GFP), das Durchlichtbild (Durchlicht) und die Überlagerung der beiden dargestellt.

3.4.2 Kinaseaktivität des DRK3-Proteins

Die Aktivität der Kinasedomäne des DRK3-Proteins sollte untersucht werden, da eine funktionelle Kinasedomäne einen Hinweis auf Involvierung des DRK3-Proteins in phosphattransferabhängige Signaltransduktions- oder Regulationsprozesse geben würde. Glutathion-S-Transferase- (GST-) Fusionsproteine der Kinasedomäne des DRK3-Proteins bzw. des DRK3-Gesamtlängenproteins wurde in *E.coli* BL21AITM-Zellen heterolog exprimiert und anschließend für *in vitro* Kinasetests eingesetzt (s. Kap. 2.6.8). Es konnte weder für die Kinasedomäne noch das Gesamtlängenkonstrukt der DRK3 Autophosphorylierungsaktivität oder Phosphorylierung bestimmter Substrate wie MBP, Casein oder Histon *in vitro* gezeigt werden (Postel, 2005).

3.4.3 Sequenzvergleich verschiedener Kinasedomänen

Die Kinasedomänen von eukaryotischen Serin/Threonin-Kinasen bestehen in der Regel aus den Subdomänen I - XI (Hanks *et al.*, 1988; Hanks und Hunter, 1995; Rudrabhatla und Rajasekharan, 2003). Es sind innerhalb dieser Domänen in pflanzlichen Serin/Threonin-Kinasen 15 hochkonservierte Aminosäurereste zu finden, die in Abb. 3-16 grau unterlegt wurden (Li und Chory, 1997). ATP-Bindung erfolgt über die Subdomänen I, VIb und VII und an der Katalyse sind Reste in Subdomäne I, II und VIII beteiligt (Hanks *et al.*, 1988). Die Funktion der anderen Domänen ist noch nicht geklärt.

Da die DRK3 anstelle des konservierten RD-Motifs in Subdomäne VIb der Kinasedomäne ein GD-Motif besitzt (weiß auf grauem Grund), zählt dieses Protein zu den Non-RD-Kinasen (Dardick und Ronald, 2006). In *Non-RD*-Kinasen erfolgt die Regulation der Kinaseaktivität nicht über einen R-abhängigen Aktivierungsloop (Dardick und Ronald, 2006). Ein *Alignment* mit Hilfe des Programmes ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) der DRK3-Kinasedomäne und ihres nächsten Homologen HOM1 (s. Kap. 3.5) mit einigen bekannten Kinasedomänen anderer RLKs, wie z.B. CLV1, HAESA und ERECTA (s. Abb. 3-16) ergab außerdem, dass ein konserviertes saures Glutamat in Subdomäne VIII durch ein basisches Histidin ersetzt ist (weiß auf schwarzem Grund). Dieses konservierte Glutamat wird für die Katalyse der Phosphorylierungsreaktion benötigt, so dass diese Reaktion in der DRK3 möglicherweise durch das Histidin beeinträchtigt oder verändert sein könnte. Dies erklärt eventuell warum in *in vitro* Kinasetests keine Kinaseaktivität detektierbar ist.

		I		II			
DRK3	41	-----	SNFSRLIGSGGYSSIYMARFSGS	-DKAALKVHVSSHRLYQVFR	-----		
HOM1	43	-----	SNFSRLIGTGGYSSIYLARVSGS	-INAALKVHVSSHRLYQVFR	-----		
CLV1		-----	LKEENIIGKGGAGIVYRGSMPNN	-VDVAIKRLVGRGTGRSDHG	-----F		
HAESA	683	-----	LDEKNVIGFGSSGKVKVELRGG	-EVVAVKLKNKSVKGGDEYSSDSLNRDVF			
ERECTA	647	-----	LSEKYIIGHGASSTVYKCVLKNC	-KPVAIKRLYSHNPQSMKQ	-----F		
BRI1	883	-----	FHNDSLIGSGGFGDVYKAILKDG	-SAVAIKKLIHVSGQGDR	-----F		
FLS2	869	-----	FNSANIIGSSSLSTVYKQLEDG	-TVIAVKVLNLKEFSAESDK	-----WF		
ATMPK6	62	-----	YKPPIMPICKGAYGIVCSAMNSETNESVAIKKIANAFDNKIDAKR		-----T		
ATMPK3	32	-EITSKYRPP	IPIGRGAYGIVCSVLDTETNELVAMK	KIANAFDNHMDAKR	-----T		
			* . . :	* : *			
		III		IV		V	
DRK3	83	-LELDILLRLQHPNI	VKLLGYFDDSEENGALLLEYLPQGNLQEKLQSNKQ	--VLQWRNR			
HOM1	85	-SELEILLRLQHPHI	VKLLGYFDDSEESGALLLEYLPQGNLQEKLNRSKQ	--VLPWRNR			
CLV1	735	TAEIQT	LGRIHRHIVRLLYVA-NKDTNLLLEYMPNGSLGELLHGSKGG	--HLQWETR			
HAESA	735	AAEVE	TLGTIRHKSIVRLWCCCS-SGDCKLLVYEYMPNGSLADVLVHGRKGGVVLGWPER				
ERECTA	689	ETELEM	LSSIKHRNLVSLQAYSL-SHLGSLLFYDYLENGSLWDLHGHPTKKK	-TLDWDTR			
BRI1	925	MAEMET	IGKIKHRNLVPLLYGCK-VGDERLLVYEFMKYGSLEDVLDHDPKAGVKLNWSTR				
FLS2	913	YTEAK	TLSQLKHRNLVKILGFAWESGKTKALVLPFMENGNLEDTIHGSAAP	--IGSLEEK			
ATMPK6	108	LR	EIKLLRHMDHENIIVARDIIP-PPLRNAFNDVYIAYELMDTDLHQIIRSNQALSEHC				
ATMPK3	83	LR	EIKLLRHLDHENIIAIRDVVP-PPLRRQFSDVYISTELMDTDLHQIIRSNQSLSEHC				
		* :	* : * : :	:	: :	:	: :
		VIa		VIb		VII	
DRK3	140	VAIALQLVQAIEHI	IHEKCSQP	IVHGD	IKSSNVLLDKNFDC	CKLDFGSAKVG	FSSMVQPP-
HOM1	142	TAIAFQAQAIEHI	IHEKCSQP	IVHGD	IKSSNILLDKHFNSK	LDFGSAKVG	FSSMVQPSK
CLV1	792	HRVAVEAAKGL	CYLHHD	CSP	ILHRD	VKSNNILLDSDFE	FAHVADFG
HAESA	794	LRIALDAAEGL	SYLHHD	CVP	IVHRD	VKSNNILLDSYD	GAKVADFGIAKVG
ERECTA	747	LKIAYGAAQGL	AYLHHD	CSP	RIIHRD	VKSNNILLDKD	LEARLTDFGI
BRI1	984	RKIAIGSARG	LAFLLHNC	SPHI	IHRD	MKSSNVLLDEN	LEARVSDFG
FLS2	971	IDLCVHIASG	IDYLSHSG	YGF	IVHCD	LKPANILLDSR	VAHVSDFG
ATMPK6	167	QYFLYQLRGL	KYIHSAN---	VLHRDLKPS	NLLLNANCDL	KICDFGLARV	-----
ATMPK3	142	QYFLYQLLRGL	KYIHSAN---	IHRDLKPS	NLLLNANCDL	KICDFGLARP	-----
		. :	. : *	: : *	: * : *	: * : *	: * * * :
		VIII		IX			
DRK3	199	---TMSPRSRQ	VKMVSGPY	TDP	PHYLR	-TGIASKKMDMYG	FVVVLELVSGEAFSAERG
HOM1	202	TTSTMSPRSK	QVMIGSPGY	TDP	PHYLR	-TGIASKKMDMYG	FVVVLELVSGEAVSSERG
CLV1	842	-LVDGAASE	CMSSIAGSY	YIAPEYAY	-TLKVDEKSDVYS	FVVVLELIAGK	PPVG-EFG
HAESA	845	QMSGSKTPEAM	SGIAGSCGY	IAPEYVY	-TLRVNEKSDIYS	FVVVLELVGTG	QPTDSELG
ERECTA	797	-LCVSKS-	HTSTYVMGT	IGYIDPEYAR	-TSRLTEKSDVYS	YIVLLELLTRR	KAVD----
BRI1	1034	-MSAMDTHLS	VSTLAGT	PGYVPEYQ	-SFRCS	TGKDVYSYGVV	LELLTGRRPTD
FLS2	1023	FREDG	STTASTSAFEG	TIGYLAPEFAY	-MRKVTTKADV	FSFIIMMEL	MTKRPTSLNDE
ATMPK6	214	----TSE	SDFMTEYV	TRWYRAPELLLN	SSDYTAAIDV	WSVGCIFMEL	MDRKLPLFPGRDH
ATMPK3	189	----TSE	NDFMTEYV	TRWYRAPELLLN	SSDYTAAIDV	WSVGCIFMEL	MNRKPLFPKGDH
		:	* **	* : *	* : *	* : *	* : *
		X					
DRK3	255	EMLVHIAAPLMNE	ILDSSVDISEDKVR	QFLDPRL	LRD---	SLDIDEVKT	MLSVAAVCISS
HOM1	261	EMLVHSTASLI	HEILD	SNGDIGEEKVR	QFLDPRL	SRDG--	SIDLEEVKTMLRVA
CLV1	899	EGVDIVR	WVRNTEEEET	QPSDAA	-IVVAIVD	PRLTG---	YPLTS--VIHVF
HAESA	904	D-KDMAK	VWCTALDKCG	-----	LEPVIDPKLDL	---KFKEE--	ISKVIHIGLLCTSP
ERECTA	850	DES	NLHHLIMSKT	GNNE-----	VMEMADPDITS	---TCKDLG	VVKKVFQAL
BRI1	1092	GDN	NLVGVVQ	HAKLR-----	ISDVFDPELMKE	--DPAL	EIELLQHLKVA
FLS2	1082	DSQDM	TLRQLVEK	SIGNRKG---	MVRVLD	MELGDSIVSL	KQEEAIEDFLK
ATMPK6	270	VHQL	RLLMELIG	TPSEEELEFLN	-ENAKRYIR	QLPPYP	-RQSITDKFPTV
ATMPK3	245	VHQM	RLLELLGT	PTESDLG	PTHNEDAKRYIR	QLPNFP	-RQPLAKLFS
		:	:	:	:	:	:
		XI					
DRK3	312	KLSLR	PSAAQVADTL				
HOM1	319	PPSLR	PSASQVVQTL				
CLV1	953	EAAAR	PTMREVVHML				
HAESA	951	LPLNR	PSMRKVVIML				
ERECTA	899	QPNDR	PTMHQVTRVL				
BRI1	1141	RAWRR	PTMVQMAMF				
FLS2	1138	RPEDR	PDMNEILTHL				
ATMPK6	328	MLTFD	PRRITVLDALAHPYL				
ATMPK3	304	MLTFD	PNRRIITVEQALNHQYL				

I - XI konservierte Kinase-Subdomänen
***** hochkonservierte Aminosäure
: Aminosäuren mit gleichen Eigenschaften
. häufig vorkommende Aminosäure
X in pflanzlichen Kinasen konserviert (Li und Chory, 1997)
X Abweichung im DRK3-Protein
XD RD-Motiv

Abbildung 3-16 Vergleich der Sequenzen verschiedener pflanzlicher Kinasedomänen
 Es wurden die Sequenzen der Kinasedomänen (*PlantsP*, <http://plantsp.genomics.purdue.edu/html/index.html>) von CLV1, ERECTA, HAESA, BRI1, FLS2, ATMPK3, ATMPK6 und HOM1 mit der Kinasedomäne des DRK3-Proteins mit Hilfe von ClustalW2 verglichen.

3.4.4 Interaktionsstudien der verschiedenen Domänen des DRK3-Proteins

Es wurde getestet, ob der N-terminale Bereich der DRK3 mit der Kinasedomäne des DRK3-Proteins interagieren kann, und dies möglicherweise Aufschluss über einen Regulationsmechanismus der DRK3 geben könnte. Um auszuschließen, dass der N-terminale Bereich der DRK3 auch mit anderen Kinasen unspezifisch interagiert, wurde eine weitere Kinasedomäne (DRK2, At4g39270) in die Tests miteinbezogen. Es wurden gerichtete Hefe-Dihybrid-Tests (s. Kap. 2.6.10) durchgeführt. Wie in Abb. 3-17 zu erkennen ist, sind mit Positivkontrollen transformierte Hefen in der Lage auf Interaktionsselektionsmedium (SD-HALW) zu wachsen. Keine der Autoaktivierungskontrollen, die mit einem leerem Vektor transformiert wurden, zeigt Autoaktivierung durch Wachstum auf Interaktionsselektionsmedium. Die Koexpression des N-terminalen Fragmentes des DRK3-Proteins in pGBKT7-GW mit der Kinasedomäne der DRK3 in pGADT7-GW führt zu Wachstum auf Interaktionsselektionsmedium SD-HALW. Dies ist jedoch nicht für die umgekehrte Vektorkombination (N-terminales Fragment in pGADT7-GW und Kinasedomäne in pGBKT7-GW) der Fall. Hefen mit diesen Konstrukten können nicht auf SD-HALW wachsen. Dies könnte möglicherweise auf unterschiedliche Faltung der Fusionsproteine zurückzuführen sein, so dass vielleicht der N-terminale Bereich des DRK3-Proteins im Falle einer GAL4-AD-Fusion nicht exponiert wird. Die erfolgreiche Expression der Proteine wurde im Anschluss in Western-blots überprüft (s. Abb. 3-17).

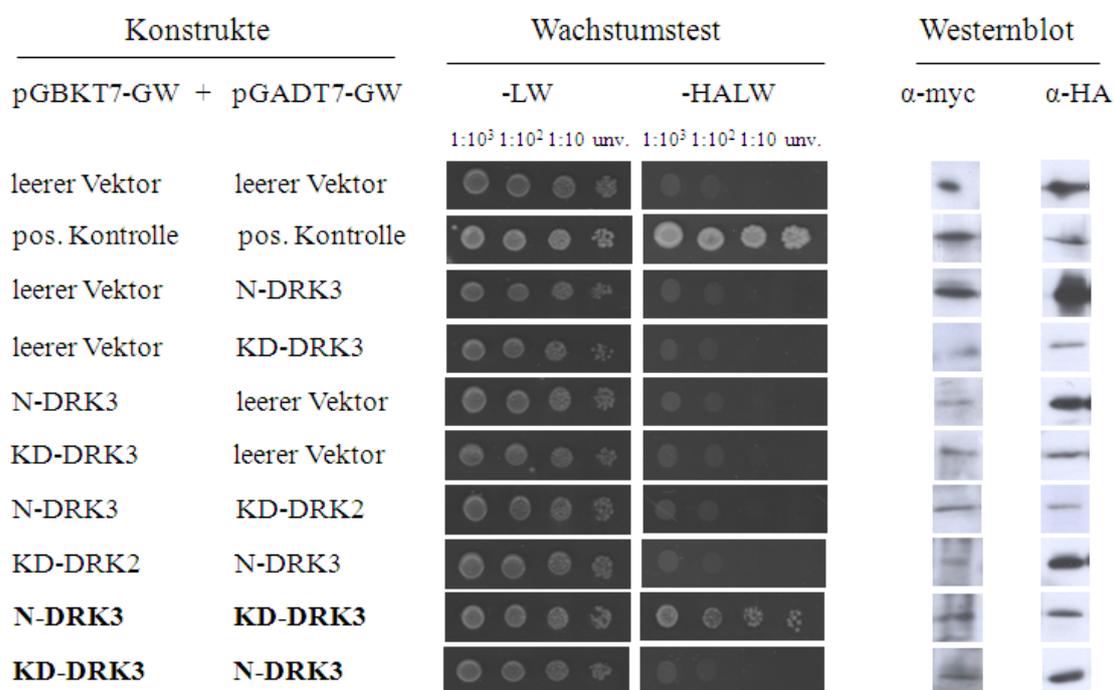


Abbildung 3-17 Interaktionsstudien der Domänen des DRK3-Proteins

Es wurde ein gerichteter Hefe-Dihybrid-Test durchgeführt (s. Kap. 2.6.10). Der Hefestamm AH109 (s. Kap. 2.1.3) wurde mit den entsprechenden Konstrukten transformiert und in den angezeigten Verdünnungen auf SD-LW-Medium als Kontrolle und auf SD-HALW-Medium aufgetropft. Nach 5 Tagen wurde das Wachstum auf dem Interaktionsselektionsmedium SD-HALW überprüft und photographisch festgehalten. Die Expression der verschiedenen Konstrukte wurde mittels Western-blot überprüft (s. Kap. 2.6.7). Mittels eines α -myc-Antikörpers wurden GAL4-BD-Fusionsproteine detektiert und mittels eines α -HA-Antikörpers wurden GAL4-AD-Fusionsproteine detektiert.

3.5 DRK3-verwandte Proteine

3.5.1 Sequenzvergleich der nächsten Homologen mit der DRK3

Die nächsten Homologen des DRK3-Proteins sind in Abb. 3-18 dargestellt. Wie in dem phylogenetischen Baum zu erkennen ist, zeigt vor allen Dingen ein Protein, HOM-1, eine sehr hohe Homologie zur DRK3. HOM1 und DRK3 besitzen eine 76%-ige -Sequenzidentität auf Aminosäureebene. Das HOM1-Protein hat denselben modularen Aufbau wie das DRK3-Protein und kodiert für eine Kinasedomäne. Auch HOM1 enthält weder eine Transmembrandomäne noch eine extrazelluläre Domäne. Auch das HOM-1-Protein wird zur Gruppe der RLKs gerechnet (Shiu und Bleecker, 2003). Im Folgenden wird auf HOM1 näher eingegangen, da dieses aufgrund der hohen Ähnlichkeit zum DRK3-Protein möglicherweise redundant zur DRK3 sein könnte und dessen Funktionen bei Ausfall übernehmen könnte.

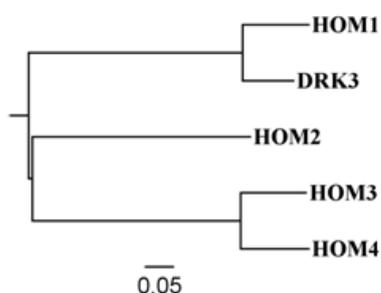


Abbildung 3-18 DRK3 und die nächsten Homologen

Mit Hilfe des Programmes ClustalW2 wurde ein *Alignment* der nächsten Homologen der DRK3 mit der DRK3 vorgenommen und ein phylogenetischer Baum mit der Software <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> erstellt. Die nächsten Homologen sind HOM1 (At1g33260), HOM2 (At5g35960), HOM3 (At5g37790) und HOM4 (At1g66460).

3.5.2 Expression des *HOM1*-Gens

In Tabelle 3-6 ist die Expression des *DRK3*-Gens im Vergleich zu *HOM1* nach Infektion mit *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1 dargestellt (<http://www.arabidopsis.org/portals/expression/microarray/ATGenExpress.jsp>, T. Nürnberger). Im Gegensatz zur *DRK3* wird die Expression des *HOM1*-Gens nur auf das 1,9-fache durch diese Pathogene induziert. Die Expression des *HOM1*-Gens wird in *Microarray*-Experimenten auch durch keine anderen Stress-, Hormon- oder Elizitorapplikationen signifikant induziert. Das *HOM1*-Gen wird jedoch in *Arabidopsis* Samen exprimiert und es wurden cDNA-Sequenzen in Kalli nach Hormonapplikation (BX817262, BX813749, BX813588) und in verschiedenen Geweben (Yamada *et al.*, 2003) identifiziert.

Tabelle 3-6 Relative Werte der *Microarray*-Daten der Expression des *HOM1*- und des *DRK3*-Gens nach Infektion *

	<i>Pto</i> DC3000		<i>Pto</i> avrRpm1	
	6 h	24 h	6 h	24 h
<i>DRK3</i>	3,4	4,2	2,3	3,2
<i>HOM1</i>	1,1	1,9	1,2	1,9

* Farbcode: gelb = 2-2,9-faches, orange = 3-3,9-faches, rot = mehr als 4-faches relatives Fluoreszenzsignal
blau = weniger als 0,5-faches relatives Fluoreszenzsignal

3.5.3 T-DNA-Insertionslinien in *HOM1*

Es wurden zwei T-DNA-Insertionslinien des *HOM1*-Gens von NASC bezogen. Sie wurden als *hom1-1* (N549165) und als *hom1-2* (N814595) bezeichnet (s. Kap. 2.1.5). Die Lokalisation dieser T-DNA-Insertionen im zweiten Exon des *HOM1*-Gens ist in Abb. 3-19 und in Anhang 7.7 gezeigt.



Abbildung 3-19 Genstruktur des *HOM1*-Gens

Es ist das *HOM1*-Gen schematisch dargestellt. Das Gen enthält 2 Exons (graue Balken) und ein Intron (Strich). 5' und 3'-UTR sind als Striche eingezeichnet. Die vorhergesagte Position der T-DNA-Insertionen in den Linien *hom1-1* (Position 842) und *hom1-2* (Position 884) ist angedeutet (schwarze Dreiecke).

Es wurden homozygote Linien mittels Genotypisierung (s. Kap. 2.4.9.2) identifiziert und für alle weiteren Experimente verwendet. Die Transkriptfreiheit in den *hom1-knockout*-Linien war aufgrund der mangelnden Expression des *HOM1*-Gens nicht zu überprüfen. Im Anschluss wurden Doppel-*knockouts* dieser beiden *hom1-knockout*-Linien mit der *drk3-1* hergestellt (s. Abb. 3-20), um zu prüfen, ob additive phänotypische Effekte in diesen Doppel-*knockouts* auftreten.

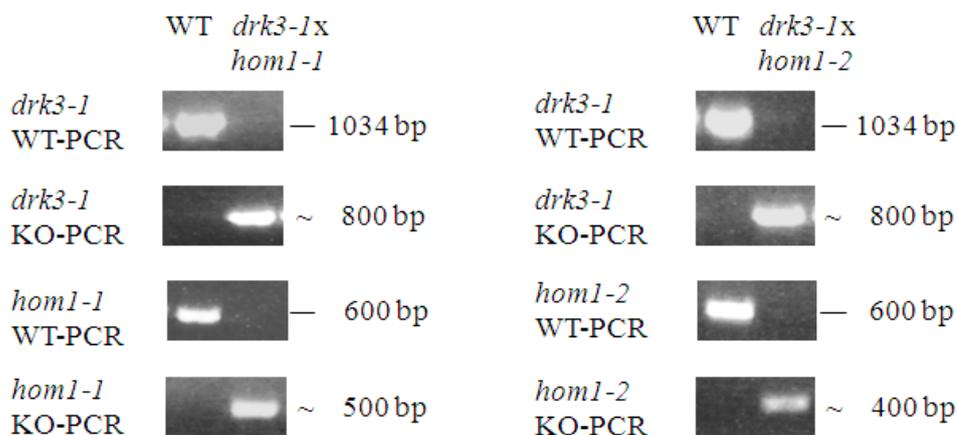


Abbildung 3-20 Genotypisierung von *drk3-1xhom1-1* und *drk3-1xhom1-2*-Pflanzen

Genomische DNA (s. Kap. 2.4.1) von WT-Col-0- (WT) und *drk3-1xhom1-1*- bzw. *drk3-1xhom1-2*-Pflanzen wurde mittels Genotypisierung auf Vorhandensein der T-DNA-Insertionen untersucht (s. Kap. 2.4.9.2). Es wurde sowohl für *drk3-1* als auch *hom1-1* bzw. *hom1-2* jeweils eine WT-spezifische PCR und eine KO-spezifische PCR durchgeführt (s. Kap. 2.4.9.2, Primer s. Anhang 7.1).

3.5.4 Wachstum von *Pseudomonaden* in planta

Es wurde getestet, ob Doppel-*knockouts* der *hom1*-T-DNA-Insertionslinien mit der *drk3-1* ein verändertes Wachstum von *Pto* DC3000 im Vergleich zum *drk3-1*-Einzel-*knockout* zeigen. Wie in Abb. 3-21 gezeigt, konnte keine erhöhte Resistenz der Doppel-*knockouts* *drk3-1xhom1-1* und *drk3-1xhom1-2* gegenüber *Pto* DC3000 im Vergleich zu *drk3-1*-Pflanzen festgestellt werden.

Deshalb wurden die Einzelmutanten des *HOM1*-Gens auch noch nicht in diesen Bakterienwachstumsversuchen getestet.

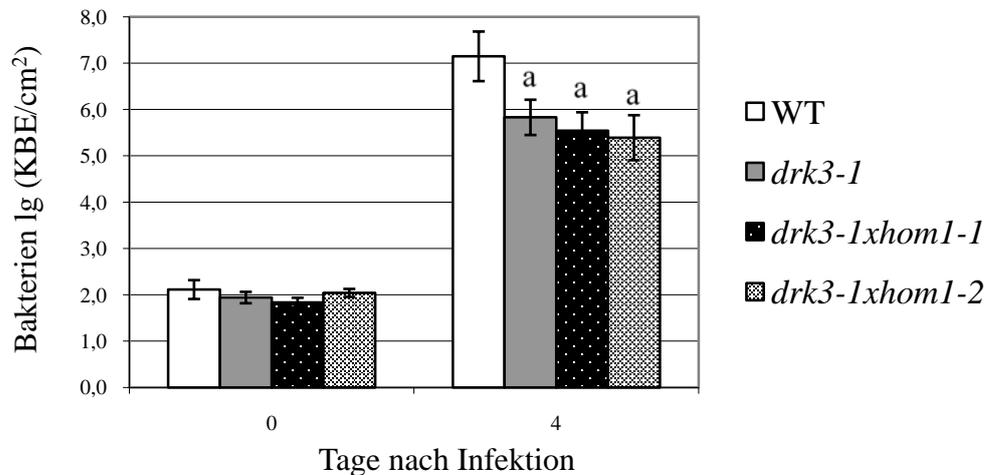


Abbildung 3-21 Wachstum von *Pto* DC3000 in Doppel-Mutanten der *DRK3* mit dem nächsten Homologen *HOM1*

Es ist das Wachstum von *Pto* DC3000 in WT-Col-0- (WT), *drk3-1*-, *drk3-1xhom1-1*- und *drk3-1xhom1-2*-Pflanzen gezeigt. Die Bakterien wurden in 6 Wochen alte Pflanzen in einer Konzentration von 1×10^4 infiziert und die Bakterienzahl nach 0 und 4 Tagen bestimmt (s. Kap. 2.7.2.1). Mit „a“ gekennzeichnete Werte zeigten signifikante Unterschiede (ANOVA, s. Kap. 2.7.6, $p < 0,05$) im Vergleich zu Wildtyppflanzen und es waren keinen signifikanten Unterschiede zu *drk3-1*-Pflanzen feststellbar.

3.6 Interaktionspartner des DRK3-Proteins

Um zu testen, ob möglicherweise ein mit der DRK3-interagierendes Protein die Lokalisation an der Plasmamembran bedingt und um Aufschluss über die Funktion der DRK3 zu erlangen, wurde ein Hefe-Dihybrid-Screen durchgeführt. Die Verwendung einer cDNA-Bank aus etiolierten *Arabidopsis* Keimlingen (K. Harter) ergab keine Interaktionspartner. Deshalb wurde eine neue cDNA-Bibliothek hergestellt (s. Kap. 2.4.14), um mögliche pathogeninduzierte Kandidaten identifizieren zu können.

3.6.1 Herstellung einer neuen cDNA-Bibliothek

Für die Herstellung dieser Bibliothek wurden *Arabidopsis* Pflanzen verwendet, die mit *Pseudomonas*-Stämmen infiziert worden waren (s. Kap. 2.4.14). Die Bibliothek wurde mit dem Matchmaker™ Library Construction & Screening kit von Clontech nach Angaben des Herstellers hergestellt (s. Kap. 2.4.14). Die Bibliothek enthält $5,2 \times 10^6$ Klone/ml. Diese Bibliothek wurde für verschiedene Hefe-Dihybrid-Ansätze verwendet, um mögliche Interaktionspartner des DRK3-Proteins zu identifizieren.

3.6.2 Identifizierung möglicher Interaktionspartner des DRK3-Proteins

Es wurden verschiedene Hefe-Dihybrid-Versuche mit verschiedenen *DRK3*-Konstrukten (Gesamtlängenkonstrukt – FL-DRK3, Kinasedomäne – KD-DRK3 und N-terminale Domäne – N-DRK3) durchgeführt (s. Kap. 2.6.9). Außerdem wurden verschiedene Stringenzen der Selektionsmedien (SD-HALW; SD-HLW) verwendet um alle möglichen Kandidaten erfassen zu können. Die Benutzung des Selektionsmedium SD-HALW führt zu einer höheren Stringenz, hat

aber den Nachteil, dass schwächer interagierende Klone nicht identifiziert werden können (s. Kap. 2.6.9). Deshalb wurde auch das Medium SD-HLW genutzt. Somit konnten mehr positive Klone identifiziert werden. Diese wurden anschließend auf SD-HALW umgesetzt und die Anzahl dieser Kolonien ist in Tabelle 3-7 aufgelistet. Außerdem ist aufgeführt wieviele der Kolonien nach erneutem Umsetzen auf SD-HALW noch in der Lage waren zu wachsen (Überlebende). Nur in diesen wurde das enthaltene cDNA-Fragment identifiziert. Darüberhinaus ist in Tabelle 3-7 die Paarungseffizienz (s. Kap. 2.3.7) der einzelnen Hefe-Dihybrid-Screens aufgelistet. Über die Paarungseffizienz wurde gezeigt, dass in den einzelnen Versuchen die Paarung erfolgreich war.

Tabelle 3-7 Durchgeführte Hefe-Dihybrid-Versuche und Zahl der erhaltenen Kolonien

	FL-DRK3	KD-DRK3	N-DRK3
Screening-stringenz	-HALW (-HLW)	-HLW	-HLW
Zahl der selektierten Kolonien	20 (49)	106	445
Überlebende auf SD-HALW	4 (49)	61	340
Paarungseffizienz	1,2%	1,1%	1,3%

In Tabelle 3-8 sind die identifizierten positiven Kandidaten aufgelistet. Diese Kandidaten wurden in verschiedene Gruppen eingeteilt. So ist in dieser Tabelle dargestellt, welche Kandidaten sich in gerichteten Hefe-Dihybrid-Tests als autoaktivierend entpuppten, welche ein verschobenes Leseraster (*open reading frame*) aufweisen und welche in Chloroplasten bzw. Mitochondrien lokalisiert sind und damit auf den ersten Blick keine Verbindung zur plasmamembranständigen DRK3 aufweisen. Kandidaten, die im falschen Leseraster vorliegen oder in den Chloroplasten bzw. Mitochondrien lokalisiert sind, wurden nicht weiter getestet. Somit ist auch nicht bekannt, welche dieser Fragmente autoaktivierend sind. In Tabelle 3-8 ist außerdem zu erkennen in welchem Screen mit welchem DRK3-Fragment (KD: Kinasedomäne der DRK3; FL: Gesamtlängenkonstrukt der DRK3 oder N: N-terminales Fragment der DRK3) diese Gene identifiziert wurden (Verwendete DRK3-Fragmente). Das Gen At4g16990, RLM3, wurde genauer analysiert, da es sich um ein Resistenzgen gegen den phytopathogenen Pilz *L. maculans* handelt (Staal *et al.*, 2008). Im Folgenden wird auf RLM3 näher eingegangen.

Tabelle 3-8 Identifizierte mögliche Interaktionspartner des DRK3-Proteins

(KD: Kinasedomäne der DRK3; FL: Gesamtlängenkonstrukt der DRK3; N: N-terminales Fragment der DRK3)

AGI-Nummer	Funktion	Verwendete DRK3-Fragmente	Gruppierung	
At2g38240	putative Anthocyanidin-Synthase	FL, KD, N	autoaktivierende Kandidaten	
At4g03280	PETC, photosynthetisches Elektronentransfer Protein C	FL, KD, N		
At1g70800	C2-Domänen enthaltendes Protein	KD		
At1g08450	CRT3, putatives Calreticulinprotein, im ER	FL, N, KD	nicht im Leseraster	
At5g49450	bZIP Transkriptionsfaktor	KD, N		
At5g13640	Phospholipid:Diacylglycerol-Acyltransferase	KD		
At5g02580	unbekanntes Protein	N		
At4g39640	Gamma-Glutamyl Transferase	N		
At1g19670	COR1, Coronatin-induziertes Protein 1	N		
At1g66240	ATX1, Chaperone, metallionenbindend	FL, N		
At5g59880	ADF3, Aktindepolymerisationsfaktor 3	N		
At5g59820	ZAT12, Transkriptionsfaktor	N		
At3g50480	hypothetisches Protein	N		
At5g43150	hypothetisches Protein	N		
At2g28800	ALBINO3, Proteintranslokase	KD		Lokalisation in Chloroplasten
At2g36830	<i>Gamma-Tonoplast-intrinsic protein</i>	KD		
At3g61470	LHCA2, <i>light-harvesting complex gene 2</i>	N		
At3g23400	PAP, <i>plastid-lipid associated protein</i>	N		
At3g49120	Prx34, putative Peroxidase	KD	Lokalisation in Zellwand	
At3g03070	NADH Ubichinon-Oxidoreductase verwandt	N	Lokalisation in Mitochondrien	
At4g16990	RLM3	KD	Kandidaten im richtigen Leseraster	
At2g27830	unbekanntes Protein, Pentatripeptid-enthaltendes Protein	FL		
At1g09560	GLP5, <i>germin-like protein 5</i>	N		

Die Interaktion mit dem in Hefe-Dihybrid-Versuchen identifizierten Fragment der RLM3 (s. Abb. 3-22) sollten in gerichteten Hefe-Dihybrid-Tests bestätigt werden.

Wie in Abb. 3-22 gezeigt, ist die Positivkontrolle in der Lage auf Interaktionsselektionsmedium (SD-HALW) zu wachsen. Das cDNA-Fragment von RLM3 (FR-RLM3) interagiert als GAL4-AD-Fusion mit der Kinasedomäne und dem N-terminalen Abschnitt des DRK3-Proteins, da die Hefen, die diese Konstrukte tragen auf SD-HALW wachsen können. Bei Vektortausch zeigte sich eine Interaktion mit dem Gesamtlängenkonstrukt der DRK3. Diese Unterschiede könnten auf eine verschiedene Faltung der Fusionsproteine zurückzuführen sein. Keine der Kontrollen mit den leeren Vektoren pGBKT7-GW bzw. pGADT7-GW zeigen Autoaktivierung. In einem Western-blot wurde die Expression der einzelnen Fragmente überprüft (s. Abb. 3-22).

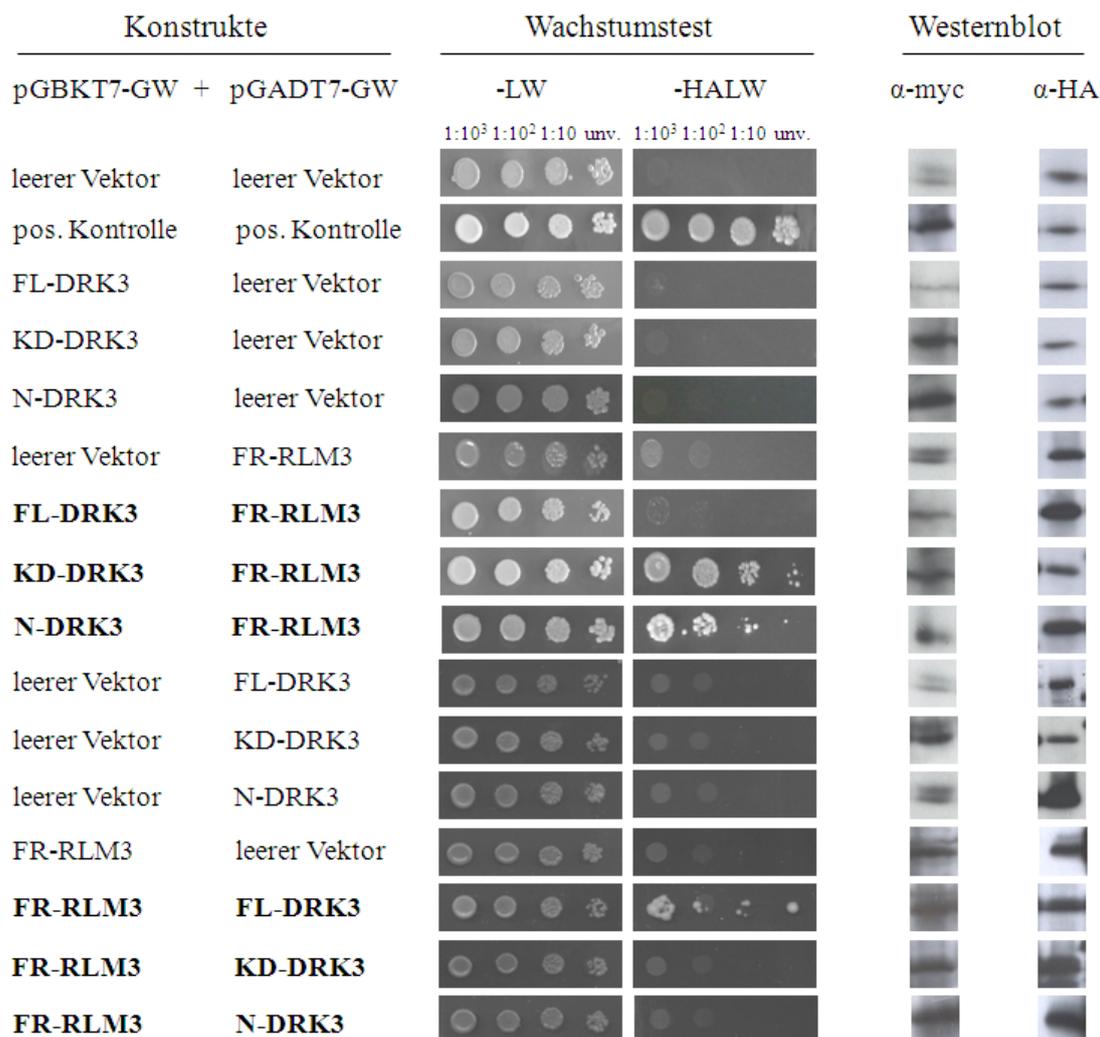


Abbildung 3-22 Interaktionsstudien der DRK3 mit einem C-terminalem Fragment von RLM3

Es wurde ein gerichteter Hefe-Dihybrid-Test durchgeführt (s. Kap. 2.6.10). Der Hefestamm AH109 (s. Kap. 2.1.3) wurde mit den entsprechenden Konstrukten transformiert und in den angezeigten Verdünnungen auf SD-LW-Medium zum Kontrollwachstum und auf SD-HALW-Medium aufgetropft. Nach 5 Tagen wurde das Wachstum auf dem Interaktionsselektionsmedium SD-HALW überprüft und photographisch festgehalten. Die Expression der verschiedenen Konstrukte wurde in einem Western-blot überprüft (s. Kap. 2.6.7). Mittels einem α -myc-Antikörper wurden GAL4-BD-Fusionsproteine detektiert und mit einem α -HA-Antikörper wurden GAL4-AD-Fusionsproteine detektiert.

Um zu testen, ob auch ein Gesamtlängenprotein von RLM3 mit verschiedenen DRK3-Konstrukten interagieren kann, wurden auch hierfür gerichtete Hefe-Dihybrid-Tests durchgeführt. Es wurde ein Klon von *RLM3* verwendet, der für das *splice*-Produkt At4g16690.1 (s. Kap. 3.7) kodiert. Es muss jedoch an dieser Stelle erwähnt werden, dass weitere *splice*-Produkte (s. Kap. 3.7) von *RLM3* auftreten. Mit diesem *RLM3*-Konstrukt konnte keine Interaktion mit den verschiedenen *DRK3*-Fragmenten festgestellt werden (nicht gezeigt).

Die Interaktion mit dem Gesamtlängenprotein von RLM3 sollte zudem in BiFC-Studien überprüft werden (s. Kap. 2.6.12). Hierbei wurden die zu testenden Proteine jedoch in *A.thaliana* Protoplasten nur sehr schwach exprimiert (Daten nicht gezeigt), so dass BiFC in diesem Fall keine geeignete Methode war, um die Interaktion zwischen den DRK3-Fusionsproteinen und RLM3 zu testen. Außerdem wurden Co-Immunopräzipitationsstudien in *N.benthamiana*

durchgeführt, um eine Interaktion des Gesamtlängenproteins von RLM3 mit verschiedenen DRK3-Konstrukten zu testen. Hierfür wurden mit einem RLM3-Gesamtlängen-Konstrukt in dem Vektor pGWB20 (c-terminales myc-tag) die Kinasedomäne, das Gesamtlängenkonstrukt bzw. der N-terminale Bereich der DRK3 in dem Vektor pK7FWG2 (C-terminales GFP-tag) transient in *N. benthamiana* erfolgreich ko-exprimiert (s. Kap. 2.3.5). Anschließend wurden die *N.benthamiana* Zellen aufgeschlossen und mit dem erhaltenen Proteinextrakt das RLM3-myc-Fusionsprotein an α -myc-Agarose immunopräzipitiert (s. Kap. 2.6.13). Es war jedoch noch nicht möglich die verschiedenen DRK3-Fragmente mit dem RLM3-Gesamtlängenprotein an α -myc-Agarose zu co-immunopräzipitieren (nicht gezeigt).

Da jedoch wie im Folgenden gezeigt, verschiedene *splice*-Varianten des RLM3-Proteins existieren, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das DRK3-Protein mit bestimmten Fragmenten von RLM3 interagiert. Im nächsten Kapitel wird detaillierter auf den Interaktor RLM3 eingegangen.

3.7 Resistance to *Leptosphaeria maculans* 3 (RLM3)

RLM3 (*Resistance to Leptosphaeria maculans* 3) zählt zu den TIR-NB-ARC-Proteinen und besitzt eine TIR- (*Toll Interleukin-1 Receptor*-) und eine NB-ARC- (*nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins and CED-4*-) Domäne (s. Abb. 3-23). Typische R-Gene sind entweder TIR-NB-LRR oder CC-NB-LRR-Proteine. RLM3 hat demnach eine Struktur verkürzter R-Gene, da keine LRR-Domäne kodiert wird (Staal und Dixelius, 2008). Die Region, des im Hefe-Dihybrid-Screen identifizierten Fragmentes von RLM3, umschließt eine *disease resistance*, *zinc finger*, *chromosome condensation*- (DZC-) Domäne (s. Abb. 3-23). Diese Domäne ist bekannt aus der Proteinfamilie der *regulator of chromatin condensation* (RCC1) und wird auch als *brevis radix*- (BRX-) Domäne bezeichnet. Diese Domäne kann homo- und heterotypische Protein-Interaktionen ermöglichen (Staal und Dixelius, 2008). In *Arabidopsis* kommen verschiedene *splice*-Varianten von RLM3 vor (Staal *et al.*, 2008). Die von TAIR vorhergesagten *splice*-Produkte und ein durch Staal *et al.*, 2008 identifiziertes Produkt sind in Abb. 3-23 dargestellt. Die Funktion dieser Produkte ist jedoch noch nicht geklärt.

Die Lokalisation des At4g16990.1-Gesamtlängen-RLM3-RFP bzw. eGFP-Fusionsproteines wurde in *A. thaliana* Protoplasten (s. Kap. 2.3.3) bestimmt, um zu prüfen, ob diese Proteine die gleiche Lokalisation aufweisen wie das DRK3-Protein. RLM3 ist aber im Gegensatz zur DRK3 im Zytoplasma der Protoplasten lokalisiert (s. Abb. 3-24).

Die zytoplasmatische Lokalisation eines RLM3-RFP- bzw. RLM3-eGFP-Fusionsproteins wird auch nicht durch Koexpression mit einem membranständigen FL-DRK3-eGFP-Fusionsprotein bzw. FL-DRK3-RFP-Fusionsprotein in *Arabidopsis* Protoplasten beeinflusst (s. Abb. 3-24).

Auch wenn keine Kolokalisation von RLM3 und dem DRK3-Protein in *Arabidopsis* Protoplasten zu erkennen ist, ist es möglich, dass ein bestimmtes Signal eine Interaktion der beiden Proteine auslöst und sich die Lokalisation eines der beiden Proteine daraufhin ändern kann. Möglicherweise wird auch durch die Überexpression der beiden Proteine die Detektion einer gemeinsamen Lokalisation erschwert.

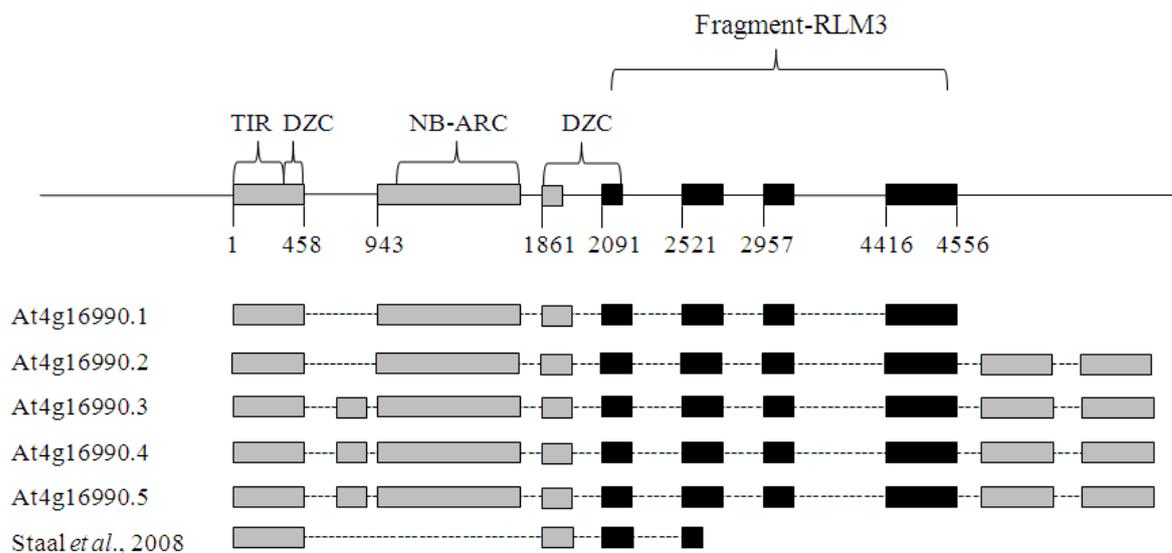


Abbildung 3-23 Genstruktur und Proteindomänen des *RLM3*-Gens/-Proteins

Es ist das *RLM3*-Gen schematisch dargestellt. Das Gen enthält 7 Exons (graue bzw. schwarze Balken) und dazwischen liegen sechs Introns, die wie die 5'- und 3'-UTR als dünne Linie eingezeichnet sind. Die Lokalisation der TIR-, DZC- und NB-ARC-kodierenden Bereiche ist angedeutet. Außerdem ist gezeigt, welches Fragment des *RLM3*-Gens im Hefe-Dihibrid-Screen identifiziert wurde (schwarze Balken). Desweiteren sind von TAIR (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) vorhergesagte bzw. von Staal *et al.*, 2008 identifizierte *splice*-Produkte eingezeichnet.

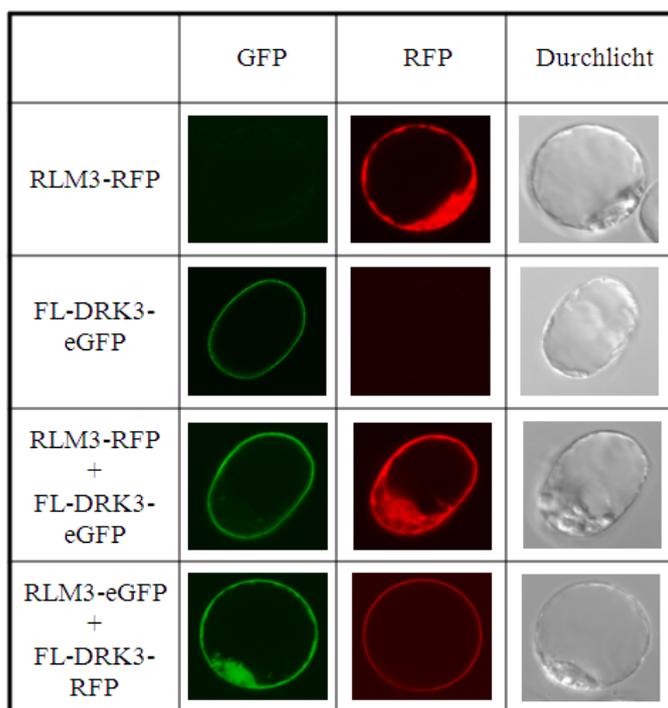


Abbildung 3-24 Lokalisation von RLM3 und FL-DRK3 in *Arabidopsis* Protoplasten

Es wurden *Arabidopsis* Protoplasten nach Transformation (s. Kap. 2.3.3) mit den entsprechenden 35S:*DRK3-eGFP/RFP*-Fusions- und/oder 35S:*RLM3-eGFP/RFP*-Fusionskonstrukt mittels lasergestützter Konfokalmikroskopie analysiert. Die Anregung der GFP-Fluoreszenz erfolgte bei 488 nm und die Detektion bei 500 – 530 nm (s. Kap. 2.6.10). RFP-Fluoreszenz wurde mit 561 nm angeregt und bei 570 – 630 nm detektiert. Es sind die Fluoreszenzbilder (GFP bzw. RFP) und das Durchlichtbild (Durchlicht) dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass RLM3 Resistenz gegenüber dem Pilz *L. maculans* vermittelt (Staal *et al.*, 2008). Ein Defekt in diesem Gen führt zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber *L. maculans* und *A. brassicicola*. Dies kann durch das in Abb. 3-23 eingezeichnete kürzeste *splice*-Produkt des *RLM3*-Gens komplementiert werden. Ob auch der *drk3-knockout* eine erhöhte Resistenz gegenüber *L. maculans* aufweist wird in Kollaboration mit C. Dixelius, Uppsala, getestet. Außerdem ist bekannt, dass wie im Fall der *drk3-1*-Linie, der *knockout* von *RLM3* zu erhöhter Resistenz gegenüber dem bakteriellen Pathogen *Pto* DC3000 führt (Staal *et al.*, 2008). Auch der Ökotyp Antwerpen-1 (An-1), der eine Deletion des *RLM3*-Gens trägt, zeigt dies (s. Abb. 3-25). Die Promotorinsertionslinie *rlm3-1* und die Introninsertionslinie *rlm3-2* zeigen diesen Phänotyp nicht und sind nicht dargestellt. Möglicherweise weisen diese Linien noch funktionelle Transkripte des *RLM3*-Gens auf, dies wurde jedoch von Staal *et al.*, 2008 nicht geprüft.

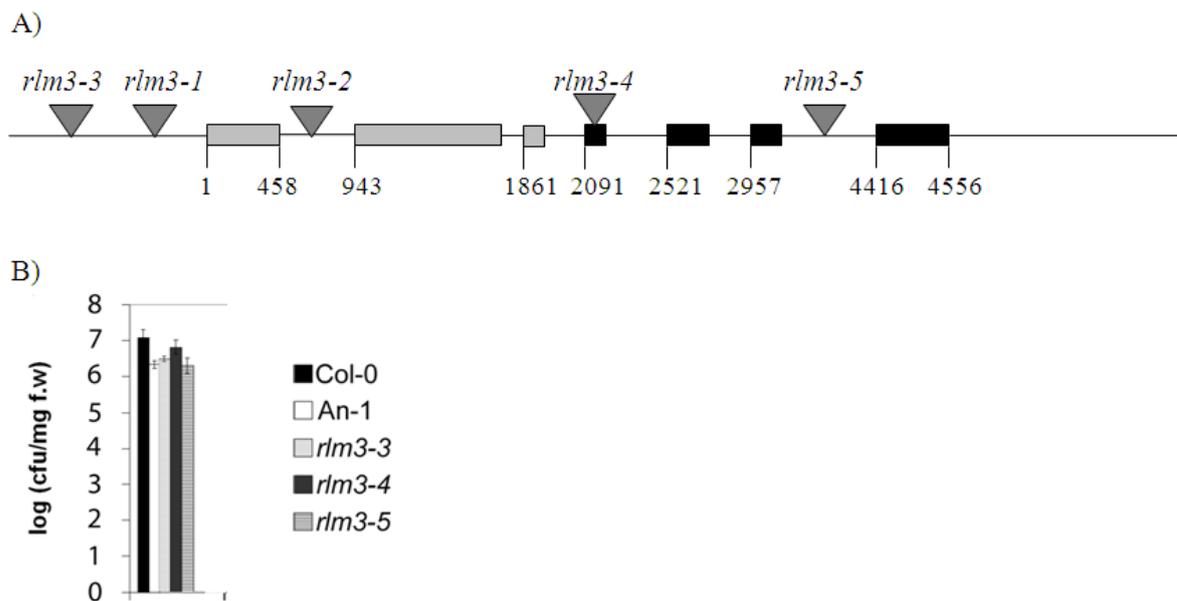


Abbildung 3-25 Resistenz verschiedener *rlm3-knockouts* gegenüber *Pto* DC3000

A) Es ist die Genstruktur des *RLM3*-Gens dargestellt. Die Position der Insertionsstelle der T-DNA in verschiedenen *knockout*-Linien ist angedeutet (graue Dreiecke).

B) Diese Abbildung wurde aus (Staal *et al.*, 2008) entnommen und modifiziert. Der Ökotyp Antwerpen-1 und die *rlm3*-Mutanten *rlm3-3*, *rlm3-4* und *rlm3-5* zeigen erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *Pto* DC3000. Die Pflanzen wurden in eine Bakterienlösung mit $2,5 \times 10^7$ KBE/ml getaucht und das Bakterienwachstum 3 Tage nach Infektion bestimmt.

Obwohl die vorangegangenen Daten zeigen, dass RLM3- und DRK3-Fusionsproteine ohne Stimulus nicht in Protoplasten kolokalisieren, weisen *knockout*-Linien der beiden Gene identische Bakterienresistenz-Phänotypen gegenüber *Pto* DC3000 auf. Dies zeigt, dass beide interagierenden Proteine denselben Effekt auf bakterielle Resistenz haben und daher wahrscheinlich im gleichen Signalweg agieren.

4 Diskussion

Pflanzen sind als sessile Organismen ständig wechselnden Umweltbedingungen ausgesetzt und müssen entsprechende Strategien zur Perzeption bestimmter Umweltsignale und Möglichkeiten der Anpassung besitzen. Auch potentielle Pathogene, die negative Einflüsse auf die pflanzliche Entwicklung haben, müssen erkannt und erfolgreich abgewehrt werden. So dienen der Pflanze spezielle Rezeptoren zur Erkennung pathogenspezifischer MAMPs und Effektoren. Hierzu zählen z.B. die Mustererkennungsrezeptoren FLS2 (Gomez-Gomez und Boller, 2000) und EFR (Zipfel *et al.*, 2006) und Resistenz-Proteine wie RPM1 (Boyes *et al.*, 1998), die nach der Erkennung von angreifenden Pathogenen Abwehrreaktionen induzieren. FLS2 und EFR zählen zur Familie der rezeptorähnlichen Kinasen (RLKs, s. Kap. 1.4). In *Arabidopsis thaliana* werden mehr als 600 RLKs kodiert und von vielen ist die Funktion noch unbekannt. In *Microarray-Experimenten (AtGenExpress)* wurde gezeigt, dass die Expression von 49 LRR-RLKs durch bakterielle Pathogene oder Elizitoren induziert wird (Postel *et al.*, 2009). Da hierzu auch FLS2 zählt, könnten möglicherweise auch andere RLKs eine Funktion in Reaktionen der Immunabwehr besitzen. Eine pathogeninduzierte RLK ist die Rezeptorkinase DRK3 (*defense-related receptor kinase 3*). Die DRK3 ist Gegenstand dieser Arbeit und wurde in Bezug auf ihre Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr genauer untersucht.

4.1 Expressionsmuster des DRK3-Gens

Um einen Ansatzpunkt zu bekommen, in welche Funktionen und Regulationen das DRK3-Gen involviert sein könnte, wurde die Expression des DRK3-Gens in *Arabidopsis thaliana* nach Behandlung mit verschiedenen biotischen und abiotischen Stressoren (s. Kap. 3.1) genauer analysiert.

In unbehandeltem grünem Blattgewebe ist keine Expression des DRK3-Gens detektierbar. Es erfolgte auch wie in Kap. 3.1.1 gezeigt keine Induktion durch das Nichtwirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) und den nicht-pathogenen Bakterien-Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) *hrcC*⁻. *Pto* *hrcC*⁻ trägt eine Deletion des *hrcC*-Gens und kann dadurch kein funktionelles Typ-III-Sekretionssystem mehr ausbilden, welches für die Sekretion von Effektorproteinen nötig ist. Da dies wiederum für die Pathogenität von *P. syringae* unbedingt notwendig ist, ist dieser Stamm nicht in der Lage *Arabidopsis* zu besiedeln, sondern wird durch Reaktionen der PAMP-induzierten Immunität (PTI) abgewehrt (Deng *et al.*, 1998). Da *Pph* und *Pto* *hrcC*⁻ die Expression des DRK3-Gens nicht induzieren, aber funktionelle MAMPs besitzen, sind diese MAMPs vermutlich nicht für die Aktivierung der Expression verantwortlich. Die Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass auch andere Elizitoren die Expression des DRK3-Gens nicht beeinflussen (s. Kap. 3.1.1). Die Expression des DRK3-Gens ist durch den virulenten Stamm *Pto* DC3000 und den avirulenten Stamm *Pto* *avrRpm1* induzierbar (s. Kap. 3.1.1). *Pto* *avrRpm1* ist eine Variante von *Pto* DC3000, die den Effektor *AvrRpm1* exprimiert. Die Wirkung dieses Effektors wird in Pflanzenzellen durch das Resistenzprotein RPM1 erkannt und es werden Abwehrreaktionen der effektorinduzierten Immunität (ETI) ausgelöst (s. Kap. 1.1.3). Sowohl *Pto* DC3000 als auch *Pto* *avrRpm1* bilden ein

funktionelles Typ-III-Sekretionssystem aus. Da einzelne MAMPs bzw. die hrC⁻-Mutante die Expression des *DRK3*-Gens nicht induzieren, kann angenommen werden, dass die Induktion der Expression des *DRK3*-Gens auf einen translozierten Effektor oder dessen Auswirkungen zurückzuführen ist.

Pto DC3000 ist ein hemibiotrophes Pathogen, das in späten Infektionsstadien eine nekrotrophe Lebensphase hat und hierbei Nekrosenbildung im Wirt auslöst. *Pto* avrRpm1 ist ein avirulentes Bakterium, das in *Arabidopsis* ETI-spezifische Abwehrreaktionen wie lokalen Zelltod (HR) induziert. Es wurde gezeigt, dass in *Arabidopsis* in der späten Phase einer erfolgreichen Infektion mit einem virulenten *Pseudomonas* Stamm und in der frühen Phase der ETI ähnliche Gene induziert werden (Tao *et al.*, 2003; Alfano und Collmer, 2004). Da die Expression des *DRK3*-Gens spät nach Infektionen mit *Pto* DC3000 und früh nach Infektionen mit *Pto* avrRpm1 induziert wird, könnte die *DRK3* möglicherweise in ähnliche Reaktionen nach Infektion mit den unterschiedlichen Pathogenen involviert sein.

Die Expression des *DRK3*-Gens wird auch durch den nekrotrophen Pilz *Botrytis cinerea* und Verwundung des Blattes induziert (s. Kap. 3.1.1 und 3.1.2). Sowohl durch hemibiotrophe Organismen wie *Pseudomonas syringae* als auch durch nekrotrophe Pathogene wie *B. cinerea* werden in der Pflanze Zelltodreaktionen ausgelöst. Auch die Verwundung eines Blattes, die z.B. durch Insektenfrass ausgelöst wird, ist mit Zelltod assoziiert (Cutler und Somerville, 2005), so dass möglicherweise alle diese Beispiele einen Hinweis auf eine Funktion des *DRK3*-Gens in Zelltodreaktionen geben.

Die Analyse der Expression des *DRK3*-Gens nach Hormonbehandlung ergab eine sehr starke Aktivierung durch Methyljasmonat (s. Kap. 3.1.2). Jasmonate sind Pflanzenhormone, die verschiedene pflanzliche Prozesse regulieren. So werden unter anderem Wundreaktionen, die Abwehr nekrotropher Pilze und Insekten, aber auch die Etablierung der induzierten systemischen Resistenz (ISR) (Pieterse *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Walling, 2000; de Bruxelles und Roberts, 2001) durch Jasmonate beeinflusst. Auch durch Infektionen mit dem nekrotrophen Pilz *B.cinerea* werden in der Pflanze im Rahmen von Abwehrreaktionen Jasmonate induziert (Thomma *et al.*, 1998) und es könnte in diesem Fall die Induktion des *DRK3*-Gens jasmonatabhängig erfolgen. Jasmonate regulieren Immunabwehrreaktionen im Allgemeinen antagonistisch zu Salizylat. So ist Jasmonat für die Abwehr nekrotropher Organismen von Bedeutung und Salizylat ist wichtig für die pflanzliche Abwehr von biotrophen Organismen (Pieterse *et al.*, 2009). Die Regulationen zwischen den beiden Signalwegen scheinen aber durchaus komplexer zu sein und so finden auch synergistische Interaktionen statt (Kunkel und Brooks, 2002). Das hemibiotrophe Pathogen *Pto* DC3000 benötigt zur erfolgreichen Infektion von *Arabidopsis* einen intakten Jasmonatsignalweg der Pflanze (Kloek *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003; Nickstadt *et al.*, 2004). So werden z.B. jasmonatabhängige Reaktionen durch bakterielle Faktoren, wie das Phytotoxin Coronatin, von *Pseudomonas* induziert. Hierbei werden dann durch antagonistische Regulation SA-abhängige Abwehrreaktionen unterdrückt. Das ermöglicht dann eine erfolgreiche Kolonisierung der Wirtspflanze durch *Pto* DC3000 (Laurie-Berry *et al.*, 2006).

Da sowohl Jasmonat als auch *Pto* DC3000 die Expression des *DRK3*-Gens induzieren, erfolgt die Induktion nach *Pseudomonas*-Infektion vielleicht auch jasmonatabhängig.

Möglicherweise besitzt die *DRK3* auch noch Funktionen in der Regulation anderer abiotischer Stressreaktionen, da z.B. auch eine Induktion der Expression des *DRK3*-Gens durch Trockenheit und Salzstress erfolgt. Diese Prozesse werden unter anderem durch Jasmonate moduliert (Creelman und Mullet, 1995; Moons *et al.*, 1997). Möglicherweise erfolgt auch in diesen Stressreaktionen eine jasmonatabhängige Regulation der Expression des *DRK3*-Gens.

4.2 Effekte veränderter *DRK3*-Expressionslevel

Um einen Hinweis auf die mögliche Funktion der *DRK3* in Immunabwehrreaktionen zu erhalten, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit veränderter Expressionsrate des *DRK3*-Gens verschiedenen Infektionstests mit unterschiedlichen Pflanzenpathogenen unterzogen. Hierzu wurde eine *knockout*-Linie des *DRK3*-Gens, *drk3-1*, von NASC bezogen (s. Kap. 3.2.1). In dieser Linie ist in RT-PCR-Reaktionen und in einem Northern-blot kein natives Wildtyp-Transkript des *DRK3*-Gens mehr vorhanden, so dass angenommen werden kann, dass es sich um ein Null-Allel des *DRK3*-Gens handelt (s. Kap. 3.2.1.2). Da die Linie zwei T-DNA-Insertionen enthält (s. Kap. 3.2.1.3), wurden *drk3-1*-Pflanzen mit einem genomischen Klon des *DRK3*-Gens unter Kontrolle des nativen Promotors komplementiert (s. Kap. 3.2.2). Somit sollte es möglich sein abwehrspezifische Effekte auf den *knockout* des *DRK3*-Gens zurückführen zu können. Da außerdem keine zweite unabhängige *knockout*-Linie dieses Gens käuflich erwerblich war, wurden Linien hergestellt, in denen die Expression des *DRK3*-Gens durch RNA-Interferenz herunterreguliert ist (s. Kap. 3.2.3). Die Effekte einer erhöhten *DRK3*-Expression wurden mit *DRK3*-überexprimierenden Linien getestet (s. Kap. 3.2.3).

Da die Expression des *DRK3*-Gens durch zwei unterschiedliche *Pseudomonas*-Stämme induziert wird (s. Kap. 3.1.1), wurde das Wachstum verschiedener Stämme in *drk3-1*- im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen untersucht (s. Kap. 3.3.1). Gegen viele der getesteten bakteriellen Pathogene konnte kein unterschiedliches Resistenzverhalten der *drk3*-defizienten Linie im Vergleich zu WT-Pflanzen festgestellt werden. Der virulente Stamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 zeigte jedoch ein signifikant vermindertes Wachstum in der *drk3-1*- Mutante und in RNA-Interferenz-Linien im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen. Die erhöhte Resistenz der *drk3-1*-Pflanzen gegenüber *Pto* DC3000 konnte in Komplementationslinien aufgehoben werden, und diese zeigten wiederum dasselbe Resistenzverhalten wie WT-Pflanzen (s. Kap. 3.3.1). Somit kann angenommen werden, dass tatsächlich das Fehlen des *DRK3*-Gens die erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 vermittelt. *DRK3*-überexprimierende-Linien weisen im Vergleich zu WT-Pflanzen eine verstärkte Anfälligkeit gegenüber *Pto* DC3000 auf und zeigen wie erwartet den entgegengesetzten Effekt im Vergleich zu *drk3-1*-Pflanzen.

Die erhöhte Resistenz von *drk3-1*-Pflanzen gegenüber *Pto* DC3000 wird begleitet von einer verstärkten Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und dem vermehrten Auftreten von Zelltod. ROS werden in Abwehrreaktionen von der Pflanze gebildet und ermöglichen ein

Eindämmen der Ausbreitung des Pathogens (Doke und Miura, 1995; Blume *et al.*, 2000). Im Falle der hypersensitiven Reaktion im Rahmen der ETI tritt vermehrt Zelltod an der Infektionsstelle auf. Dies trägt zur erfolgreichen Abwehr biotropher Pathogene bei (Greenberg, 1997). Vermutlich sind die in der *drk3-1*-Mutante vermehrt gebildeten ROS und das verstärkte Auftreten von lokalem Zelltod nach Pathogeninfektion Ursachen für die erhöhte Resistenz der *drk3-1*-Pflanzen gegenüber *Pto* DC3000. Wie bereits erwähnt wird die Expression des *DRK3*-Gens durch Jasmonate und zelltodauslösende nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Organismen induziert. Es gibt Beispiele in Pflanzen in denen die Jasmonatabhängigkeit der Zelltodregulation gezeigt wurde. So inhibiert z.B. Methyljasmonat in *Arabidopsis* nach Ozonbehandlung die Ausbreitung von Zelltod (Rao *et al.*, 2000; Tuominen *et al.*, 2004). Auch die HR wird von einer transienten Jasmonat-Akkumulation begleitet (Seo *et al.*, 2001). Zudem wurde gezeigt, dass der jasmonatabhängige Transkriptionsfaktor JAMYB aus Reis Zelltodreaktionen reguliert (Lee *et al.*, 2001b). Die Induktion der Expression des *DRK3*-Gens durch Organismen, die Zelltodreaktionen in Pflanzen auslösen und durch Methyljasmonat, das Zelltodereignisse regulieren kann, liefern Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang der jasmonatabhängigen Expression des *DRK3*-Gens nach Pathogeninfektion und eine Regulation von Zelltodereignissen. Dies wird durch die Tatsache unterstützt, dass *drk3-1*-Pflanzen lokal eine verstärkte Zelltodantwort aufweisen.

Für Mutanten der *Botrytis induced kinase 1 (BIK1)* konnten ähnliche Phänotypen gezeigt werden. Das BIK1-Protein zählt zur Gruppe der zytoplasmatischen rezeptorähnlichen Kinasen (RLCK) und weist demnach eine der DRK3-ähnliche Struktur auf. Ein *knockout* von *bik1* in *Arabidopsis* führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pto* DC3000. Infektionen mit *Pto* avrRpm1 zeigen wie im Falle von *drk3-1*-Mutanten keinen Wachstumsunterschied. Die *bik1*-Mutante besitzt im Gegensatz zur *drk3-1* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *B.cinerea*, wobei hiermit eine erhöhte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und vermehrtes Auftreten von Zelltod einhergehen (Veronese *et al.*, 2006). BIK1 assoziiert außerdem mit FLS2 und BAK1 *in vivo* und wird nach Flagellinperzeption phosphoryliert (Lu *et al.*, 2010). Das DRK3-Protein zeigt keine Sequenzhomologie zu BIK1, könnte aber eine ähnliche Funktion bei Infektionen mit *Pto* DC3000 erfüllen. Außerdem weisen sowohl *bik1*- als auch *drk3-1*-defiziente Pflanzen ein erhöhtes Auftreten von lokalem Zelltod nach Pathogeninfektion auf, so dass möglicherweise beide Proteine Zelltodereignisse negativ beeinflussen. Für *drk3-1*-Pflanzen konnte keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den nekrotrophen Pilzen *B. cinerea* und *A. brassicicola* im Vergleich zu WT-Col-0-Pflanzen gezeigt werden. Man hätte eigentlich vermutet, dass das vermehrte Auftreten von Zelltod in diesen Mutanten eine Infektion durch nekrotrophe Pathogene begünstigen würde, da sich diese auf totem Pflanzenmaterial vermehren. Möglicherweise zeigen *drk3-1*-Pflanzen eine veränderte Anfälligkeit gegenüber anderen nekrotrophen Pilzen. Es wäre auch denkbar, dass weitere funktionell zur *DRK3* redundante Komponenten vorhanden sind, die eine erhöhte Suszeptibilität von *drk3-1*-Pflanzen, trotz erhöhter Zelltodraten, verhindern.

Außer *bik1* und *drk3-1* zeigen auch Mutanten des Jasmonatsignalweges erhöhte Resistenz gegenüber Infektionen mit *Pto* DC3000, da wie bereits erwähnt ein intakter Jasmonatweg für eine

erfolgreiche Infektion durch *Pto* DC3000 notwendig ist. So werden in WT-Pflanzen durch die Induktion des Jasmonatweges, Abwehrreaktionen, die durch Salizylat reguliert werden, unterdrückt (Kloek *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2003; Nickstadt *et al.*, 2004). In Jasmonatsignalwegmutanten können salizylatabhängige Abwehrreaktionen nicht mehr unterdrückt werden und somit sind diese Pflanzen resistenter gegen bakterielle Pathogene. So reguliert z.B. der Myc-Familien-Transkriptionsfaktor *Jasmonate insensitive 1 (JIN1)* verschiedene jasmonatinduzierte Reaktionen und ein *knockout* führt zu einer salizylatabhängig höheren Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 (Nickstadt *et al.*, 2004; Laurie-Berry *et al.*, 2006). Außerdem ist *suppressor of SA insensitivity 2 (ssi2)* eine JA-Signaltransduktionsmutante deren *knockout* eine erhöhte Aktivierung SA-abhängiger Immunabwehrreaktionen zeigt (Kachroo *et al.*, 2001). Da auch *knockouts* der jasmonatinduzierten *DRK3* wie Mutanten des Jasmonatsignalweges erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 aufweisen, kann vermutet werden, dass bei Pathogeninfektion ähnliche Reaktionen in diesen Mutanten induziert werden. Es wäre denkbar, dass auch in *drk3-1*-Pflanzen SA-abhängige Reaktionen wie in *ssi2* oder *jin1* verstärkt aktiviert werden. Es konnte in der *drk3-1* eine geringfügig erhöhte Konzentration des SA-Gehaltes gemessen werden, die jedoch nicht statistisch signifikant war (s. Kap. 3.3.2). Die Expression des SA-abhängig regulierten *pathogenesis-related (PRI)*-Gens war ebenfalls nicht signifikant verstärkt in *drk3-1*-Mutanten (Daten nicht gezeigt). Es wurde auch ein erhöhter Jasmonatgehalt in *drk3-1*-Mutanten im Vergleich zu WT-Pflanzen gemessen. Dies ist möglicherweise durch eine negative *feedback*-Regulation zu erklären. Trotz des erhöhten Jasmonatgehaltes zeigen *drk3-1*-Pflanzen nach Infektion mit *Pto* DC3000 keine signifikant verstärkte Aktivierung JA-responsiver Gene wie des Pflanzendefensins *PDF1.2* und des vegetativen Speicherproteins *VSP1* (Daten nicht gezeigt).

Das F-Box Protein COI1 ist ebenfalls in den Jasmonatsignalweg involviert (Xie *et al.*, 1998) und *knockout*-Pflanzen weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 auf. COI1 wird also für vollständige Suszeptibilität zu *Pseudomonas syringae* benötigt (Kloek *et al.*, 2001; Nickstadt *et al.*, 2004). Dieses F-Box Protein (Xie *et al.*, 1998) ist Teil eines *Skp1-Cullin-F-Box*- (SCF-) Proteinkomplexes (Zheng *et al.*, 2002), der Proteine für den ubiquitinabhängigen Abbau rekrutiert. So wird z.B. der Abbau einer Histondeacetylase aktiviert, wodurch wiederum die Expression jasmonatresponsiver Gene stimuliert wird (Creelman und Mulpuri, 2002; Devoto *et al.*, 2002). In der *Arabidopsis* Mutante *coi1* konnte eine Herunterregulation der Transkriptmenge des *DRK3*-Gens im Vergleich zu Wildtyppflanzen festgestellt werden (Devoto und Turner, 2005). In dieser *coi1*-Mutante ist die Expression des *DRK3*-Gens auch nicht mehr durch Verwundung oder Methyljasmonatapplikation induzierbar (Devoto und Turner, 2005). Da die Expression des *DRK3*-Gens in den *coi1* Mutanten reduziert ist, wird zur jasmonatabhängigen Aktivierung der Transkription des *DRK3*-Gens ein funktionelles COI1-Protein benötigt.

bik1-Mutanten und die erwähnten Jasmonatsignalmutanten, *coi1* und *ssi2*, weisen neben der erhöhten Resistenz bei Infektionen mit *Pto* DC3000 zudem eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* auf (Thomma *et al.*, 1998; Kachroo *et al.*, 2001). Dies konnte zwar nicht im Falle von *drk3-1*-Pflanzen gezeigt werden, es ist aber möglich, dass die Unterschiede im Vergleich zu WT-Pflanzen bei Infektion von *drk3-1*-Pflanzen unterhalb der

Detektionsgrenze liegen. Es gibt Beispiele wie *Botrytis Susceptible 2 (BOS2)*, dessen *knockout* eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit *B. cinerea*, aber nicht gegenüber anderen getesteten nekrotrophen Pilzen, aufweist (Veronese *et al.*, 2004). Es wäre vorstellbar, dass *drk3-1*-Pflanzen auch spezifisch eine veränderte Suszeptibilität gegenüber bestimmten Pilzen zeigen. Es wäre auch möglich, dass das Auftreten von vermehrten Zelltodereignissen alleine nicht ausreicht, um eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *B. cinerea* zu bedingen.

Bei Infektionen mit *Pseudomonaden* denen die Effektorproteine AvrPto und AvrPtoB fehlen, *Pto ΔavrPto/PtoB*, ist nur eine minimal erhöhte Resistenz von *drk3-1*-Pflanzen im Vergleich zu WT-Pflanzen erkennbar (s. Kap. 3.3.1). AvrPto und AvrPtoB sind Effektoren, die Abwehrreaktionen von *Arabidopsis* unterdrücken können (s. Kap. 1.1.2). In Tomate wird das entsprechende Resistenzprotein Pto (s. Kap. 1.1.3) kodiert und durch Erkennung der Effektoren werden Abwehrreaktionen der ETI induziert (Kim *et al.*, 2002). Da kein funktionelles Pto in *Arabidopsis* kodiert wird, wird keine ETI wie in Tomate ausgelöst und die Effektorfunktionen der beiden Proteine können studiert werden (Göhre und Robatzek, 2008). Das Fehlen der Virulenzfaktoren AvrPto und AvrPtoB bewirkt, dass dieser Stamm ein schwächeres Pathogen auf *A. thaliana* als *Pto* DC3000 ist (Lin und Martin, 2005). Die Überexpression des *DRK3*-Gens hat eine stark erhöhte Anfälligkeit gegen dieses Pathogen zur Folge. Da eine Überexpression des *DRK3*-Gens von Vorteil für virulente *Pseudomonaden* ist, zeigen sich vermutlich im Falle der Infektion von *DRK3-sense*-Pflanzen mit *Pto ΔavrPto/PtoB* deutlichere Unterschiede im Vergleich zu WT-Pflanzen als mit *Pto* DC3000, da das schwächere Pathogen dann leichter die geschwächte Abwehr der Pflanze überwinden kann.

Um einen Einblick zu gewinnen, wie das DRK3-Protein in die Regulation der entsprechenden Reaktionen involviert ist, wurden die molekularen Eigenschaften des Proteins untersucht.

4.3 Molekulare Eigenschaften des DRK3-Proteins

Um mögliche Rückschlüsse auf die Funktion des DRK3-Proteins ziehen zu können, wurden einige molekulare Eigenschaften dieses Proteins genauer analysiert. Das DRK3-Protein zählt aufgrund der Homologie der Ser/Thr-Kinasedomäne zur Familie der RLK/Pelle-ähnlichen Kinasen. Obwohl weder eine extrazelluläre Domäne noch eine Transmembrandomäne im Molekül kodiert wird (Shiu und Bleecker, 2003), wird das Protein aufgrund der sehr kurzen N-terminalen Sequenz nicht zu den typischen RLCKs gezählt, sondern bildet mit seinem nächsten Homologen HOM1, das eine 76 %-ige Identität auf Aminosäureebene aufweist, eine separate Gruppe der RLKs (Shiu und Bleecker, 2003). Die weiteren Homologen des DRK3-Proteins sind weniger nah verwandt und zeigen nur noch eine etwa 30 %-ige Identität auf Aminosäureebene (Phylogenetischer Baum s. Kap. 3.5.1). Diese Homologen, HOM2, HOM3 und HOM4, zählen zur Gruppe der RLCK VI.

Die Lokalisation des DRK3-Proteins wurde in *Arabidopsis* Protoplasten mittels verschiedener DRK3-eGFP-Fusionsproteine bestimmt. Das DRK3-Gesamtlängen-Protein ist überraschenderweise an der Plasmamembran lokalisiert, obwohl keine Transmembrandomäne in

diesem Molekül kodiert wird (s. Kap. 3.4.1). Wird hingegen nur die Kinasedomäne des DRK3-Proteins als eGFP-Fusion in Protoplasten exprimiert, zeigt sich eine Lokalisation im Zytosol. Demnach bestimmen vermutlich die 40 aminoterminalen Aminosäuren die Lokalisation des Gesamtlängen-DRK3-Proteins an der Membran. Mittels verschiedener Programme (s. Kap. 3.4.1) wurde eine mögliche Myristoylierungssequenz an Position 24 in diesem N-terminalen Abschnitt vorhergesagt. Myristoylierung tritt in der Regel am N-Terminus eines Proteins auf und kann entweder posttranslational oder cotranslational in *Arabidopsis* durch zwei *Myristoyl-CoA:protein N-Myristoyltransferases* (NMT), katalysiert werden (Pierre *et al.*, 2007). N-Myristoylierung scheint in *Arabidopsis* häufiger aufzutreten als in Säugern oder Hefe und bei 437 Proteinen wird eine N-Myristoylierung vorhergesagt (Traverso *et al.*, 2008). N-terminale Myristoylierungen führen z.B. im Falle der bakteriellen Effektoren *avrRpm1*, *avrB* und *avrPto* zu einer Membranlokalisierung in Pflanzenzellen (Nimchuk *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000). Der Myristoylierung des DRK3-Proteins müsste jedoch eine Spaltung zwischen Aminosäure 23 und 24 vorausgehen. *AvrPphB* ist ein Effektor aus *P. syringae* pv. *phaseolicola* und löst eine inkompatible Interaktion von *Pph* mit *Arabidopsis*-Pflanzen aus, die das entsprechende Resistenzgen *Resistance to Pseudomonas syringae protein 5* (RPS5) exprimieren (Simonich und Innes, 1995). In Pflanzenzellen erfolgt eine Spaltung des *AvrPphB* Proteins zwischen den Aminosäuren K62 und G63 und anschließend findet eine posttranslationale Myristoylierung des Glyzins an Position 63 statt. Hierdurch wird das Protein an der Membran lokalisiert und dies ist für die Erkennung durch das Resistenzprotein RPS5 unbedingt notwendig (Nimchuk *et al.*, 2000). Auch für das DRK3-Protein wäre denkbar, dass einer Spaltung des Proteins eine posttranslationale Myristoylierung folgt. Um zu testen, ob die putative Myristoylierungssequenz von Bedeutung für die Lokalisation des Proteins ist, wurde die Gensequenz des Myristoylierungsmotivs mutiert. An erster Stelle des Konsensus (GSGVTC) wird dann anstatt eines Glyzins ein Alanin kodiert (s. Kap. 3.4.1). Das Glyzin an Position 1 des Konsensus ist hoch konserviert und eine Mutation führt zu einer Inhibierung der Myristoylierung (Ishitani *et al.*, 2000; Martin und Busconi, 2000; Nimchuk *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000; Murase *et al.*, 2004). Diese Mutation im DRK3-Protein hatte jedoch keine veränderte Lokalisation des Fusionsproteins in *Arabidopsis* Protoplasten zur Folge. Demnach findet entweder keine Myristoylierung des Proteins statt oder diese ist nicht von Bedeutung für die Membranlokalisierung des Proteins. Es gibt auch Beispiele in denen die Myristoylierung nur für die Funktion bestimmter Proteine von Bedeutung ist. So weist das im Zytoplasma lokalisierte Protein *salt-overly-sensitive 3* (SOS3) eine Myristoylierung auf, die für dessen Funktion benötigt wird, aber nicht zu einer Membranlokalisierung führt (Halfter *et al.*, 2000; Ishitani *et al.*, 2000). Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Lokalisation des DRK3-Proteins durch andere Faktoren bestimmt wird, trotzdem aber eine Myristoylierung stattfindet, die für die Funktion des Proteins notwendig ist. Man hätte überprüfen können, ob die Phänotypen der *drk3-1*-Pflanzen mit diesem mutierten Konstrukt noch komplementierbar sind. Dies war aus zeitlichen Gründen jedoch nicht mehr durchführbar. Die Expression des N-terminalen Abschnittes des DRK3-Proteins als eGFP-Fusion in Protoplasten zeigte überraschenderweise auch eine zytoplasmatische Lokalisation des

Fusionsproteins. In diesem Fall kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass faltungsbedingt die 40 Aminosäuren des N-Terminus des DRK3-Proteins nicht exponiert werden und sich im Innern des eGFP-Moleküls befinden und dadurch nur die Lokalisation des eGFP-Proteins detektiert wird.

Da eine Myristoylierung nicht für die Membranlokalisierung verantwortlich ist, könnte das DRK3-Protein auch Bestandteil eines membranlokalisierten Komplexes sein. Dies ist ein weit verbreitetes Phänomen in Signalperzeptionen und -transduktionsereignissen. So sind z.B. die zytoplasmatischen *Drosophila* Proteine Tube, dMyD88 und Pelle erst nach Aktivierung des Rezeptors TOLL mit diesem an der Membran assoziiert (Towb *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002). Auch für das *Arabidopsis* Resistenzprotein RPM1 wird angenommen, dass es durch die Interaktion mit anderen Proteinen peripher an der Plasmamembran assoziiert ist (Boyes *et al.*, 1998). Möglicherweise reagiert das DRK3-Protein über die 40 N-terminalen Aminosäuren mit membranständigen Proteinen und wird so an die Membran rekrutiert. Da der N-terminale Abschnitt des DRK3-Proteins als eGFP-Fusion alleine jedoch keine Lokalisation an der Membran aufweist, ist in diesem Fall entweder der N-Terminus nicht exponiert oder aber alleine nicht ausreichend für eine Interaktion mit weiteren Proteinen, da möglicherweise auch die Kinasedomäne von Bedeutung ist.

Mustererkennungsrezeptoren wie FLS2 und EFR oder auch bakterielle Effektoren wie AvrPto sind an der Membran in Pflanzenzellen lokalisiert. AvrPto ist beispielsweise in der Lage an die Kinasedomäne von FLS2, EFR und BAK1 zu binden, deren Kinaseaktivität zu hemmen und damit Immunreaktionen zu unterdrücken (Shan *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008). Für die der DRK3 strukturell ähnliche, membranlokalisierte RLCK BIK1 ist bekannt, dass sie mit FLS2 und BAK1 assoziiert und nach Flagellinperzeption phosphoryliert wird (Lu *et al.*, 2010). Auch das DRK3-Protein ist membranständig und es wurde gezeigt, dass nach *Pseudomonas*-Infektion DRK3-abhängige Abwehrreaktionen wie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gehemmt werden. Es wäre denkbar, dass das DRK3-Protein nach Expression durch einen membranlokalisierten bakteriellen Effektor beeinflusst wird und/oder durch Interaktion mit Mustererkennungsrezeptorkomplexen möglicherweise in pathogenspezifischen Abwehrreaktionen eine negative regulatorische Funktion besitzt.

Die Serin/Threonin-Kinase DRK3 wird zu den *Non*-RD Kinasen gerechnet. *Non*-RD Kinasen kodieren keinen konservierten Arginin-Rest in Subdomäne VI der Kinasedomäne, durch den eine Regulation der Kinaseaktivität über einen Aktivierungsloop erfolgen kann (Dardick und Ronald, 2006). Es wurde gezeigt dass 12 von 15 Kinasen aus der Mustererkennungsrezeptor (PRR)-Familie zur Gruppe der *Non*-RD-Kinasen zählen. Es wird vermutet, dass *Non*-RD-Kinasen in der Regel Funktionen in Reaktionen der Pathogenabwehr besitzen (Dardick und Ronald, 2006). Da die DRK3 zur Gruppe der *Non*-RD-Kinasen zählt, wird die Theorie unterstützt, dass RLKs, die zu den *Non*-RD-Kinasen gerechnet werden, mit immunrelevanter Funktion ausgezeichnet sind. Für viele Kinasen konnte ihre Kinaseaktivität *in vitro* gezeigt werden. Dies ist z.B. für HAESA (Jinn *et al.*, 2000), ERECTA (Lease *et al.*, 2001), BRI1 (Oh *et al.*, 2000), FLS2 (Gomez-Gomez

et al., 2001), CLAVATA1 (Williams *et al.*, 1997), AtMPK6 und AtMPK3 (Asai *et al.*, 2002) der Fall. Es wurde getestet, ob auch das DRK3-Protein *in vitro* Phosphorylierungs-Aktivität aufweist (s. Kap. 3.4.2). Hierbei konnte jedoch weder für GST-Fusionsproteine mit der Kinasedomäne noch mit dem Gesamtlängen-DRK3-Protein Autophosphorylierungsaktivität oder Phosphorylierung bestimmter Substrate wie MBP, Casein oder Histon gezeigt werden. Es gibt Kinasen für deren Funktion eine aktive Kinasedomäne unabdingbar ist. FLS2 benötigt z.B. neben einer intakten LRR-Domäne eine funktionelle Kinasedomäne um die Erkennung von Flagellin und anschließende Signaltransduktion zu aktivieren (Gomez-Gomez *et al.*, 2001). Für das R-Protein Pto wurde gezeigt, dass Mutationen konservierter Reste in der Kinasedomäne die Auslösung Pto-vermittelter Resistenz gegenüber AvrPto exprimierenden *Pseudomonaden* verhindern können. Somit ist auch in diesem Beispiel die Aktivität der Kinasedomäne unbedingt notwendig für die Funktion des Proteins (Scofield *et al.*, 1996). Es gibt jedoch auch Kinasen mit sogenannten kinase-defekten Domänen (Castells und Casacuberta, 2007). So weist die *maize atypical kinase* (MARK) eine Veränderung konservierter Reste auf und zeigt keine Auto- bzw. Transphosphorylierungsaktivität *in vitro* (Llompert *et al.*, 2003). Aber die intrazelluläre Domäne kann mit einer weiteren Kinase, MIK, interagieren und diese wird dadurch aktiviert (Llompert *et al.*, 2003; Castells und Casacuberta, 2007). Die *Arabidopsis* RLKs *crinkly4-related 1* (CRR1) und CRR2 weisen eine Deletion der Subdomäne VIII der Kinaseregion auf und zeigen abgeschwächte Kinaseaktivität (Cao *et al.*, 2005). CRR2 heterodimerisiert vermutlich mit dem zu CRINKLY4 homologen Protein aus *Arabidopsis*, ACR4, und hierdurch werden Transphosphorylierungsreaktionen von CRR2 durch ACR4 induziert. Da auch für das DRK3-Protein keine Kinaseaktivität *in vitro* gezeigt werden konnte, wurde ein *Alignment* mit Hilfe des Programmes ClustalW2 mit Kinasedomänen von aktiven Kinasen durchgeführt (s. Kap. 3.4.3) (Torii *et al.*, 1996). Hierbei zeigte sich nur ein entscheidender Unterschied der konservierten Reste des DRK3-Proteins im Vergleich zu den anderen Kinasen. Ein konserviertes saures Glutamat ist in Subdomäne VIII durch ein basisches Histidin ersetzt. Subdomäne VIII spielt eine Rolle in der Katalyse der Phosphorylierungsreaktion (Hanks *et al.*, 1988), und somit ist das DRK3-Protein möglicherweise nicht mehr in der Lage diese zu katalysieren. Da im Fall der RLKs CRR1 und CRR2 die Subdomäne VIII deletiert ist und das DRK3-Protein eine Mutation eines Restes in dieser Domäne aufweist, besitzt vermutlich auch das DRK3-Protein eine kinase-defekte Domäne. Da noch nicht gezeigt ist, ob der veränderte konservierte Glutamatrest im DRK3-Protein zu einer Inaktivität der Kinasedomäne führt, kann nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass das DRK3-Protein unter bestimmten Bedingungen Kinaseaktivität besitzt. Es könnte sein, dass das GST-Fusionsprotein die Phosphorylierungsaktivität des DRK3-Proteins beeinträchtigt oder eine Aktivierung durch einen Interaktionspartner bzw. einen Stimulus nötig ist. Auch könnten spezielle Bedingungen notwendig sein, um die Aktivität der DRK3 zeigen zu können. Es gibt Beispiele, wie etwa die Substratphosphorylierungsaktivität der Serin/Threonin-Kinase *salt overly sensitive 2* (SOS2), die calciumabhängig durch das Protein SOS3 aktiviert werden muss, bevor sie ihre katalytische Aktivität entfalten kann (Halfter *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001).

Es wurde gezeigt, dass das DRK3-Protein an der Membran lokalisiert ist und vermutlich eine Kinase-defekte Domäne besitzt. Möglicherweise ist gerade diese Kinase-defekte Domäne nötig, um die zelltodinhibierende und die ROS-Produktion-hemmende Wirkung zu entfalten. Denkbar wäre, dass das DRK3-Protein mit bestimmten membranassoziierten Rezeptorkomplexen über daran beteiligte Kinasedomänen interagiert und eine phosphorylierungsabhängige Signalweiterleitung inhibiert. Im Falle der PAMP-Perzeption könnten über Assoziation des DRK3-Proteins mit Mustererkennungsrezeptoren möglicherweise Immunabwehrreaktionen abgeschwächt werden. Hierdurch könnte die erhöhte Vermehrung von *Pto* DC3000 in WT-Pflanzen im Vergleich zu *drk3-1*-Pflanzen erklärt werden.

Da das DRK3-Protein im Wesentlichen aus einem kurzen N-terminalen Abschnitt und einer Kinasedomäne besteht, wurde mittels des Hefe-Dihybrid-Systems eine Interaktion dieser beiden Domänen getestet (s. Kap. 3.4.4). Es konnte bei Expression des N-Terminus des DRK3-Proteins als GAL4-Bindedomäne-(BD)-Fusion eine Interaktion mit einem Fusionsprotein aus Kinasedomäne und GAL4-Aktivierungsdomäne-(AD) gezeigt werden. Diese Interaktion scheint spezifisch zu sein, da keine Interaktion mit einer Kinasedomäne einer anderen LRR-RLK (DRK2) beobachtet wurde. Bei Expression der zu testenden Domänen in getauschten Vektoren (N-Terminus als GAL4AD- und KD als GAL4BD-Fusion) war diese Interaktion nicht detektierbar. Da der N-Terminus aber wie bereits erwähnt nur aus 40 Aminosäuren besteht, wird im Falle einer GAL4AD-Fusion dieser Abschnitt möglicherweise nicht exponiert.

Ob auch *in vivo* eine relevante Interaktion dieser Domänen stattfindet oder die Interaktion im Hefe-Dihybrid-System ein Artefakt ist, muss noch überprüft werden. Die Interaktion des N-Terminus mit der Kinasedomäne des DRK3-Proteins könnte jedoch auf einen Regulationsmechanismus hindeuten. Möglicherweise bewirkt ein bestimmtes Signal eine Konformationsänderung und damit eine Interaktion oder eine Trennung der beiden Domänen. Möglicherweise interagieren aber auch Kinasedomäne und N-Terminus zweier verschiedener DRK3-Proteine miteinander.

4.4 Das nächste Homologe des DRK3-Proteins

Es gibt Beispiele für Gene, deren nächste homologe Proteine eine ähnliche Funktion erfüllen. So kontrollieren z.B. *somatic embryogenesis receptor kinase 1* (SERK1) und SERK2 zusammen die Bildung von Mikrosporen in *Arabidopsis* und während die Einzel-*knockouts* dieser Gene keinen offensichtlichen Phänotypen besitzen, zeigen Doppel-*knockouts* komplette Sterilität (Albrecht *et al.*, 2005). In Reaktionen der Brassinosteroidperzeption ist SERK1 aber auch teilweise redundant mit SERK3/BAK1. Und außerdem reguliert SERK3 wiederum zusammen mit SERK4 Zelltodreaktionen (He *et al.*, 2007; Albrecht *et al.*, 2008). Auch die *BRI1-like receptor kinase* (BRL1), BRL3 und der Brassinosteroidrezeptor BRI1 zeigen partielle Redundanz (Cano-Delgado *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2004). Diese Beispiele zeigen wie nah verwandte Proteine gemeinsam unterschiedliche Prozesse regulieren können.

Das nächste homologe Protein des DRK3-Proteins, HOM1, zeigt eine 76 %-ige Identität auf Aminosäureebene (s. Kap. 3.5.1), wird jedoch im Gegensatz zum *DRK3*-Gen in *Microarray*-Experimenten in *Arabidopsis* nicht durch *Pto* DC3000 und *Pto* avrRpm1 induziert (s. Kap. 3.5.2). Da jedoch nicht auszuschließen ist, dass HOM1 aufgrund seiner sehr hohen Ähnlichkeit zum DRK3-Protein möglicherweise im Falle der Abwesenheit des DRK3-Proteins in *drk3-1*-Pflanzen dessen Funktion übernimmt, wurden Doppel-*knockouts* von *drk3-1*-Mutanten mit *hom1-1*- und *hom1-2*-Mutanten hergestellt (s. Kap. 3.5.3). Diese Doppel-*knockouts* wurden in bakteriellen Wachstumstests analysiert (s. Kap. 3.5.4). Doppel-*knockouts* der beiden homologen Gene zeigen jedoch keine erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 im Vergleich zu *drk3-1*-Einzel-*knockouts*. Es kann zwar nicht völlig ausgeschlossen werden, dass die weiteren Homologen oder auch andere Kinasen wie BIK1, die ähnliche Phänotypen aufweist (Veronese *et al.*, 2006), eine zur *DRK3*-redundante Funktion übernehmen können, aber der wahrscheinlichste Kandidat, *HOM1*, übernimmt keine redundante Funktion zur *DRK3* in diesem Signalweg.

4.5 Interaktorstudien

Um einen detaillierteren Einblick in die Funktion des DRK3-Proteins zu erhalten, sollten Proteine identifiziert werden, die mit dem DRK3-Protein interagieren können. Hierfür wurden Hefe-Dihybrid-Versuche mit verschiedenen Domänen des DRK3-Proteins durchgeführt (s. Kap. 3.6). Es wurde eine neue cDNA-Bank aus *Arabidopsis* Blättern, die mit verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen induziert wurden, hergestellt. So sollten auch Interaktionspartner identifiziert werden können, die möglicherweise wie das *DRK3*-Gen nur nach Induktion exprimiert werden. Es wurden einige putative Interaktionskandidaten identifiziert, jedoch wurden viele davon im falschen Leseraster kodiert oder zeigten Autoaktivierung. Kandidaten, die in Chloroplasten oder Mitochondrien lokalisiert sind, wurden nicht weiter berücksichtigt.

Das *resistance to Leptosphaeria maculans 3* (RLM3)-Protein wurde genauer analysiert (s. Kap. 3.7). Dieses Protein ist ein TIR-NB-ARC-Protein und ist als Mitglied der Familie der TIR-NB-Resistenz-Gene annotiert. Es zählt zu den verkürzten R-Genen, da es keine LRR-Domäne kodiert (Meyers *et al.*, 2002; Staal und Dixelius, 2008). Von diesen verkürzten TIR-X- oder TIR-NB-Proteinen wird angenommen, dass sie als Adapterproteine ähnlich wie z.B. dMyD88 in *Drosophila* fungieren (Meyers *et al.*, 2002). dMyD88 ist, wie bereits in der Einleitung erwähnt, ein zytoplasmatisches Adapterprotein, das nach Aktivierung des Rezeptors TOLL aus *Drosophila* mit diesem und den Proteinen Tube und Pelle an der Membran assoziiert (Medzhitov und Janeway, 2000; Hoffmann, 2003). In RLM3 konnten drei DZC-Domänen identifiziert werden (s. Kap. 3.7), die Protein-Protein-Interaktionen vermitteln können, deshalb könnte RLM3 als Adapter für die Interaktion von bestimmten R-Genen mit weiteren Proteinen dienen (Staal und Dixelius, 2008). DZC-Domänen wurden außerdem in Transkriptionsfaktoren gefunden (Mouchel *et al.*, 2004), so dass möglicherweise RLM3 auch mit DZC-Transkriptionsfaktoren interagiert (Staal und Dixelius, 2008). Im Falle von RLM3 wurden verschiedene *Splice*-Varianten nachgewiesen, deren Funktion noch genauer analysiert werden muss (Staal und Dixelius, 2008). *RLM3* bedingt Resistenz gegenüber dem Pilz *Leptosphaeria maculans*, da *rlm3-knockout*-

Pflanzen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber diesem Pilz aufweisen (Staal *et al.*, 2008). Weitere Gene, die Resistenz gegenüber *L. maculans* vermitteln, sind die R-Gene *RLM1* und *RLM2* (Staal *et al.*, 2006). Ob auch *rlm3-1*-Mutanten eine veränderte Suszeptibilität gegenüber *L. maculans* aufweisen wird in Kooperation mit C. Dixelius, Uppsala, getestet. Interessanterweise weisen *rlm3-knockout*-Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 Infektionen auf (Staal *et al.*, 2008). Dieser Phänotyp ist identisch zu dem der *drk3-1*-Pflanzen (s. Kap. 3.3.1), was eine Funktion im gleichen Signaltransduktionsweg nahe legt. Im Gegensatz zum *DRK3*-Gen ist jedoch *RLM3* in *Microarray*-Experimenten (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) in unbehandelten *Arabidopsis* Blättern exprimiert und wird nach Infektionen mit *Pto* DC3000, *Pto* avrRpm1 und *Botrytis cinerea* reprimiert. Wie im Falle des *DRK3*-Gens wird die Expression nicht durch den Oomyceten *Phytophthora infestans* und auch nicht durch verschiedene Elizitoren wie Flg22 und LPS beeinflusst. Die Regulation durch die gleichen Faktoren, unterstützt die Hypothese einer Funktion in gleichen Signalwegen. Die Expression von *RLM3* wird jedoch nicht durch Verwundung und Methyljasmonatapplikation verändert.

In einem Hefe-Dihybrid-Screen wurde ein C-terminales Fragment von *RLM3* als Interaktor der Kinasedomäne des *DRK3*-Proteins identifiziert. Es zeigte sich auch eine Interaktion mit dem N-terminalen Bereich des *DRK3*-Proteins (s. Kap. 3.4.4). Vermutlich interagiert das Fragment des *RLM3*-Proteins mit beiden Abschnitten des *DRK3*-Proteins. Wenn die zu testenden Konstrukte in getauschten Vektoren exprimiert wurden, zeigte sich interessanterweise eine Interaktion des Fragmentes von *RLM3* mit dem Gesamtlängenprotein der *DRK3* (s. Kap. 3.6.2). Hierbei war jedoch keine Interaktion mit der Kinasedomäne oder dem N-terminalen Abschnitt des *DRK3*-Proteins detektierbar. Möglicherweise führen die verschiedenen Fusionsproteine *GAL4*-Aktivierungsdomäne bzw. *GAL4*-Bindedomäne zu unterschiedlichen Tertiärstrukturen. So könnte beispielsweise der kurze N-terminale Abschnitt des *DRK3*-Proteins als *GAL4*-Aktivierungsdomänen-Fusion nicht oberflächenexponiert sein. Hierfür würde auch sprechen, dass mit diesem Konstrukt keine Interaktion mit der Kinasedomäne des *DRK3*-Proteins detektierbar war (s. Kap. 3.4.4).

Die Interaktion der verschiedenen *DRK3*-Konstrukte konnte nicht mit einem Vollängenkonstrukt des *RLM3*-Proteins bestätigt werden, das für das *splice*-Produkt At4g16990.1 kodiert (s. Kap. 3.7). Für den Corezeptor *BAK1* wurde gezeigt, dass erst eine Induktion mit Flg22 eine Interaktion mit *FLS2* induziert (Chinchilla *et al.*, 2007). Auch die Interaktion von *BAK1* mit *BRI1* wird durch Brassinosteroide induziert (Li *et al.*, 2002; Nam und Li, 2002) und anschließend werden durch Transphosphorylierungen Signaltransduktionsreaktionen ausgelöst (Wang *et al.*, 2008). Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass auch eine Interaktion von *RLM3* mit dem *DRK3*-Protein durch ein pathogenspezifisches Signal ausgelöst wird. Möglicherweise ist aber auch nur ein bestimmtes *splice*-Produkt von *RLM3* in der Lage mit der *DRK3* zu interagieren. Dies müsste in weiteren Studien getestet werden. Ein *RLM3*-RFP-Fusionsprotein (At4g16990.1) ist in *Arabidopsis* Protoplasten im Unterschied zur membranständigen *DRK3* im Zytoplasma lokalisiert. Die Co-Expression mit einem *DRK3*-Gesamtlängen-eGFP-Fusionsprotein ergab keine Änderung der Lokalisation eines

der beiden Proteine (s. Kap. 3.7). Möglicherweise ist aber auch hier eine bestimmte *splice*-Variante oder ein bestimmtes Signal nötig, dass eine Interaktion der Proteine auslöst und dadurch auch die Lokalisation eines der beiden Proteine verändert wird. So wie im Falle von Tube und Pelle eine Aktivierung des TOLL-Rezeptors eine Membranassoziation der beiden Proteine bewirkt (Towb *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002), wäre auch denkbar, dass RLM3 stimulusabhängig nach Pathogeninfektion an die Membran rekrutiert wird.

Es wäre vorstellbar, dass RLM3 als Adapterprotein eine Interaktion des DRK3-Proteins mit weiteren Interaktionspartnern ermöglicht. So könnte beispielsweise durch den RLM3-Adapter eine Assoziation der DRK3 mit einem bestimmten TIR-NB-R-Gen vermittelt werden. Durch die Aktivierung eines pflanzlichen R-Gens durch einen speziellen pathogenen Effektor könnte eine Interaktion über RLM3 mit dem DRK3-Protein ausgelöst werden. Möglicherweise werden hierdurch dann im Rahmen der ETI die für Pathogene vorteilhaften DRK3-vermittelten Reaktionen wie die Inhibierung der ROS-Produktion unterdrückt. Möglicherweise wird das DRK3-Protein über den RLM3-Adapter im Sinne der *Guard*-Hypothese durch ein bestimmtes R-Protein überwacht. Vielleicht ermöglicht RLM3 aber auch nach Aktivierung durch das DRK3-Protein und Relokalisation in den Zellkern über die DZC-Domänen eine Interaktion mit DZC-Transkriptionsfaktoren und dadurch eine Aktivierung bestimmter Gene.

4.6 Mögliche Funktionen des DRK3-Proteins

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, spielt die DRK3 eine Rolle in Pathogenabwehrreaktionen in *Arabidopsis*. So wird die Expression des *DRK3*-Gens durch zelltodinduzierende Pathogene und Verwundung aktiviert. Zudem erfolgt eine Induktion durch Methyljasmonat, das eine Funktion in der Regulation von Zelltodereignissen haben kann. Da Jasmonate ebenfalls durch zelltodinduzierende Pathogene und Verwundung induziert werden, liefert dieses Expressionsmuster des *DRK3*-Gens einen ersten Hinweis auf eine jasmonatspezifische Induktion der *DRK3* nach Pathogeninfektion zur Regulation von Zelltod (s. Abb. 4-1).

In *drk3-1-knockout*-Pflanzen zeigt sich nach Infektion mit dem hemibiotrophen Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 eine verstärkte Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und vermehrte lokale Zelltodereignisse. Die Induktion des *DRK3*-Gens durch zelltodauslösende hemibiotrophe und nekrotrophe Organismen und das verstärkte Auftreten von Zelltod in *drk3-1*-Pflanzen, lassen darauf schließen, dass das DRK3-Protein in die negative Regulation von Zelltodreaktionen involviert ist.

Im Falle einer Infektion mit *Pto* DC3000 zeigen *drk3-1-knockout*-Pflanzen, wie Mutanten des Jasmonatsignalweges, eine erhöhte Resistenz gegenüber diesem Pathogen. Die erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies und das vermehrte Auftreten von Zelltod in *drk3-1*-Pflanzen bedingen vermutlich die erhöhte Resistenz dieser Pflanzen gegenüber *Pto* DC3000.

Das membranlokalisierte DRK3-Protein ist eine putative Ser/Thr-Kinase, die jedoch keine *in vitro* Kinaseaktivität aufweist und eine kinase-defekte Domäne besitzt. Es wäre denkbar, dass das DRK3-Protein nach Pathogeninfektion mit membranlokalisierten Mustererkennungskomplexen

interagiert. Dadurch könnten Signalweiterleitungsreaktionen unterdrückt werden, und somit Reaktionen wie die Hemmung der Produktion von ROS und lokalen Zelltodereignissen begünstigt werden.

Das als Interaktor identifizierte TIR-NB-Resistenzprotein RLM3 bedingt Resistenz gegenüber dem Pilz *L. maculans*. Ob auch *drk3-1*-Pflanzen diesen Phänotyp zeigen wird in Kooperation mit C. Dixelius, Uppsala, getestet. Die *rlm3-knockout*-Pflanzen zeigen jedoch wie *drk3-1*-Pflanzen erhöhte Resistenz nach Infektionen mit *Pto* DC3000. Dies ist ein Indiz dafür, dass die beiden interagierenden Proteine im gleichen Signalweg eine Rolle spielen. Es wäre vorstellbar, dass das DRK3-Protein von einem bestimmten R-Protein überwacht wird und der RLM3-Adapter zur Interaktion mit diesem notwendig ist. Über RLM3 könnten auch Interaktionen mit anderen Proteinen wie DZC-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden.

Die Induktionsmechanismen des *DRK3*-Gens durch zelltodauslösende Pathogene und die Funktion der DRK3 als negativer Zelltod- und ROS-Regulator sind in Abb. 4.1 zusammenfassend dargestellt.

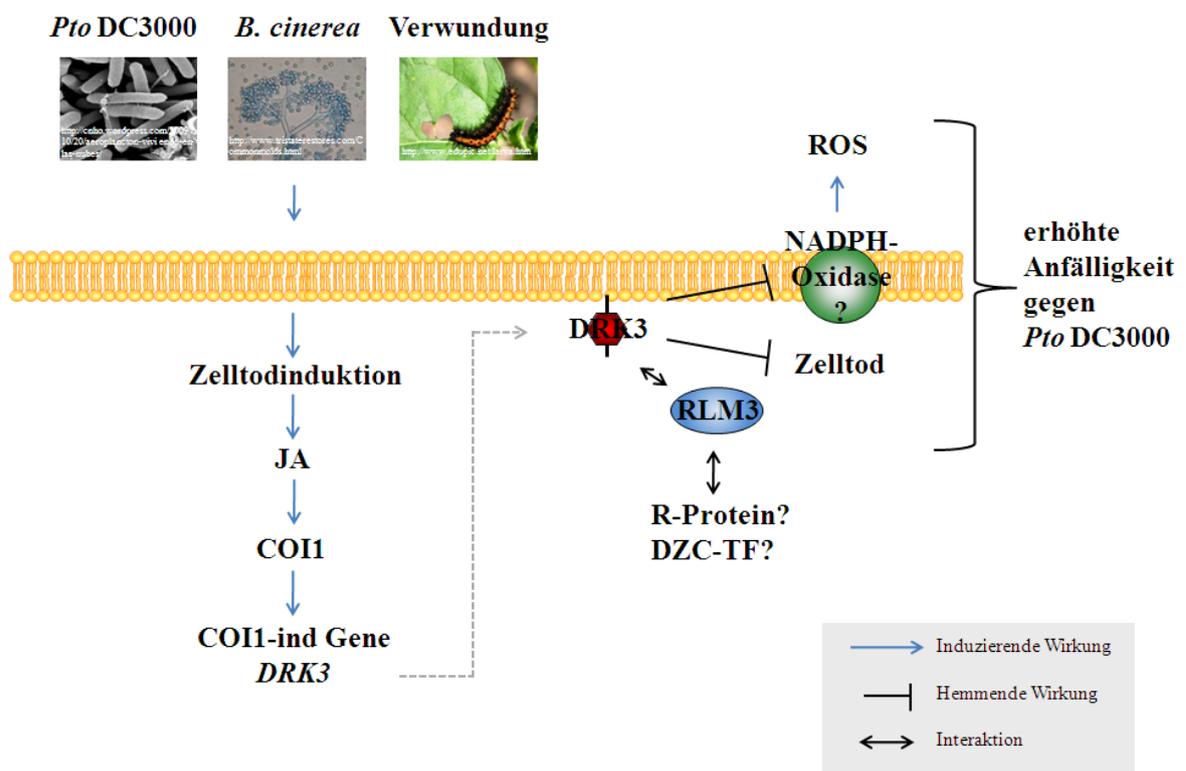


Abbildung 4-1 Zusammenfassung der Funktion der DRK3

Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird die Expression des *DRK3*-Gens jasmonatabhängig durch zelltodauslösende Pathogene induziert. Das plasmamembranlokalisierte DRK3-Protein ist ein negativer Regulator der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und von lokalen Zelltodereignissen. Außerdem interagiert das DRK3-Protein mit RLM3, das möglicherweise als Adapter zur Interaktion mit R-Proteinen oder DZC-Transkriptionsfaktoren dient.

5 Zusammenfassung

Im Genom von *Arabidopsis thaliana* werden mehr als 610 rezeptorähnliche Kinasen (RLKs) kodiert. Von vielen dieser Proteine wurde die Funktion noch nicht aufgeklärt. Einige Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen jedoch Funktionen in Immunabwehrreaktionen, wie z.B. die Mustererkennungsrezeptoren FLS2 und EFR. So wurde vermutet, dass weitere RLKs, deren Expression durch Pathogene induziert wird, auch eine Aufgabe in Abwehrreaktionen besitzen. Die *defence-related receptor kinase 3* (DRK3) ist eine dieser pathogeninduzierten RLKs und wurde in Bezug auf ihre Funktion in pflanzlichen Immunabwehrreaktionen genauer untersucht. Das Gen wird durch *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 und *Pto* avrRpm1 induziert. Es zeigte sich, dass ein *knockout* des *DRK3*-Gens zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pto* DC3000 führt, während in *DRK3*-überexprimierenden Linien der gegenteilige Effekt zu beobachten ist. *drk3-knockout*-Linien weisen außerdem eine erhöhte Produktion an reaktiven Sauerstoffspezies und ein verstärktes Auftreten von Zelltod auf, was vermutlich zur verstärkten Abwehr beiträgt.

Das nächste Homologe des DRK3-Proteins, HOM1, erfüllt in Pathogenabwehrreaktionen vermutlich keine redundante Funktion zur *DRK3*, da Doppel-*knockouts* keine verstärkten Phänotypen aufweisen.

Das membranständige DRK3-Protein ist eine Ser/Thr-Kinase, die weder eine extrazelluläre noch eine Transmembrandomäne enthält. Die Lokalisation wird durch den N-Terminus beeinflusst und ist nicht auf Myristoylierung eines putativen Myristoylierungsmotivs im N-terminalen Abschnitt zurückzuführen. Vermutlich wird die Lokalisation durch eine Interaktion mit anderen membranständigen Proteinen bestimmt. Die Kinasedomäne besitzt *in vitro* keine Kinaseaktivität und zählt aufgrund des veränderten konservierten sauren Glutamates in Subdomäne VIII vermutlich zu den kinase-defekten Rezeptorkinasen.

Unter Verwendung des Hefe-Dihybrid-Systems wurde nach mit dem DRK3-Protein interagierenden Proteinen gesucht. Hierbei konnte als potentieller Interaktionspartner ein Resistenzprotein, RLM3, das Immunität gegen *Leptosphaeria maculans* vermittelt, identifiziert werden. Interessanterweise zeigen auch *RLM3-knockouts* erhöhte Resistenz gegenüber *Pto* DC3000. Ein C-terminales Fragment von RLM3 ist in der Lage in gerichteten Hefe-Dihybrid-Tests sowohl mit dem Gesamtlängenprotein, der Kinasedomäne als auch mit den 40 N-terminalen Aminosäuren des DRK3-Proteins zu interagieren.

In dieser Arbeit konnte eine Rolle der pathogeninduzierten *DRK3* in Immunreaktionen in *Arabidopsis thaliana* nachgewiesen werden. Die Expression des *DRK3*-Gens wird vermutlich jasmonatabhängig durch zelltodauslösende Pathogene induziert. Durch die vermehrte Expression der *DRK3*, wird die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und lokalen Zelltodereignissen unterdrückt. Somit besitzt das DRK3-Protein eine Rolle in der negativen Regulation von Zelltodereignissen nach Pathogeninfektion.

6 Literaturverzeichnis

- Abramovitch, R. B., Martin, G. B.** (2005). AvrPtoB: A bacterial type III effector that both elicits and suppresses programmed cell death associated with plant immunity. *FEMS Microbiol Letters* **245**: 1-8.
- AbuQamar, S., Chai, M.-F., Luo, H., Song, F., Mengiste, T.** (2008). Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *Plant Cell* **20**: 1964-1983.
- Aderem, A., Ulevitch, R. J.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787.
- Albrecht, C., Russinova, E., Hecht, V., Baaijens, E., de Vries, S.** (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell* **17**: 3337-3349.
- Albrecht, C., Russinova, E., Kemmerling, B., Kwaaitaal, M., de Vries, S. C.** (2008). *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. *Plant Physiol* **148**: 611-619.
- Alfano, J. R., Collmer, A.** (1996). Bacterial Pathogens in Plants: Life up against the Wall. *Plant Cell* **8**: 1683-1698.
- Alfano, J. R., Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 385-414.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., Ecker, J. R.** (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M. R., Chiu, W. L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F. M., Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**: 977-983.
- Asselbergh, B., De Vleeschauwer, D., Höfte, M.** (2008). Global switches and fine-tuning - ABA modulates plant pathogen defense. *Mol Plant-Microbe Interact* **21**: 709-719.
- Axtell, M. J., Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J.** (2003). Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol* **49**: 1537-1546.
- Axtell, M. J., Staskawicz, B. J.** (2003). Initiation of *RPS2*-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**: 369-377.
- Baureithel, K., Felix, G., Boller, T.** (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem* **269**: 17931-17938.
- Bent, A. F.** (1996). Plant disease resistance genes: function meets structure. *Plant Cell* **8**: 1757-1771.

- Bisgrove, S. R., Simonich, M. T., Smith, N. M., Sattler, A., Innes, R. W.** (1994). A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell* **6**: 927-933.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-1440.
- Bogdanove, A. J., Wei, Z. M., Zhao, L., Beer, S. V.** (1996). *Erwinia amylovora* secretes harpin via a type III pathway and contains a homolog of yopN of *Yersinia* spp. *J Bacteriol* **178**: 1720-1730.
- Boller, T., Felix, G.** (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.
- Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C., Minibayeva, F.** (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J Exp Bot* **53**: 1367-1376.
- Bonas, U., Lahaye, T.** (2002). Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol* **5**: 44-50.
- Boyes, D. C., Nam, J., Dangl, J. L.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15849-15854.
- Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J. J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., Nürnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J* **21**: 6681-6688.
- Büttner, D., Bonas, U.** (2002). Getting across-bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J* **21**: 5313-5322.
- Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.-C., Nam, K. H., Li, J., Chory, J.** (2004). BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development* **131**: 5341-5351.
- Cao, X., Li, K., Suh, S.-G., Guo, T., Becraft, P. W.** (2005). Molecular analysis of the *CRINKLY4* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **220**: 645-657.
- Castells, E., Casacuberta, J. M.** (2007). Signalling through kinase-defective domains: the prevalence of atypical receptor-like kinases in plants. *J Exp Bot* **58**: 3503-3511.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497-500.
- Chisholm, S. T., Dahlbeck, D., Krishnamurthy, N., Day, B., Sjolander, K., Staskawicz, B. J.** (2005). Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 2087-2092.

- Clark, S. E., Running, M. P., Meyerowitz, E. M.** (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119**: 397-418.
- Clough, S. J., Bent, A. F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**: 735-743.
- Cohn, J., Sessa, G., Martin, G. B.** (2001). Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E.** (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 4114-4119.
- Creelman, R. A., Mulpuri, R.** (2002). The Oxylinin Pathway in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* Book. C. R. Somerville, E. M. Meyerowitz Eds. Rockville, MD, American Society of Plant Biologists. 1-24.
- Cui, H., Xiang, T., Zhou, J.-M.** (2009). Plant immunity: a lesson from pathogenic bacterial effector proteins. *Cell Microbiol* **11**: 1453-1461.
- Cutler, S., Somerville, C.** (2005). Imaging plant cell death: GFP-Nit1 aggregation marks an early step of wound and herbicide induced cell death. *BMC Plant Biology* **5**: 4.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta* **1696**: 237-244.
- Dangl, J. L., Jones, J. D. G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- Dardick, C., Ronald, P.** (2006). Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog* **2**: e2.
- Day, B., Dahlbeck, D., Staskawicz, B. J.** (2006). NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2782-2791.
- de Bruxelles, G. L., Roberts, M. R.** (2001). Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Crit Rev Plant Sci* **20**: 487-521.
- de Castro, E., Sigrist, C. J. A., Gattiker, A., Bulliard, V., Langendijk-Genevaux, P. S., Gasteiger, E., Bairoch, A., Hulo, N.** (2006). ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucl Acids Res* **34**: W362-365.
- de Gregorio, E., Spellman, P. T., Rubin, G. M., Lemaitre, B.** (2001). Genome-wide analysis of the *Drosophila* immune response by using oligonucleotide microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 12590-12595.
- de Pinto, M. C., Tommasi, F., De Gara, L.** (2002). Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiol* **130**: 698-708.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R. A., Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.

- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C.** (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 13454-13459.
- Deng, W.-L., Preston, G., Collmer, A., Chang, C.-J., Huang, H.-C.** (1998). Characterization of the *hrpC* and *hrpRS* operons of *Pseudomonas syringae* pathovars *syringae*, *tomato*, and *glycinea* and analysis of the ability of *hrpF*, *hrpG*, *hrcC*, *hrpT*, and *hrpV* mutants to elicit the hypersensitive response and disease in plants. *J. Bacteriol.* **180**: 4523-4531.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D. X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 8024-8029.
- Devoto, A., Nieto-Rostro, M., Xie, D., Ellis, C., Harmston, R., Patrick, E., Davis, J., Sherratt, L., Coleman, M., Turner, J. G.** (2002). COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 457-466.
- Devoto, A., Turner, J. G.** (2005). Jasmonate-regulated *Arabidopsis* stress signalling network. *Physiol Plant* **123**: 161-172.
- Dodds, P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I. A., Ayliffe, M. A., Kobe, B., Ellis, J. G.** (2006). Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 8888-8893.
- Doke, N., Miura, Y.** (1995). In vitro activation of NADPH-dependent O₂- generating system in a plasma membrane-rich fraction of potato tuber tissues by treatment with an elicitor from *Phytophthora infestans* or with digitonin. *Physiol Mol Plant Pathol* **46**: 17-28.
- Dong, X.** (2004). NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol* **7**: 547-552.
- Donnelly, M. A., Steiner, T. S.** (2002). Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of Toll-like receptor 5. *J Biol Chem* **277**: 40456-40461.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D. F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10328-10333.
- Durrant, W. E., Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**: 185-209.
- Elstner, E. F., Oßwald, W., Schneider, I.** (1996). Phytopathologie: allgemeine und biochemische Grundlagen. Heidelberg, Berlin, Oxford, Spektrum Akademischer Verlag.
- Erbs, G., Newman, M.-A.** (2003). The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Mol Plant Pathol* **4**: 421-425.
- Espinosa, A., Alfano, J. R.** (2004). Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cell Microbiol* **6**: 1027-1040.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K., Somssich, I. E.** (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J* **18**: 4689-4699.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S., Boller, T.** (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**: 265-276.

- Felix, G., Boller, T.** (2003). Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem* **278**: 6201-6208.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., Nürnberger, T.** (2002). NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J* **32**: 375-390.
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H.-R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. L., Bateman, A.** (2008). The Pfam protein families database. *Nucl Acids Res* **36**: D281-288.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G., Ebel, J.** (2004). An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem* **279**: 1132-1140.
- Flor, H. H.** (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv Genet* **8**: 29-54.
- Flor, H. H.** (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**: 275-296.
- Forouhar, F., Yang, Y., Kumar, D., Chen, Y., Fridman, E., Park, S. W., Chiang, Y., Acton, T. B., Montelione, G. T., Pichersky, E., Klessig, D. F., Tong, L.** (2005). Structural and biochemical studies identify tobacco SABP2 as a methyl salicylate esterase and implicate it in plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1773-1778.
- Galan, J. E., Collmer, A.** (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Gas, E., Flores-Perez, U., Sauret-Gueto, S., Rodriguez-Concepcion, M.** (2009). Hunting for plant nitric oxide synthase provides new evidence of a central role for plastids in nitric oxide metabolism. *Plant Cell* **21**: 18-23.
- Gassmann, W., Hinsch, M. E., Staskawicz, B. J.** (1999). The *Arabidopsis* RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J* **20**: 265-277.
- Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., Woods, R. A.** (1995). Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D. R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., Rathjen, J. P.** (2009). AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol* **19**: 423-429.
- Girardin, S. E., Boneca, I. G., Viala, J., Chamaillard, M., Labigne, A., Thomas, G., Philpott, D. J., Sansonetti, P. J.** (2003). Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.
- Glazebrook, J.** (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205-227.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K. U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N. H., Marco, Y.** (2003). ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J* **36**: 353-365.

- Göhre, V., Robatzek, S.** (2008). Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annu Rev Phytopathol* **46**: 189-215.
- Göhre, V., Spallek, T., Häweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J. W., Robatzek, S.** (2008). Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol* **18**: 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**: 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., Boller, T.** (2001). Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**: 1155-1163.
- Gomez-Gomez, L., Boller, T.** (2002). Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci* **7**: 251-256.
- Granado, J., Felix, G., Boller, T.** (1995). Perception of fungal sterols in plants (subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells). *Plant Physiol* **107**: 485-490.
- Grant, M. R., Godiard, L., Straube, E., Ashfield, T., Lewald, J., Sattler, A., Innes, R. W., Dangl, J. L.** (1995). Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science* **269**: 843-846.
- Greenberg, J. T.** (1997). Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 525-545.
- Guerineau, F., Benjdia, M., Zhou, D. X.** (2003). A jasmonate-responsive element within the *A. thaliana* vsp1 promoter. *J Exp Bot* **54**: 1153-1162.
- Guo, Y., Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J.-K.** (2001). Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**: 1383-1400.
- Gust, A. A., Biswas, R., Lenz, H. D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., Nürnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 32338-32348.
- Halfter, U., Ishitani, M., Zhu, J. K.** (2000). The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 3735-3740.
- Hammerschmidt, R.** (2003). Phytoalexin accumulation: response or defense. *Physiol Mol Plant Pathol* **62**: 125-126.
- Hanks, S., Hunter, T.** (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J* **9**: 576-596.
- Hanks, S. K., Quinn, A. M., Hunter, T.** (1988). The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.
- Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Yi, E. C., Goodlett, D. R., Eng, J. K., Akira, S., Underhill, D. M., Aderem, A.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099-1103.

- He, K., Gou, X., Yuan, T., Lin, H., Asami, T., Yoshida, S., Russell, S. D., Li, J.** (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Curr Biol* **17**: 1109-1115.
- He, P., Chintamanani, S., Chen, Z., Zhu, L., Kunkel, B. N., Alfano, J. R., Tang, X., Zhou, J.-M.** (2004). Activation of a COI1-dependent pathway in *Arabidopsis* by *Pseudomonas syringae* type III effectors and coronatine. *Plant J* **37**: 589-602.
- He, Z.-H., He, D., Kohorn, B. D.** (1998). Requirement for the induced expression of a cell wall associated receptor kinase for survival during the pathogen response. *Plant J* **14**: 55-63.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., Voinnet, O.** (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo J* **22**: 4523-4533.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A.** (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-1318.
- Hoffmann, J. A.** (2003). The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**: 33-38.
- Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Huffaker, A., Pearce, G., Ryan, C. A.** (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10098-10103.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., Champion, A., Kreis, M., Zhang, S., Hirt, H.** (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* **7**: 301-308.
- Ingle, R. A., Carstens, M., Denby, K. J.** (2006). PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *BioEssays* **28**: 880-889.
- Inohara, N., Nunez, G.** (2003). Nods: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat Rev Immunol* **3**: 371-382.
- Inohara, N., Ogura, Y., Fontalba, A., Gutierrez, O., Pons, F., Crespo, J., Fukase, K., Inamura, S., Kusumoto, S., Hashimoto, M., Foster, S. J., Moran, A. P., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G.** (2003). Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through Nod2. Implications for CROHN'S disease. *J Biol Chem* **278**: 5509-5512.
- Ip, Y. T., Reach, M., Engstrom, Y., Kadalayil, L., Cai, H., Gonzalez-Crespo, S., Tatei, K., Levine, M.** (1993). Dif, a dorsal-related gene that mediates an immune response in *Drosophila*. *Cell* **75**: 753-763.
- Irving, P., Troxler, L., Heuer, T. S., Belvin, M., Kopczynski, C., Reichhart, J. M., Hoffmann, J. A., Hetru, C.** (2001). A genome-wide analysis of immune responses in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15119-15124.
- Ishitani, M., Liu, J., Halfter, U., Kim, C. S., Shi, W., Zhu, J. K.** (2000). SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* **12**: 1667-1678.
- Janssens, S., Beyaert, R.** (2003). Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* **11**: 293-302.
- Jinn, T.-L., Stone, J. M., Walker, J. C.** (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* **14**: 108-117.

- Jones, J. D. G., Dangl, J. L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Jung, H. W., Tschaplinski, T. J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J. T.** (2009). Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**: 89-91.
- Kachroo, P., Shanklin, J., Shah, J., Whittle, E. J., Klessig, D. F.** (2001). A fatty acid desaturase modulates the activation of defense signaling pathways in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 9448-9453.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E., Shibuya, N.** (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11086-11091.
- Karimi, M., Inze, D., Depicker, A.** (2002). GATEWAY(TM) vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**: 193-195.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Qamar, S. A., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J. E., Müssig, C., Thomma, B. P. H. J., Albrecht, C., de Vries, S. C., Hirt, H., Nürnberger, T.** (2007). The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol* **17**: 1116-1122.
- Kim, J.-G., Li, X., Roden, J. A., Taylor, K. W., Aakre, C. D., Su, B., Lalonde, S., Kirik, A., Chen, Y., Baranage, G., McLane, H., Martin, G. B., Mudgett, M. B.** (2009). *Xanthomonas* T3S effector XopN suppresses PAMP-triggered immunity and interacts with a tomato atypical receptor-like kinase and TFT1. *Plant Cell* **21**: 1305-1323.
- Kim, M. G., da Cunha, L., McFall, A. J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J. L., Mackey, D.** (2005). Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**: 749-759.
- Kim, Y. J., Lin, N.-C., Martin, G. B.** (2002). Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. *Cell* **109**: 589-598.
- Kinkema, M., Fan, W., Dong, X.** (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**: 2339-2350.
- Kloek, A. P., Verbsky, M. L., Sharma, S. B., Schoelz, J. E., Vogel, J., Klessig, D. F., Kunkel, B. N.** (2001). Resistance to *Pseudomonas syringae* conferred by an *Arabidopsis thaliana* coronatine-insensitive (*coi1*) mutation occurs through two distinct mechanisms. *Plant J* **26**: 509-522.
- Koncz, C., Schell, J.** (1986). The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol Gen Genet* **204**: 383-396.
- Kroj, T., Rudd, J. J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J., Scheel, D.** (2003). Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem* **278**: 2256-2264.
- Krysan, P. J., Young, J. C., Sussman, M. R.** (1999). T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **11**: 2283-2290.
- Kumar, D., Klessig, D. F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 16101-16106.

- Kunkel, B. N., Brooks, D. M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 325-331.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell* **16**: 3496-3507.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamb, C., Dixon, R. A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275.
- Laurie-Berry, N., Joardar, V., Street, I. H., Kunkel, B. N.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* JASMONATE INSENSITIVE 1 gene is required for suppression of salicylic acid-dependent defenses during infection by *Pseudomonas syringae*. *Mol Plant-Microbe Interact* **19**: 789-800.
- Lease, K. A., Lau, N. Y., Schuster, R. A., Torii, K. U., Walker, J. C.** (2001). Receptor serine/threonine protein kinases in signalling: analysis of the ERECTA receptor-like kinase of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* **151**: 133-143.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A. P., Panopoulos, N. J., Noller, J., Weiler, E. W., Cornelis, G. R., Mansfield, J. W., Nürnberger, T.** (2001a). HrpZPspH from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 289-294.
- Lee, M.-W., Qi, M., Yang, Y.** (2001b). A novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 527-535.
- Li, B., Fields, S.** (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *Faseb J* **7**: 957-963.
- Li, J., Chory, J.** (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* **90**: 929-938.
- Li, J., Wen, J., Lease, K. A., Doke, J. T., Tax, F. E., Walker, J. C.** (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213-222.
- Lin, N.-C., Martin, G. B.** (2005). An *avrPto/avrPtoB* mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 does not elicit Pto-mediated resistance and is less virulent on tomato. *Mol Plant-Microbe Interact* **18**: 43-51.
- Linthorst, H. J. M.** (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit Rev Plant Sci* **10**: 123-150.
- Liu, J., Elmore, J. M., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Staskawicz, B. J., Coaker, G.** (2009). RIN4 functions with plasma membrane H⁺-ATPases to regulate stomatal apertures during pathogen attack. *PLoS Biol* **7**: e1000139.
- Llompарт, B., Castells, E., Ríó, A., Roca, R., Ferrando, A., Stiefel, V., Puigdomènech, P., Casacuberta, J. M.** (2003). The direct activation of MIK, a germinal center kinase (GCK)-like kinase, by MARK, a maize atypical receptor kinase, suggests a new mechanism for signaling through kinase-dead receptors. *J Biol Chem* **278**: 48105-48111.

- Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sánchez-Rodríguez, C., Jorda, L., Molina, A. (2005). ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J* **43**: 165-180.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L., He, P. (2010). A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 496-501.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A., Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* **108**: 743-754.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J. M., Jecker, J. R., Dangl, J. L. (2003). *Arabidopsis* RIN4 is a target of the Type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**: 379-389.
- Mackey, D., McFall, A. J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Molecul Microbiol* **61**: 1365-1371.
- Malamy, J., Carr, J. P., Klessig, D. F., Raskin, I. (1990). Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Science* **250**: 1002-1004.
- Martin, M. L., Busconi, L. (2000). Membrane localization of a rice calcium-dependent protein kinase (CDPK) is mediated by myristoylation and palmitoylation. *Plant J* **24**: 429-435.
- Mathieu, Y., Kurkdjian, A., Xia, H., Guern, J., Koller, A., Spiro, M. D., O'Neill, M., Albersheim, P., Darvill, A. (1991). Membrane responses induced by oligogalacturonides in suspension-cultured tobacco cells. *Plant J* **1**: 333-343.
- McElver, J., Tzafrir, I., Aux, G., Rogers, R., Ashby, C., Smith, K., Thomas, C., Schetter, A., Zhou, Q., Cushman, M. A., Tossberg, J., Nickle, T., Levin, J. Z., Law, M., Meinke, D., Patton, D. (2001). Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **159**: 1751-1763.
- Medzhitov, R., Janeway, C. A., Jr. (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**: 295-298.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**: 394-397.
- Medzhitov, R., Janeway, C., Jr. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* **173**: 89-97.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiol* **105**: 467-472.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W., Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* **250**: 1004-1006.
- Meyer, A., Puhler, A., Niehaus, K. (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**: 214-222.
- Meyers, B. C., Morgante, M., Michelmore, R. W. (2002). TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. *Plant J* **32**: 77-92.

- Mithöfer, A., Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H., Ebel, J.** (2000). The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol Chem* **381**: 705-713.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., Shibuya, N.** (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19613-19618.
- Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G., Van Montagu, M.** (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *Plant Cell* **9**: 2243-2259.
- Moore, R. A., Starratt, A. N., Ma, S.-W., Morris, V. L., Cuppels, D. A.** (1989). Identification of a chromosomal region required for biosynthesis of the phytotoxin coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Can J Microbiol* **35**: 910-917.
- Mouchel, C. F., Briggs, G. C., Hardtke, C. S.** (2004). Natural genetic variation in *Arabidopsis* identifies BREVIS RADIX, a novel regulator of cell proliferation and elongation in the root. *Genes Dev* **18**: 700-714.
- Mucyn, T. S., Clemente, A., Andriotis, V. M. E., Balmuth, A. L., Oldroyd, G. E. D., Staskawicz, B. J., Rathjen, J. P.** (2006). The tomato NBARC-LRR protein Prf interacts with Pto kinase in vivo to regulate specific plant immunity. *Plant Cell* **18**: 2792-2806.
- Murase, K., Shiba, H., Iwano, M., Che, F. S., Watanabe, M., Isogai, A., Takayama, S.** (2004). A membrane-anchored protein kinase involved in *Brassica* self-incompatibility signaling. *Science* **303**: 1516-1519.
- Mysore, K. S., Ryu, C. M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* **9**: 97-104.
- Nam, K. H., Li, J.** (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 203-212.
- Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J. D. G.** (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **312**: 436-439.
- Navarro, L., Bari, R., Achard, P., Lisón, P., Nemri, A., Harberd, N. P., Jones, J. D. G.** (2008). DELLAs control plant immune responses by modulating the balance of jasmonic acid and salicylic acid signaling. *Curr Biol* **18**: 650-655.
- Newman, M.-A., von Roepenack, E., Mike Daniels, M., Dow, M.** (2000). Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Pathol* **1**: 25-31.
- Newman, M.-A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M. J., Dow, J. M.** (2002). Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J* **29**: 487-495.
- Nickstadt, A., Thomma, B. P. H. J., Feussner, I., Kangasjärvi, J., Zeier, J., Löffler, C., Scheel, D., Berger, S.** (2004). The jasmonate-insensitive mutant *jin1* shows increased resistance to biotrophic as well as necrotrophic pathogens. *Mol Plant Pathol* **5**: 425-434.
- Nimchuk, Z., Marois, E., Kjemtrup, S., Leister, R. T., Katagiri, F., Dangl, J. L.** (2000). Eukaryotic fatty acylation drives plasma membrane targeting and enhances function of several type III effector proteins from *Pseudomonas syringae*. *Cell* **101**: 353-363.

- Nürnberg, T., Colling, C., Hahlbrock, K., Jabs, T., Renelt, A., Sacks, W. R., Scheel, D.** (1994). Perception and transduction of an elicitor signal in cultured parsley cells. *Biochem Soc Symp* **60**: 173-182.
- Nürnberg, T., Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**: 318-324.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B., Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**: 249-266.
- Nürnberg, T., Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol* **6**: 335-345.
- Oh, M. H., Ray, W. K., Huber, S. C., Asara, J. M., Gage, D. A., Clouse, S. D.** (2000). Recombinant brassinosteroid insensitive 1 receptor-like kinase autophosphorylates on serine and threonine residues and phosphorylates a conserved peptide motif in vitro. *Plant Physiol* **124**: 751-766.
- Osborn, A. E.** (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., Klessig, D. F.** (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* **318**: 113-116.
- Parker, J. E.** (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends Plant Sci* **8**: 245-247.
- Penninckx, I. A., Eggermont, K., Terras, F. R., Thomma, B. P., De Samblanx, G. W., Buchala, A., Mettraux, J. P., Manners, J. M., Broekaert, W. F.** (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell* **8**: 2309-2323.
- Pierre, M., Traverso, J. A., Boisson, B., Domenichini, S., Bouchez, D., Giglione, C., Meinel, T.** (2007). N-myristoylation regulates the SnRK1 pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**: 2804-2821.
- Pieterse, C. M., van Wees, S. C., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J., van Loon, L. C.** (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., Van Wees, S. C. M.** (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* **5**: 308-316.
- Postel, S.** (2005). Identifizierung und Charakterisierung einer pathogeninduzierten Rezeptorkinase. *Diplomarbeit* - Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Postel, S., Kemmerling, B.** (2009). Plant systems for recognition of pathogen-associated molecular patterns. *Sem Cell Dev Biol* **20**: 1025-1031.
- Postel, S., Kufner, I., Beuter, C., Mazzotta, S., Schwedt, A., Borlotti, A., Halter, T., Kemmerling, B., Nürnberg, T.** (2009). The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in *Arabidopsis* development and immunity. *Europ J Cell Biol* DOI: [10.1016/j.ejcb.2009.11.001](https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.001).
- Prell, H. H.** (1996). Interaktionen von Pflanzen mit phytopathogenen Pilzen: Parasitierung und Resistenz, Genetik und molekulare Phytopathologie. Jena, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag.

- Rao, M. V., Lee, H.-i., Creelman, R. A., Mullet, J. E., Davis, K. R.** (2000). Jasmonic Acid Signaling Modulates Ozone-Induced Hypersensitive Cell Death. *Plant Cell* **12**: 1633-1646.
- Ride, J. P.** (1983). Cell walls and other structural barriers in defense Chichester, UK, Callow, J. A. .
- Ristaino, J. B.** (2002). Tracking historic migrations of the Irish potato famine pathogen, *Phytophthora infestans*. *Microbes and Infection* **4**: 1369-1377.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A., Bazan, J. F.** (1998). A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 588-593.
- Romeis, T., Tang, S., Hammond-Kosack, K., Piedras, P., Blatt, M., Jones, J. D. G.** (2000). Early signalling events in the Avr9/Cf-9-dependent plant defence response. *Mol Plant Pathol* **1**: 3-8.
- Romeis, T., Ludwig, A. A., Martin, R., Jones, J. D. G.** (2001). Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response. *Embo J* **20**: 5556-5567.
- Ron, M., Avni, A.** (2004). The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell* **16**: 1604-1615.
- Ross, A. F.** (1961a). Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology* **14**: 329-339.
- Ross, A. F.** (1961b). Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* **14**: 340-358.
- Rudrabhatla, P., Rajasekharan, R.** (2003). Mutational analysis of stress-responsive peanut dual specificity protein kinase. Identification of tyrosine residues involved in regulation of protein kinase activity. *J Biol Chem* **278**: 17328-17335.
- Saettler, A. W., Schaad, N. W., Roth, D. A., Eds.** (1989). Detection of bacteria in seed and other planting material. St. Paul, MN, American Phytopathological Society Press.
- Sambrook, J., Russell, D. W.** (2001). Molecular Cloning - A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor.
- Scofield, S. R., Tobias, C. M., Rathjen, J. P., Chang, J. H., Lavelle, D. T., Michelmore, R. W., Staskawicz, B. J.** (1996). Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science* **274**: 2063-2065.
- Seo, S., Seto, H., Yamakawa, H., Ohashi, Y.** (2001). Transient accumulation of jasmonic acid during the synchronized hypersensitive cell death in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 261-264.
- Shan, L., Thara, V. K., Martin, G. B., Zhou, J. M., Tang, X.** (2000). The *Pseudomonas* AvrPto protein is differentially recognized by tomato and tobacco and is localized to the plant plasma membrane. *Plant Cell* **12**: 2323-2338.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S. C., Nürnberger, T., Martin, G. B., Sheen, J.** (2008). Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe* **4**: 17-27.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J. E., Innes, R. W.** (2003). Cleavage of *Arabidopsis* PBS1 by a bacterial type III effector. *Science* **301**: 1230-1233.

- Shiu, S. H., Bleecker, A. B.** (2001a). Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 10763-10768.
- Shiu, S. H., Bleecker, A. B.** (2001b). Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Sci STKE* **2001**: RE22.
- Shiu, S. H., Bleecker, A. B.** (2003). Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **132**: 530-543.
- Simonich, M. T., Innes, R. W.** (1995). A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for the avrPph3 gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**: 637-640.
- Song, W.-Y., Wang, G.-L., Chen, L.-L., Kim, H.-S., Pi, L.-Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.-X., Zhu, L.-H., Fauquet, C., Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**: 1804-1806.
- Spoel, S. H., Johnson, J. S., Dong, X.** (2007). Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 18842-18847.
- Staal, J., Kaliff, M., Bohman, S., Dixelius, C.** (2006). Transgressive segregation reveals two *Arabidopsis* TIR-NB-LRR resistance genes effective against *Leptosphaeria maculans*, causal agent of blackleg disease. *Plant J* **46**: 218-230.
- Staal, J., Dixelius, C.** (2008). RLM3, a potential adaptor between specific TIR-NB-LRR receptors and DZC proteins. *Commun Integr Biol* **1**: 59-61.
- Staal, J., Kaliff, M., Dewaele, E., Persson, M., Dixelius, C.** (2008). RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* **55**: 188-200.
- Stein, J. C., Howlett, B., Boyes, D. C., Nasrallah, M. E., Nasrallah, J. B.** (1991). Molecular cloning of a putative receptor protein kinase gene encoded at the self-incompatibility locus of *Brassica oleracea*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 8816-8820.
- Suarez-Rodriguez, M. C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P. J., Zhang, S., Bent, A. F., Krysan, P. J.** (2007). MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol* **143**: 661-669.
- Sun, H., Bristow, B. N., Qu, G., Wasserman, S. A.** (2002). A heterotrimeric death domain complex in Toll signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 12871-12876.
- Takeda, K., Akira, S.** (2003). Toll receptors and pathogen resistance. *Cell Microbiol* **5**: 143-153.
- Takeda, K., Akira, S.** (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**: 1-14.
- Tameling, W. I. L., Elzinga, S. D. J., Darmin, P. S., Vossen, J. H., Takken, F. L. W., Haring, M. A., Cornelissen, B. J. C.** (2002). The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* **14**: 2929-2939.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J., Kokkinidis, M.** (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**: 805-816.
- Tang, W., Kim, T.-W., Osés-Prieto, J. A., Sun, Y., Deng, Z., Zhu, S., Wang, R., Burlingame, A. L., Wang, Z.-Y.** (2008). BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science* **321**: 557-560.

- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., Katagiri, F.** (2003). Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**: 317-330.
- Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., Pastor-Corrales, M. A.** (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathol* **45**: 469-478.
- Thomas, C. M., Dixon, M. S., Parniske, M., Golstein, C., Jones, J. D.** (1998). Genetic and molecular analysis of tomato Cf genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1413-1424.
- Thomma, B., Eggermont, K., Penninckx, I., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A., Broekaert, W. F.** (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15107-15111.
- Torii, K. U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R. F., Komeda, Y.** (1996). The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell* **8**: 735-746.
- Torii, K. U.** (2004). Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *Int Rev Cytol* **234**: 1-46.
- Towb, P., Galindo, R. L., Wasserman, S. A.** (1998). Recruitment of Tube and Pelle to signaling sites at the surface of the *Drosophila* embryo. *Development* **125**: 2443-2450.
- Towler, D. A., Gordon, J. I., Adams, S. P., Glaser, L.** (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem* **57**: 69-99.
- Traverso, J. A., Meinel, T., Giglione, C.** (2008). Expanded impact of protein N-myristoylation in plants. *Plant Signal Behav* **3**: 501-502.
- Tronchet, M., Balagué, C., Kroj, T., Jouanin, L., Roby, D.** (2009). Cinnamyl alcohol dehydrogenases-C and D, key enzymes in lignin biosynthesis, play an essential role in disease resistance in *Arabidopsis*. *Mol Plant Pathol*: doi:10.1111/j.1364-3703.2009.00578.
- Tsiamis, G., Mansfield, J. W., Hockenull, R., Jackson, R. W., Sesma, A., Athanassopoulos, E., Bennett, M. A., Stevens, C., Vivian, A., Taylor, J. D., Murillo, J.** (2000). Cultivar-specific avirulence and virulence functions assigned to *avrPphF* in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the cause of bean halo-blight disease. *Embo J* **19**: 3204-3214.
- Tuominen, H., Overmyer, K., Keinänen, M., Kollist, H., Kangasjärvi, J.** (2004). Mutual antagonism of ethylene and jasmonic acid regulates ozone-induced spreading cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **39**: 59-69.
- Uknes, S., Mauch-Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E., Ryals, J.** (1992). Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**: 645-656.
- van der Biezen, E. A., Jones, J. D.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci* **23**: 454-456.
- van der Hoorn, R. A., De Wit, P. J., Joosten, M. H.** (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* **7**: 67-71.

- van Loon, L. C., Bakker, P. A., Pieterse, C. M.** (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol* **36**: 453-483.
- van Loon, L. C., van Strien, E. A.** (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 85-97.
- Veronese, P., Chen, X., Bluhm, B., Salmeron, J., Dietrich, R., Mengiste, T.** (2004). The *BOS* loci of *Arabidopsis* are required for resistance to *Botrytis cinerea* infection. *Plant J* **40**: 558-574.
- Veronese, P., Nakagami, H., Bluhm, B., AbuQamar, S., Chen, X., Salmeron, J., Dietrich, R. A., Hirt, H., Mengiste, T.** (2006). The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell* **18**: 257-273.
- Wagner, T. A., Kohorn, B. D.** (2001). Wall-associated kinases are expressed throughout plant development and are required for cell expansion. *Plant Cell* **13**: 303-318.
- Walling, L. L.** (2000). The myriad plant responses to herbivores. *J Plant Growth Regul* **19**: 195-216.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J* **40**: 428-438.
- Walters, D. R., McRoberts, N.** (2006). Plants and biotrophs: a pivotal role for cytokinins? *Trends Plant Sci* **11**: 581-586.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K. M., Clough, S., Kim, S.-Y., Stacey, M. G., Stacey, G.** (2008). A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 471-481.
- Wang, D., Pajeroska-Mukhtar, K., Hendrickson Culler, A., Dong, X.** (2007). Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Curr Biol* **17**: 1784-1790.
- Wang, X., Kota, U., He, K., Blackburn, K., Li, J., Goshe, M. B., Huber, S. C., Clouse, S. D.** (2008). Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Dev Cell* **15**: 220-235.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W., Wang, M. B.** (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 13959-13964.
- Williams, R. W., Wilson, J. M., Meyerowitz, E. M.** (1997). A possible role for kinase-associated protein phosphatase in the *Arabidopsis* CLAVATA1 signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 10467-10472.
- Wu, A.-J., Andriotis, V. M. E., Durrant, M. C., Rathjen, J. P.** (2004). A patch of surface-exposed residues mediates negative regulation of immune signaling by tomato Pto kinase. *Plant Cell* **16**: 2809-2821.
- Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J., Zhou, J.-M.** (2008). *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* **18**: 74-80.

- Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J. G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science* **280**: 1091-1094.
- Yamada, K., Lim, J., Dale, J. M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C. J., Southwick, A. M., Wu, H. C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S. X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H. L., Tripp, M., Chang, C. H., Lee, J. M., Toriumi, M., Chan, M. M. H., Tang, C. C., Onodera, C. S., Deng, J. M., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, A. D., Gurjal, M., Hansen, N. F., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, V. W., Iida, K., Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, P. X., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A., Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, E. K., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, R. W., Theologis, A., Ecker, J. R. (2003). Empirical analysis of transcriptional activity in the *Arabidopsis* genome. *Science* **302**: 842-846.
- Yamaguchi, Y., Pearce, G., Ryan, C. A. (2006). The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in *Arabidopsis*, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 10104-10109.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., Lamb, C. (2004). Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* **136**: 2875-2886.
- Zhao, Y., Thilmony, R., Bender, C. L., Schaller, A., He, S. Y., Howe, G. A. (2003). Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *Plant J* **36**: 485-499.
- Zheng, N., Schulman, B. A., Song, L., Miller, J. J., Jeffrey, P. D., Wang, P., Chu, C., Koepf, D. M., Elledge, S. J., Pagano, M., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Harper, J. W., Pavletich, N. P. (2002). Structure of the Cull1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703-709.
- Zhou, A., Wang, H., Walker, J. C., Li, J. (2004). BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant J* **40**: 399-409.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J. M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R., Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 2751-2755.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E. J., Jones, J. D. G., Felix, G., Boller, T. (2004). Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* **428**: 764-767.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J. D. G., Boller, T., Felix, G. (2006). Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol* **20**: 10-16.

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer

Tabelle 7-1 In dieser Arbeit verwendete Primer mit Sequenz und eingesetzter T_{anneal}

Primer	Sequenz (5'-3')	verwendete T_{anneal} °C
NeuAt4g10390-5'	GACTTGTTATAACAGCTGGGATG	60
At4g10390-3'	GCTACTGATACAGACCGCAGC	60
P745	AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC	58
At1g33260-5'	TCCTCAAGGTAACCTTCAAG	53
At1g33260-3'	GGGCTACGAAGACAGAAAGC	53
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	55
SailLB	GCTTCCTATTATATCTTCCCAAATTACC	55
attB14g10390-5K	AAAAAGCAGGCTTCACCATGGCTTGTTCCTTGAAT	50
attB14g10390-5KD	AAAAAGCAGGCTTCATGTCCAATTTCTCTAGATTGATT	50
attB24g10390-3M	AGAAAGCTGGGTCTCACACTCCTTTACC	50
attB24g10390-3O	AGAAAGCTGGGTCCACTCCTTTACCGCA	50
attB1At4g10390-i-5	AAAAAGCAGGCTGTAGACATTTACAGAGGAC	50
attB2At4g10390-i-3	AGAAAGCTGGGTCAATGACATGCTTCTGCTT	50
At4g10390-F-N	GGTCAGACAGTTCTTGGACC	57
At4g10390-R-N	CACTCCTTTACCGCAACCGAG	57
At4g10390-2-3'	AGCAGCTATATGCACCAGCATCTCACC	59
At4g10390G-Amut-for	CAAACCCACAAGTCAAGCTTCTGGTGTGACTTG	60
At4g10390G-Amut-rev	CAAGTCACACCAGAAGCTTGACTTGTGGGTTTG	60
attB1adapter-5'	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	45 bzw. 55
attB2adapter-3'	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	45 bzw. 55
Opr3-3'	TCAGAGGCGGAAGAAGGAGCCAAG	62
Opr3-5'	GCTTTGAATGCGATTCGAGCTGG	62
efl α -s	TCACATCAACATTTGTGGTCATTGG	57
efl α -as	TTGATCTGGTCAAGAGCCTCAAG	57
pDONR-for	TCGCGTTAACGCTAGCATGGATCTC	61
pDONR-rev	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC	55
Hyg_cds_f	CGCAAGGAATCGGTCAATACACTA	60
Hyg_cds_r	ACTTCTACACAGCCATCGGTCCAG	60
promTeilCI4g10390	ATGTGGGCTCTGCGGAAATACTAG	54
attB14g16990-5K	AAAAAGCAGGCTTCATGAAGTCTTCTTCTT	55
attB24g16990-3O	AGAAAGCTGGGTCAATATCACTTCCCTTAC	55
attB24g16990-3M	AGAAAGCTGGGTCTCAAATATCACTTCC	55
XbaI-4g16990-5K	GCATCTGATCTAGAATGAAGTCTTCTTC	58
XhoI-4g16990-3OS	caggtactcgagaatatcacttcccttac	58
BamHI-4g10390-5KD	GCATCTGAGGATCCTCCAATTTCTCTAGATTGATT	60
XhoI-4g10390-3O	CAGGTACTCGAGCACTCCTTTACCGCA	60
BamHI-4g10390-5K	GCATCTGAGGATCCATGGCTTGTTCCTTGAA	60
XhoI-4g10390-3N	CAGGTACTCGAGAGTGAGATTTCAA	58
5'ADLDinsert	CTATTCGATGATGAAGATACCCCAACAAAC	60
3'ADLDinsert	ACTTGCGGGGTTTTTCAGTATCTACGAT	60
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	58

Primer	Sequenz (5'-3')	verwendete T_{anneal} °C
At4g03280-R	AGTCCTGAAGTCAGTTTCCACCCA	59
At1g08450-R	TATAGATAATTTCCCCCAATGC	54
At2g38240-R	CGACTTGGTTTTTCCACAAGGACC	58

7.2 Sequenz des *DRK3*-Gens mit Lokalisation der T-DNA-Insertion und Genotypisierungs-Primern

```

1 aaaaaataat aaaaacaaaa ttgtcatata tgaaggacgt gacattaata atcgcttttc
61 atatttaact attttctact gcttttccct gattgaaaag caaaaacaaa tgtgttaaat
121 gttttgctta gccccaaaaa gcaaagagac aaaacttgaa agaagagtag tagttagaac
181 gtcagagagc tagctacttc gaaggaaggt ttcattcatc gaaaatggca gctttattat
241 taaataatcg gtcaaaactct gcctcccaat ccaaagtcta aaacotttcc ttcttcttcc
301 tttacaaatc caacaatctc aatgtctcca aatccataac tttcttcgat cccttgttcc
361 ttctctgtgc tgctgttaca ttttttacia aacctaatc aaaccattt tcttctatca
421 atottaacc tagaatcaaa taaagactca atctttcttt gctttgctct gttctgctct
481 gtttttgctc tgtttttata ATGGCTTGTT TCTTGAATTG TGTAGATTG GATGCTCCA
541 AGACGATCAC CGACAAACCC ACAAGTCAAG GATCTGGTGT GACTTGTAT AACAGCTGGG
601 ATGATGTTGA AACTCTCACT TCCAATTTCT CTAGATTGAT TGGTCTGGT GGCTATAGCA
661 GTATCTACAT GGCTCGCTTC TCTGGCTCTG ATAAAGCGGC TCTCAAGGT CATGTTAGTA
721 GTCACCGTCT TTATCAAGTC TTTAGACTTG AGCTTGATAT TTTGCTTCGT CTTCAACATC
781 CTAACATTGT CAAGCTTCTT GGCTATTTTCG ATGATTCAGG tactacttct gaaatctcat
841 agattctgca aatatttggg gtctgggtcaa ttgtgttggg gtcttgatta agccaatttt
901 agtgattaag tttgtcttaa tcaaagtttt gatctttatt tgttttatca agttgttga
961 tatatttgca tatagactta tgttctgctt ctttgtatth cagAGGAAAA TGGTGCTCTT
1021 CTTCTTGAGT ATCTTCTCA AGGAAATCTA CAAGAGAAGC TCCAAAGCAA TAGCAAGCAA
1081 GTCTTGCAAT GGAGGAACCG TGTAGCGATT GCGTTACAGT TAGTTCAAGC TATGAACAT
1141 ATTCATGAGA AATGTAGCCC GCAGATAGTG CACGGGGACA TCAAATCTTC CAACGTTCTT
1201 CTAGACAAAA ACTTTGATTG CAAGCTTTCG GATTTGCGGT CAGCTAAAGT CGGGTTCTCT
1261 TCGATGGTTC AGCCTCTAC GATGTCGCCT AGATCTAGAC AAGTGAAGAT GGTGGGATCT
1321 CCAGGTTACA CAGACCCTCA TTATTTAAGA ACCGGGATTG CTTCAAGAA GATGGATATG
1381 TATGGGTTTG GAGTTGTGGT TCTTGAGTTG GTTTCAGGAA AAGAAGCGTT TTCTGCTGAG
1441 AGAGGTGAGA TGCTGGTGCA TATAGCTGCT CCACTTATGA ATGAGATTTT GGATVTCGAGT
1501 GTAGACATTT CAGAGGACAA GGTCAGACAG TTCTTGACC CGAGGTTGTT AAGGGATAGT
1561 CTTGATATCG ATGAGGTCAA GACAATGTTG AGTGTTGCTG CCGTCTGTAT CAGTAGCAAG
1621 CTATCTCTAA GACCTTCGGC TGCTCAAGTA GCGGATACTC TTATAAAGGA AATACCATCA
1681 TTGAGTTTCC TCGGTTGCGG TAAAGGAGTG TGAgttatcg gtgtcgatgg tttttgttgt
1741 agtgtggtta ggctgcgtga acgacactgt aaagtgggtg tgcatttagg agtttcttgg
1801 aaaaccagca agaagaataa ccatgtaaat actcttgttt tgttttgta atagaagcag
1861 gaaataacat tttgtctaat tatcattcat caacatttcc taggaaatgt aattttgatt
1921 gttgttttgt cttgaaatct tagagagaaa gagaagttct gttcatgtca atgtaatgta
1981 aagtaaagct taaagcagaa gcatgtcatt gtgaatatga agcaaagttt atgtgacttg
2041 tagtgcaatt tcaaaggttc tgattctcaa ttccttcaag atacagtaac acagcaatca
2101 aaggccttcc taggagaaat aactgtaata agctaaaaaa aactgaagtt tgaactaaa
2161 gtcaggaaga gaaagcccaa aacaccattg tgaagtttcc ttgaaagtga gct

```

→ Orientierung der Primer und der inserierten T-DNA

▼ T-DNA Insertionsstelle in *drk3-1*

xxx – Intron oder untranslatierter Bereich

XXX – Exon

Genspezifische Primer:

XXX NeuAt4g10390-5′

XXX At4g10390-3′

7.3 Sequenz des *DRK3*-Gens mit RT-PCR-Primern

```

1 aaaaaataat aaaaacaaaa ttgtcatata tgaaggacgt gacattaata atcgcttttc
61 atatthaact attttctact gcttttcctt gattgaaaag caaaaacaaa tgtgttaaat
121 gttttgctta gccccaaaaa gcaaagagac aaaacttgaa agaagagtag tagttagaac
181 gtcagagagc tagctacttc gaaggaaggt ttcattcadc gaaaatggca gctttattat
241 taaataatcg gtcaaactct gcctcccaat ccaaagteta aaacctttcc ttcttcttcc
301 ttacaaatc caacaatctc aatgtctcca aatccataac tttcttcgat cccttcttcc
361 ttctctctgc tgctgttaca ttttttacia aaccctaadc aaaccattt tcttctatca
421 atcttaacc tagaatcaaa taaagactca atctttcttt gctttgctct gttctgctct
481 gtttttgctc tgtttttata ATGGCTTGTT TCTTGAATTG TGTAGATTG GATGTCTCCA
541 AGACGATCAC CGACAAACCC ACAAGTCAAG GATCTGGTGT GACTTGTAT AACAGCTGGG
601 ATGATGTTGA AACTCTCACT TCCAATTTCT CTAGATTGAT TGGTCTGGT GGCTATAGCA
661 GTATCTACAT GGCTCGCTTC TCTGGCTCTG ATAAAGCGGC TCTCAAGGT CATGTTAGTA
721 GTCACCGTCT TTATCAAGTC TTTAGACTTG AGCTTGATAT TTTGCTTCGT CTCAACATC
781 CTAACATTGT CAAGCTTCTT GGCTATTTCTG ATGATTCAGG tactacttct gaaatctcat
841 agattctgca aatatttggg gtctgtgcaa ttgtgttggg gtcttgatta agccaatttt
901 agtgattaag tttgtcttaa tcaaagtttt gatctttatt tgttttatca agttgtttga
961 tatatttgc tatagactta tgttctgctt ctttctattt cagAGGAAAA TGGTCTCTT
1021 CTTCTTGAGT ATCTTCTCA AGGAAATCTA CAAGAGAAGC TCCAAAGCAA TAGCAAGCAA
1081 GTCTTGCAAT GGAGGAACCG TGTAGCGATT GCGTTACAGT TAGTCAAGC TATTGAACAT
1141 ATTCATGAGA AATGTAGCCC GCAGATAGTG CACGGGGACA TCAAATCTTC CAACGTTCTT
1201 CTAGACAAAA ACTTTGATTG CAAGCTTTCG GATTCGGGT CAGCTAAAGT CCGGTTCTCT
1261 TCGATGGTTC AGCCTCTAC GATGTCGCT AGATCTAGAC AAGTGAAGAT GGTGGGATCT
1321 CCAGGTTACA CAGACCCTCA TTATTTAAGA ACCGGGATG CTTCGAAGAA GATGGATATG
1381 TATGGGTTG GAGTTGTGGT TCTTGAGTTG GTTTCAGGAA AAGAAGCGTT TTCTGCTGAG
1441 AGAGGTGAGA TGCTGGTGCA TATAGCTGCT CCACTTATGA ATGAGATTTT GGATVTCGAGT
1501 GTAGACATTT CAGAGGACAA GGTGAGACAG TTCTTGGACC CGAGGTTGTT AAGGGATAGT
1561 CTTGATATCG ATGAGGTCAA GACAATGTTG AGTGTGCTG CCGTCTGTAT CAGTAGCAAG
1621 CTATCTCTAA GACCTTCGGC TGCTCAAGTA GCGGATACTC TTATAAAGGA AATACCATCA
1681 TTGAGTTTCC TCGGTTGCGG TAAAGGAGTC TGAGttatcg gtgtcgatgg tttttgttgt
1741 agtgtggtaa ggctgctgta acgacactgt aaagtgggtg tgcatttagg agtttcttgg
1801 aaaaccagca agaagaataa ccatgtaaat actcttgttt tgttttgtga atagaagcag
1861 gaaataacat tttgtctaat tatcattcat caacatttcc taggaaatgt aattttgatt
1921 gttgttttgt cttgaaatct tagagagaaa gagaagttct gttcatgtca atgtaatgta
1981 aagtaaagct taaagcagaa gcatgtcatt gtgaatatga agcaaagttt atgtgacttg
2041 tagtgcaatt tcaaaggctc tgattctcaa ttccttcaag atacagtaac acagcaatca
2101 aaggcctttc taggagaaat aactgtaata agctaaaaaa aactgaagtt tgaactaaa
2161 gtcaggaaga gaaagcccaa aacaccattg tgaagtttcc ttgaaagtga gct

```

→ Orientierung der Primer und der inserierten T-DNA

▼ T-DNA Insertionsstelle in *drk3-1*

xxx – Intron oder untranslatierter Bereich

XXX – Exon

Genspezifische Primer:

XXX NeuAt4g10390-5'

XXX At4g10390-2-3'

XXX At4g10390-3'

XXX At4g10390-F-N

XXX At4g10390-R-N

Verwendete Kombinationen:

Vor Insertion: NeuAt4g10390-5' und At4g10390-2-3'

Um Insertion: NeuAt4g10390-5' und At4g10390-3'

Nach Insertion: At4g10390-F-N und At4g10390-R-N

7.4 Hygromycin-Sonde für Southern-blot-Analysen

```
1  CGCAAGGAAT CGGTCAATAC ACTACATGGC GTGATTTTCAT ATGCGCGATT GCTGATCCCC
61 ATGTGTATCA CTGGCAAAC TGTATGGACG ACACCGTCAG TCGTCCGTC GCGCAGGCTC
121 TCGATGAGCT GATGCTTTGG GCCGAGGACT GCCCCGAAGT CCGGCACCTC GTGCACGCGG
181 ATTTTCGGCTC CAACAATGTC CTGACGGACA ATGGCCGCAT AACAGCGGTC ATTGACTGGA
241 GCGAGGCGAT GTTCGGGGAT TCCCAATACG AGGTCGCCAA CATCTTCTTC TGGAGGCCGT
301 GGTTCGGCTTG TATGGAGCAG CAGACGCGCT ACTTCGAGCG GAGGCATCCG GAGCTTGCAG
361 GATCGCCGCG GCTCCGGGCG TATATGCTCC GCATTGGTCT TGACCAACTC TATCAGAGCT
421 TGGTTGACGG CAATTTTCGAT GATGCAGCTT GGGCGCAGGG TCGATGCGAC GCAATCGTCC
481 GATCCGGAGC CGGGACTGTC GGGCGTACAC AAATCGCCCC CAGAAGCGCG GCCGTCTGGA
541 CCGATGGCTG TGTAGAAGT
```

Zur Klonierung der Sonde verwendete Primer

XXX Hyg_cds_f

XXX Hyg_cds_r

7.5 Sequenz des *DRK3*-Gens mit zur Klonierung von RNAi- und *sense*-Sequenzabschnitten benutzten Primern

```

1  ATGGCTTGTT TCTTGAATTG TGTTAGATTT GATGTCTCCA AGACGATCAC CGACAAACCC
61  ACAAGTCAAG GATCTGGTGT GACTTGTTAT AACAGCTGGG ATGATGTTGA AACTCTCACT
121  TCCAATTTCT CTAGATTGAT TGGTTCTGGT GGCTATAGCA GTATCTACAT GGCTCGCTTC
181  TCTGGCTCTG ATAAAGCGGC TCTCAAGGTT CATGTTAGTA GTCACCGTCT TTATCAAGTC
241  TTTAGACTTG AGCTTGATAT TTTGCTTCGT CTTCAACATC CTAACATTGT CAAGCTTCTT
301  GGCTATTTCTG ATGATTCAGA GGAAAATGGT GCTCTTCTTC TTGAGTATCT TCCTCAAGGA
361  AATCTACAAG AGAAGCTCCA AAGCAATAGC AAGCAAGTCT TGCAATGGAG GAACCGTGTA
421  GCGATTGCGT TACAGTTAGT TCAAGCTATT GAACATATTC ATGAGAAATG TAGCCCGCAG
481  ATAGTGCACG GGGACATCAA ATCTTCCAAC GTTCTTCTAG ACAAAAACTT TGATTGCAAG
541  CTTTGCGATT TCGGGTCAGC TAAAGTCGGG TTCTCTTCGA TGGTTCAGCC TCCTACGATG
601  TCGCCTAGAT CTAGACAAGT GAAGATGGTG GGATCTCCAG GTTACACAGA CCCTCATTAT
661  TTAAGAACCG GGATTGCTTC GAAGAAGATG GATATGTATG GGTTTGGAGT TGTGGTTCTT
721  GAGTTGGTTT CAGGAAAAGA AGCGTTTTCT GCTGAGAGAG GTGAGATGCT GGTGCATATA
781  GCTGCTCCAC TTATGAATGA GATTTTGGAT TCGAGTGTAG ACATTTTCAGA GGACAAGGTC
841  AGACAGTTCT TGGACCCGAG GTTGTTAAGG GATAGTCTTG ATATCGATGA GGTCAAGACA
901  ATGTTGAGTG TTGCTGCGGT CTGTATCAGT AGCAAGCTAT CTCTAAGACC TTCGGCTGCT
961  CAAGTAGCGG ATACTCTTAT AAAGGAAATA CCATCATTGA GTTTCCTCGG TTGCGGTAAA
1021  GGAGTGTGAg ttatcgggtgt cgatggtttt tgttgtagtg tggtaaggct gcggtgaacga
1081  cactgtaaag ttggtgtgca ttaggagtt tcttgaaaa ccagcaagaa gaataaccat
1141  gtaaatactc ttgttttggt ttgtgaatag aagcaggaaa taacattttg tctaattatc
1201  attcatcaac atttcctagg aatgtaatt ttgattggtg ttttgcttg aatccttaga
1261  gagaaagaga agttctgttc atgtcaatgt aatgtaaagt aaagcttaa gcagaagcat
1321  gtcattgtga atatgaagca aagtttatgt gacttgtagt gcaatttcaa aggttc tgat
1381  tctcaattcc ttcaagatac agtaacacag caatcaaagg ctttcttagg agaaat aact
1441  gtaataagct aaaaaaact gaagtttgaa actaaagtca ggaagagaaa gcccaa aaca
1501  ccattgtgaa gtttccttga aagttagct

```

Zur Klonierung eines *sense*-Sequenzabschnittes verwendete Primer

XXX *DRK3*-genspezifischer Abschnitt des Primers attB1At4g10390-5K

XXX *DRK3*-genspezifischer Abschnitt des Primers attB2At4g10390-3O oder MS

Zur Klonierung eines RNAi-Sequenzabschnittes verwendete Primer

XXX *DRK3*-genspezifischer Abschnitt der attB1At4g10390-i-5 bzw. attB2At4g10390-as-5

xxx *DRK3*-genspezifischer Abschnitt der attB1At4g10390-i-3 bzw. attB1At4g10390-as-3

7.6 Zu Komplementationstudien kloniertes genomisches Fragment des DRK3-Gens

```

1  atgtgggctc tgcggaata ctagttatat atatgatttg gtattttaga tataatttta
61  tgatatat  tatgtttcgt ttataattat agatatgtaa ttttatgta tcatatcact
121 ttttaagaaa attattatat cacataatga tttataaata tttatgaaag tttctcatta
181 taattaatta ttaatattga aaaccattat acaaaatgca aataaatgga tttgaggatg
241 cactattaga acaagtgact ctcaaactct tattttgaag atgtgtcact tttaaagtta
301 gggttcctgt cgaagatacc ctaatatact ttctcatttc aaaataaata cattcttact
361 ttaaaatgag cgagttttag tttcggaaaa aataataaaa acaaaattgt catatatgaa
421 ggacgtgaca ttaataatcg cttttcatat ttaactat  tctactgctt ttccctgatt
481 gaaaagcaaa aacaaatgtg ttaaatgttt tgcttagccc caaaaagcaa agagacaaaa
541 cttgaaagaa gagtagtagt tagaacgtca gagagctagc tacttcgaag gaaggtttca
601 ttcacgaaa atggcagctt tattattaaa taatcgggtca aactctgcct cccaatccaa
661 agtctaaaac ctttccttct tctttcttta caaatccaac aatctcaatg tctccaaatc
721 cataactttc ttcgatcccc ttgttcttcc tctgtctgct gttacatttt ttacaaaacc
781 ctaatcaaac ccattttctt ctatcaatct taaccctaga atcaataaa gactcaatct
841 ttctttgctt tgctctgttc tgctctgttt ttgctctggt tttataATGG CTGTGTTTCTT
901 GAATTGTGTT AGATTTGATG TCTCCAAGAC GATCACCGAC AAACCCACAA GTCAAGGATC
961 TGGTGTGACT TGTTATAACA GCTGGGATGA TGTTGAAACT CTCACTTCCA ATTTCTCTAG
1021 ATTGATTGGT TCTGGTGGCT ATAGCAGTAT CTACATGGCT CGCTTCTCTG GCTCTGATAA
1081 AGCGGCTCTC AAGGTTTCATG TTAGTAGTCA CCGTCTTTAT CAAGTCTTTA GACTTGAGCT
1141 TGATATTTTG CTTCGTCTTC AACATCCTAA CATTGTCAAG CTTCTTGGCT ATTTTCGATGA
1201 TTCAGgtact acttctgaaa tctcatagat tctgcaaata tttgggtgtct ggtcaattgt
1261 gttgttgtct tgattaagcc aattttagtg attaagtttg tcttaatcaa agttttgatc
1321 tttatttggt ttatcaagtt gtttgatata tttgcatata gacttatggt ctgcttcttt
1381 gtatttcagA GGAAAATGGT GCTCTTCTTC TTGAGTATCT TCCTCAAGGA AATCTACAAG
1441 AGAAGCTCCA AAGCAATAGC AAGCAAGTCT TGCAATGGAG GAACCGTGTA GCGATTGCGT
1501 TACAGTTAGT TCAAGCTATT GAACATATTC ATGAGAAATG TAGCCCGCAG ATAGTGCACG
1561 GGGACATCAA ATCTTCCAAC GTTCTTCTAG ACAA AAACTT TGATTGCAAG CTTTGCAGATT
1621 TCGGGTCAGC TAAAGTCGGG TTCTTTCGA TGGTTCAGCC TCCTACGATG TCGCCTAGAT
1681 CTAGACAAGT GAAGATGGTG GGATCTCCAG GTTACACAGA CCCTCATTAT TTAAGAACCG
1741 GGATTGCTTC GAAGAAGATG GATATGTATG GGTTCGAGT TGTGGTTCTT GAGTTGGTTT
1801 CAGGAAAAGA AGCGTTTTCT GCTGAGAGAG GTGAGATGCT GGTGCATATA GCTGCTCCAC
1861 TTATGAATGA GATTTTGGAT TCGAGTGTAG ACATTTTCTG GGACAAGGTC AGACAGTTCT
1921 TGGACCCGAG GTTGTTAAGG GATAGTCTTG ATATCGATGA GGTCAAGACA ATGTTGAGTG
1981 TTGCTGCGGT CTGTATCAGT AGCAAGCTAT CTCTAAGACC TTCGGCTGCT CAAGTAGCGG
2041 ATACTCTTAT AAAGGAAATA CCATCATTGA GTTTCCTCGG TTGCGGTAAA GGAGTGTGA

```

Zur Klonierung des genomischen Klons verwendete Primer



promTeilCI4g10390

DRK3-genspezifischer Abschnitt des Primers attB2At4g10390-3OS oder MS

7.7 Sequenz des *HOM1*-Gens mit Lokalisation der T-DNA-Insertionen und Primern

```

1 aataaatctc acaaatctc ttaaaaattc gatacttttc aatcaccttt ctacaaaaac
61 aatacaaaaac aaaatctaaa tacgtgagca aataatacc ataataatat gtgtattatt
121 agcaatttga taatataaaa aacaaaacgg caaaaaaaaa agtgttttaa gacactgaat
181 cgtagtggtt ataacgtcag tgcagcttct aaggaagggt tcttcttctt cttcatcttc
241 ctcttaatca caaactggtc aaactctgcc tctctcttct ctaaacccaa acaaaagaaa
301 aaaaccattt ttctcatctt cttcttcttt attcacaacac ctcaccaaac acacattcct
361 taaaccagat cttcattctc cgattctctt gtcccttatt tgtctgctgt tacaaaaacc
421 ctcttcattt tcccagaaac ccacttatct tcttcttaaa ttactatcat cctcactcaa
481 aagtctcaca ctttctcaaa ATGTCTTGTT TCTTAAGCTG TGTCCGTTTC GAAACAACCA
541 CCGACAACAA CAAACCCACG AGTACAGAAT CTGGTCTGT CTCCGGTGT ACCTGTTATA
601 CCTGGGATGA TGTTGAGTCT CTCACCTCCA ATTTCTCTAG ACTTATTGGT ACTGGTGGCT
661 ATAGTAGTAT CACTTAGCT CGTGTGTCTG GTTCTATCAA CGCAGCTCTC AAGGTCATG
721 TCAGTAGTCA TCGTCTTTAT CAAGTGTFTA GGTCTGAGCT TGAGATTTG CTCGCTTC
781 AACATCCTCA CATTGTTAAG CTTCTTGGTT ACTTTGACGA TTCAGgttcc tatecttcc
841 ctcttaatcc gtttttaaat tcttgaaatt ccctaataca gaactgggtcc taggaattat
901 taacatccat gaaaagtcaa atactttaaa gaacagagct ttattcttgt cttgtcctaa
961 ttacaattct tttgtagatt cgtttcaact ttacactagt tggtagctt ttccttgttg
1021 caaattgttt atcttttgag tggattotta gtgtgaatct aatggtgttg ttgtttttgt
1081 tgtgtatttt tcagAAGAAA GTGGAGCACT ATTACTAGAG TACCTTCTC AAGGTAACCT
1141 TCAAGAGAAG CTTAACCGGA ACAGCAAACA AGTGTACCA TGGAGAAACA GAACCGCTAT
1201 TCGTTTTAG GTTGCGCAAG CAATTGAACA TATTCATGAG AAATGTATC CTCAGATTGT
1261 GCACGGTGAC ATCAAATCTT CCAACATACT TCTTGACAAA CATTTCACCT CCAAGCTTTG
1321 TGATTTCGGA TCAGCTAAAG TTTGGTTTCTC GTCTATGGTT CAGCCTTCTA AGACGACGTC
1381 AACVTATGTCA CCACGATCCA AGCAAGTGAT GATGATTGGT TCTCCAGGGT ACACAGATCC
1441 TCATTACTTG AGAACTGGTA TTGCTTCGAA GAAGATGGAT ATGTATGGGT TTGAGTGGT
1501 GGTTCTTGAG TTGGTTTCGG GTAAAGAAGC GGTTAGTTCT GAGAGAGGTG AGATGTTGGT
1561 GCATTCAACA GCTTCGTTGA TACATGAGAT TCTTGATTCTG AATGGAGATA TTGGAGAAGA
1621 GAAAGTGAGA CAGTTCTTGG ATCCAAGGTT GTCCAGGGAT GGTAGTATTG ATTTGGAAGA
1681 GGTTAAGACA ATGCTACGTG TGGCTGCTTT CTGTCTTCGT AGCCCTCCAT CGCTGAGACC
1741 CTCTGCTTCT CAAGTAGTTC AAACCTTTAA CAAGAAGATA CCGTCTCTAT CTTTCTCTCG
1801 TTGTGGTAAA AAAGAGTGAT acataaaaact aacctgtgtg ttttaggtga tgaggttag
1861 gtagtgattg tgttgcaggt cttagtagaa agatctgaaa cgtttctga gaagattgag
1921 tttcgttgta taggagattc tgcaaaaacc aaaaagaaag aaggaagatt caaattcctc
1981 ttctgctttg tgatgtgat agtaatcaag caaaacaaca tcatgtgat ttgcattttg
2041 taagagttac tgtgtggatg tataatacaa atgattggat gaaattcggg aaccggtttg
2101 gttaggaacc acaaaaccga aattactata aatttatcca aaattaaatc gagataacca
2161 aacaattgta ctgaaatgaa ccgaagaata gatgcgtagt tattgaaaaa gttgataaaa
2221 ccaaaccaaa tcaaaccgaa tttgggaata gaaccgaaact ttgtactcta taaccacaatc
2281 caaaccgaat cggaccgatg aactaaattt tgttttgtc

```

→ Orientierung der Primer und der inserierten T-DNA

▼ T-DNA Insertionsstelle in *hom1-1*

▼ T-DNA Insertionsstelle in *hom1-2*

xxx – Intron oder untranslatierter Bereich

XXX – Exon

Genspezifische Primer:

XXX At1g33260-5′

XXX At1g33260-3′

7.8 Sequenz der putativen Myristoylierungsstelle im DRK3-Protein

```

1  ATG GCT TGT TTC TTG AAT TGT GTT AGA TTT GAT GTC TCC AAG ACG ATC ACC GAC AAA
   M  A  C  F  L  N  C  V  R  F  D  V  S  K  T  I  T  D  K

58 CCC ACA AGT CAA GGA TCT GGT GTG ACT TGT TAT AAC AGC TGG GAT GAT GTT GAA ACT
   P  T  S  Q  G  S  G  V  T  C  Y  N  S  W  D  D  V  E  T

115 CTC ACT TCC AAT TTC TCT AGA TTG ATT GGT TCT GGT GGC TAT AGC AGT .....
    L  T  S  N  F  S  R  L  I  G  S  G  G  Y  S  S  .....

```

XXX Konsensussequenz einer putativen Myristoylierungsstelle

X Mutation von G zu A

XXX Sequenzabschnitt der zur Mutagenese verwendeten Primer:
At4g10390G-Amut-for und At4g10390G-Amut-rev

7.9 Microarray-Daten der Expression des *DRK3*-Gens

Es sind jeweils die Mittelwerte der von *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) erhaltenen Daten der Expression des *DRK3*-Gens dargestellt.

Tabelle 7-2 Microarray-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Inokulation mit *Pseudomonaden*

Zeit nach Infektion		6 h	24 h
Fluoreszenz-einheiten	MgCl ₂	73,36	14,1
	<i>Pto</i> DC3000	246,31	59,16
	<i>Pto</i> avrRpm1	167,63	44,53
	<i>Pto</i> hrcC-	53,03	32,1
	<i>Pph</i>	57,3	30,53

Tabelle 7-3 Microarray-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Elizitorapplikation

Zeit nach Inokulation		1 h	4 h
Fluoreszenz-einheiten	H ₂ O	332,53	22,13
	HrpZ	404,02	21,96
	Flg22	371,53	20,33
	GST	268,15	24,03
	GST-NLP _{pp}	414,88	22,43
	Ca-Mg	216,06	23,26
	LPS	275,13	23,86

Tabelle 7-4 Microarray-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Infektion mit pathogenen Pilzen

Zeit nach Infektion		6 h	12 h	18 h	24 h	48 h
Fluoreszenz-einheiten	Kontrolle <i>B.c.</i>	-	-	7,28	-	9,52
	<i>B. cinerea</i>	-	-	15,99	-	39,61
	Kontrolle <i>E.o.</i>	15,84	14,33	14,63	17,59	17,46
	<i>E. orontii</i>	11,63	11,61	10,46	16,79	10,42
	Kontrolle <i>P.i.</i>	15,93	15,56	-	15,69	-
	<i>P. infestans</i>	22,33	17,46	-	14,33	-

Tabelle 7-5 Microarray-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach Hormonbehandlung

Zeit nach Applikation		30 Min.	1 h	3 h
Fluoreszenz-einheiten	Kontrolle	26,68	30,27	29,62
	Abszisionsäure	21,37	18,98	10,22
	Gibberelin	25,42	27,33	30,99
	Indoleessigsäure	47,23	35,33	31,94
	Brassinolid	19,69	38,3	25,03
	ACC	22,35	32,44	26,06
	Methyljasmonat	128,54	177,52	119,5

Tabelle 7-6 *Microarray*-Daten der Expression des *DRK3*-Gens nach abiotischem Stress

Zeit nach Behandlung		30 Min.	1 h	24 h
Fluoreszenz- einheiten	Kontrolle	8,33	13,44	9,47
	Verwundung	44,89	115,7	9,3
	Trockenstress	77,81	85,93	18,61
	Osmotischer Stress	8,23	20,07	13,39
	Salzstress	11,56	15,66	21,76
	Oxidativer Stress	9,28	15,92	14,43
	Hitzestress	3,1	7,94	11,42
	Kältestress	10,65	13,73	10,68

7.10 Microarray-Daten der Expression des *HOM1*-Gens

Es sind jeweils die Mittelwerte der von *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) erhaltenen Daten der Expression des *HOM1*-Gens dargestellt.

Tabelle 7-7 Microarray-Daten der Expression des *HOM1*-Gens nach Inokulation mit *Pseudomonaden*

Zeit nach Infektion		6 h	24 h
Fluoreszenz- einheiten	<i>Pto</i> DC3000	71,86	80,56
	<i>Pto</i> avrRpm1	77	81,8
	<i>Pto</i> hrcC-	46,86	90,33
	<i>Pph</i>	36,66	60,03
	MgCl ₂	65,26	41,8

Danke!

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die letzten Jahre zu einer sehr schönen Zeit gemacht haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Bereitstellung des interessanten Themas und für jederzeit mögliche Diskussionen. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Georg Felix für seine Bereitschaft das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Birgit Kemmerling, die als meine direkte Betreuerin stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatte.

Ansonsten natürlich vielen vielen Dank an alle N's und F's, insbesondere an N2, mit denen das Arbeiten immer Spaß gemacht hat.

Und nicht zuletzt vielen Dank an meine Familie und meine Freunde, die mich immer unterstützt haben.

Meine akademischen Lehrer waren:

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