



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Molecular characterisation of BAK1-dependend cell death in
Arabidopsis thaliana“

Verfasser

Martin Künzl

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag.rer.nat.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A490

Studienrichtung lt. Studienblatt: Molekulare Biologie

Betreuerin / Betreuer: Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Heribert Hirt

*To be or not to be, that is the question:
Whether 'tis nobler in the mind to suffer
The slings and arrows of outrageous fortune,
Or to take arms against a sea of troubles,
And by opposing, end them? To die: to sleep;*

*No more; and by a sleep to say we end
The heart-ache and the thousand natural shocks
That flesh is heir to, 'tis a consummation
Devoutly to be wish'd. To die, to sleep;
To sleep: perchance to dream: ay, there's the rub;*

*For in that sleep of death what dreams may come
When we have shuffled off this mortal coil,
Must give us pause: there's the respect
That makes calamity of so long life;
For who would bear the whips and scorns of time,*

*The oppressor's wrong, the proud man's contumely,
The pangs of despised love, the law's delay,
The insolence of office and the spurns
That patient merit of the unworthy takes,
When he himself might his quietus make*

*With a bare bodkin? who would fardels bear,
To grunt and sweat under a weary life,
But that the dread of something after death,
The undiscover'd country from whose bourn
No traveller returns, puzzles the will*

*And makes us rather bear those ills we have
Than fly to others that we know not of?
Thus conscience does make cowards of us all;
And thus the native hue of resolution
Is sicklied o'er with the pale cast of thought,*

*And enterprises of great pith and moment
With this regard their currents turn awry,
And lose the name of action.— Soft you now!
The fair Ophelia! Nymph, in thy orisons
Be all my sins remember'd*

Hamlet

EINLEITUNG	7
1.1. Bedeutung konservierter Pathogenstrukturen in der Immunantwort.....	7
1. 1.2. Pflanzliche Immunsysteme, Allgemein	8
1.2.1. PAMP induzierte Immunität-PTI	9
1.2.2. Effektorinduzierte Suszeptibilität (ETS)	15
1.2.3. Effektorinduzierte Immunität (ETI)	16
1.2.3. Erworbene Resistenz.....	20
1.2.4. Phytohormone.....	21
1.2.5. Endozytose, Exozytose und Sekretion im Rahmen der Immunantwort	26
2. 1.3. Spezielle Einführung.....	27
1.3.1. Regulation und Rolle von SNC1 Suppressor of npr1-1, Constitutive1	27
1.3.2. Funktion und Rolle von Copinen	30
1.3.3. Funktion und Rolle von BON1 assoziierte Proteine (BAP)	33
1.4. Ziel dieser Arbeit.....	35
MATERIAL UND METHODEN	38
2.1. MATERIALIEN	38
2.1.1. Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	38
2.1.2. Nährmedien.....	38
2.1.3. Verwendete Plasmide	39
3. 2.2. Anzuchtbedingungen.....	42
2.2.1. Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	42
2.2.2. Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	42
2.2.3. Anzucht von <i>Alternaria brassicicola</i>	42
2.2.4. Anzucht der Versuchspflanzen.....	42
4. 2.3. Methoden	43
2.3.1. Polymerasekettenreaktion - PCR	43
2.3.2. DNA-Analytik.....	44
2.3.3. Klonierungen.....	45
2.3.4. Transformationen	46
2.3.4. Gelelektrophoretische und assoziierte Methoden.....	47
2.3.5. Sequenzierung von DNA.....	47
2.3.6. Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung.....	47
2.3.7. RNA-Methoden	48
2.3.8. Lasergestützte Konfokalmikroskopie	49
2.3.9. Infektion von Testkandidaten mit <i>Alternaria brassicicola</i>	49
2.3.10. Datenbankanalysen.....	49
2.3.11. <i>Microarray</i> -Literaturdatenanalyse	49
RESULTATE	51

5. 3.1. Indizien der Interaktionshypothese zwischen BAK1 BON1/3 bzw. deren assoziierten Proteinen.....	51
3.1.1. Makroskopische Phänotypen der <i>bon1-1</i> , <i>snc1-11/bon1-1</i> und <i>snc1-11</i> Mutanten im Vergleich zu <i>bak1</i> und <i>bak1</i> assoziierten Mutanten	51
3.1.2. <i>In silico</i> Ansatz möglicher Interaktionen.....	52
3.1.3. <i>Microarray</i> -Literaturdatenanalyse	55
3.2. Interaktionsstudien zur empirischen Ermittlung des Verdachts der Wechselwirkung zwischen RLK und Copin und Copinähnlichen Proteinen	67
3.2.1. Herstellen der Donorplasmide mittels TOPO-TA-Gateway® Klonierung	67
3.2.2. Herstellung der Expressionsplasmide mittels LR-Reaktion.....	68
3.3. Verifikation der Interaktion der Kandidaten mit BAK1 bzw. BAK1-assozierten Proteinen in vivo mittels BIFC.....	71
3.3.1. Multisitegatewayssysteme als flexible Strategie zur Überprüfung der in vivo Interaktion von Proteinen	71
3.3.2. BIFC	71
3.4. Vergleichsstudien zwischen Kandidatenmutanten zur Analyse der Beeinflussung der Expression des TIR-NB-LRR- SNC1 und der PR1 Expression.....	72
3.4.1. <i>SNC1</i> und <i>PR1</i> Expression in verschiedenen potentiellen BAK1-Signalweg-relevanten Mutanten.....	72
3.4.2. <i>PR1</i> Expression.....	74
3.4.3. Durch Rückgriff auf einen weiteren Primer werden die <i>SNC1</i> q-PCR Ergebnisse validiert	75
3.4.4 Vergleichende Untersuchung des Wachstums von <i>Alternaria Brassicicola</i> auf Kandidatenmutanten	76
4. DISKUSSION	78
4.1. Expressionsmuster implizieren eine gemeinsame Funktion	79
4.2. Interaktionsstudien deuten einen Zusammenhang zwischen RLK und Copinen an	82
4.3. Ähnlichkeiten der Expression implizieren einen gemeinsamen Pathway	83
4.4. Infektionsversuche deuten auf einen gleichen, oder ähnlichen Mechanismus hin	85
4.5. Schlussfolgerungen	87
4.6. Perspektiven.....	89
Literaturverzeichnis.....	90
Abbildungsverzeichnis.....	116

Abkürzungen	Bezeichnung	Abkürzungen	Bezeichnung
Aa	Aminosäuren	bzw	Beziehungsweise
Abb.	Abbildung	CAM	<i>Calmodulin</i>
ACD11	<i>accelerated cell death1</i>	CC	<i>coiled coil</i>
AD	Aktivierungsdomäne	cDNA	komplementäre DANN
	<i>apoptotic regulator human apoptotic protease-activating factor 1 -Caenorhabditis elegans -R-Protein</i>	CDPK	<i>Calcium depend protein kinase</i>
ARC		CERK	<i>chitin elecitor receptor kinase</i>
ARF	<i>Auxin response factors</i>	COI1	<i>Coronatin insensitive1</i>
Aux	Auxin	Col-0	Columbia 0
Avr	Avirulenz	DAMP	<i>damage-associated molecular-pattern</i>
avrRPT2	<i>avr-resistance to pseudomonas syringae pv tomato2</i>	DDM1	<i>defect in DNA methylation 1</i>
BAK1	BRI1 associated receptor kinase	DEPC	Diethylpyrocarbonat
BAP	<i>BONZAI ascociated protein</i>	dh.	das heißt
BD	Bindedomäne	DiG	Dijon G
BIK1	<i>BOTRYTIS-INDUCED KINASE1</i>	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BKI1	<i>BRI1 Kinase Inhibitor 1</i>	DNase	Desoxyribonuklease
BKK1	<i>BAK1 like1</i>	DND1	<i>defense no death1</i>
BON	<i>bonzai1</i>	dNTP	2´-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
BR	<i>Brassinosteroide</i>	ds	Doppelstrang
BRI1	<i>Brassinosteroid insensitive1</i>	E.coli	Escherichia coli
bZIP	Leucin-Zipper	EDS	<i>enhanced disease susceptibility1</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N´,N´-tetraazetat	ICS1	<i>Isochorismate Synthase</i>
EFR	EF-TU receptor	IRAK	<i>Interleukin-1 rezeptorassoziierte Kinase</i>
EF-TU	elongation factor-thermo unstable	ISR	<i>induced systemic resistance</i>
elf18	elongation factor 18	JA	<i>Jasmonat</i>
Et	Ethylen	kb	<i>Kilo-Basen</i>
etc	ecetera	LAR	<i>local acqired resistance</i>
ETI	effector triggered immunity	LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
ETS	effector triggered susceptibility	LRR	<i>leucin rich repeat</i>
flg22	flaggelin 22	LRX	<i>LRR-extensine</i>
FLS2	flaggelin sensitive 2	LysM	<i>Lysin Motif</i>
FRK1	FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE	MAMP	<i>Microbe-associated molecular pattern</i>
G	Erdbeschleunigung	MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
GFP	grünfluoreszierendes Protein	MAPKK	<i>MAP Kinase Kinase</i>
GW	Gateway	max.	<i>Maximal</i>
H	Stunden	MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
H2Oodd	Milli-Q-Reinstwasser	min	<i>Minuten</i>
HR	hypersensitive Reaktion	MKK	<i>MAPK Kinase</i>
HrpZ	hairpin	MKS1	<i>MAPK substrate 1</i>
HSP	heat shock protein	MLA	<i>mildew A</i>
IAA	indole-3-acetic acid	MLO	<i>mildew resistance locus O</i>

MOS	<i>modifier of SNC1</i>	PEG	Polyethylenglycol
MPK	MAP Kinase	PEN	<i>Penetration</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>	PERK	<i>proline extensine-like receptor kinases</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>	PIP	<i>Phospho-Inositol-phosphate</i>
NBS	<i>nucleotid binding structure</i>	PLD	Phospholipase D
NDR1	<i>non-race specific disease resistance1</i>	PR	<i>pathogenesis-related</i>
NLR	<i>NOD-like receptors</i>	PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>	PSK	Phytosulfokin
NPP1	<i>necrosis-inducing Phytophthora protein 1</i>	PSKR	Phytosulfokinrezeptor
NPR1	<i>Nonexpressor of PR1</i>	PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
NTPase	<i>Nucleotid triphosphatase</i>	q-PCR	quantitative PCR
NUP	<i>nucleoporin</i>	RAR1	<i>required for MLA12 resistance1</i>
OD	optische Dichte	R-	
PAD	<i>phytoalexin deficient</i>	Gene/Protein	Resistenz-...
PAIR	<i>predicted Arabidopsis interactome resource</i>	RIN	<i>RPM1 interacting protein</i>
PAMP	pathogen-associated molecular pattern	RLCK	<i>receptor like cytoplasmic kinase</i>
PBS1	Serine/Threonin Kinase=avrPphB susceptible 1;	RLK	<i>receptor like kinase</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>	RNA	Ribonukleinsäure
PCI	Phenol Chloroform Isoamylalkohol	ROS	reactive oxygen species
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	RPM	<i>resistance to p. syringae pv maculicola</i>
		RPS	<i>resistant to p. syringae</i>
RRS	<i>resistant to ralstonia solanacearum</i>	TPR1	<i>topless related 1</i>
RT	Raumtemperatur	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SA	Salizylat	upm	Umdrehungen pro Minute
SAG	<i>senescence associated gene 101</i>	UV	Ultraviolett
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>	v/v	Volumen pro Volumen
SARlc	<i>SA-response loci</i>	VIP	VirE2 interacting protein
SCD1	<i>STOMATAL CYTOKINESIS DEFEKTIVE1</i>	VOL	Volums
SDS	Natriumdodecylsulfat	vWA	von Willebrand factor A Domäne
SERK	<i>Somatic embryonic receptor kinase</i>	w/v	Masse pro Volumen
SGT1	UDP-GLUCOSE:SALICYLIC ACID GLUCOSYLTRANSFERASE 1	WAK	<i>wall-associated kinase</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor</i>	Ws-0	<i>Wassilewskija 0</i>
SNC1	<i>Suppressor of npr1-1, Constitutive1</i>	wt	Wildtyp
SNC1	<i>suppressor of NPR1, constitutive1</i>	Y2H	Hefe 2 Hybrid
SRC2	<i>Soybean genes Regulated by Cold2</i>	YPD	Hefe-Vollmedium
SRFR1	Suppressor of rps4RLD	zB.	zum Beispiel
SUMO	SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER		
Tab.	Tabelle		
TAE	TRIS-Acetyl-EDTA		
TIR	Toll-interleucin 1 like receptor		
TLR	<i>Toll like receptor</i>		

Es gilt im Weiteren der Ein-Buchstaben-Code der Aminosäuren, bzw. die Nomenklatur für Nukleotide.

In Kürze

Einführung

bak1, weist einen von BR unabhängigen schwachen Zelltodphenotypen auf. Dieser weist Ähnlichkeiten zu *bon1-1* Mutanten auf, was auf einen Zusammenhang hindeuten könnte. Der *bon1* Phänotyp ist von SNC1 abhängig und führt zu Zelltod.

Resultate

Y2H Versuche, wie in silico Analysen weisen deuten auf direkte Interaktion zwischen BAK1 bzw. RLKs und SNC1-Inhibitoren hin. Desweiteren weisen Infektionsversuche und q-PCRs auf einen gemeinsamen Pathway hin.

Diskussion

Die direkte Interaktion zwischen BAK1 und RLKs mit SNC1 Inhibitoren scheint in vivo impliziert, der Nachweis der in vivo Interaktion bleibt aber ausständig.

Stichwörter: *Arabidopsis thaliana*, ETI, PTI, Copine, BAK1, Zelltod, Copine like

Einleitung

Anbauflächen, die Lebensgrundlage von 99,99% der Menschen sind eine beschränkte Ressource. Es ist nicht die Knappheit im Sinne des Nichtvorhandenseins von Gebieten, sondern die unwirtschaftliche Benutzung der Anbaugelände, die letztlich zu Hunger und Armut führt. Neben der Einführung von Düngung und Pestiziden im letzten Jahrhundert, der Schaffung von neuem, rentablerem Saatgut durch Kreuzung seit Beginn des Ackerbaus durch Menschen und der Bewässerung, seit die ersten Kanäle von Nil, Euphrat und Tigris abgeleitet wurden, ist die Chance der Ertragssteigerung durch gezielte Manipulation des Saatgutes heute gegeben; und wird einen weiteren Meilenstein der Menschheitsgeschichte darstellen, analog zur Erfindung des Pfluges. Das Bemühen um eine Vertiefung des Verständnisses des Pflanzenimmunsystems, sollte den Grundstein legen für die Optimierung der Agrarkultur.

Reaktion auf äußere Umwelteinflüsse ist eines der per Definition notwendigen Kennzeichen für Leben. Das Unvermögen, biotischem und abiotischem Stress durch Bewegung zu entfliehen, stellt Pflanzen im Gegensatz zu Tieren vor eine weitere Hürde. Die pflanzliche Immunantwort unterscheidet sich aufgrund der sessilen Lebensart von jener der Tiere.

1.1. Bedeutung konservierter Pathogenstrukturen in der Immunantwort

Die Ähnlichkeiten des pflanzlichen Immunsystems mit dem angeborenen Immunsystem höherer Tiere sind auffällig (Nürnberger *et al.*, 2004). Sie liegen in der Bildung physikalischer Barrieren, wie der wachshaltigen Kutikula oder ligninverstärkten Zellwänden einerseits und den Hautschichten andererseits, die Pathogenen die Infektion von Zellen erschweren (Dangl & Jones, 2001). Auch sind die Systeme/Mechanismen der Pathogenerkennung selbst ähnlich. Ein

wesentlicher Unterschied liegt aber in der durch die Unbeweglichkeit von pflanzlichen Zellen erwachsenden Notwendigkeit, im Gegensatz zu tierischen Organismen auf spezialisierte Zellen zu verzichten, sodass jede Zelle in der Lage sein muss, gegen etwaige Angreifer vorzugehen. So ist jede Zelle mit der Eigenschaft der Selbst-Fremdunterscheidung ausgestattet (Jones & Dangl, 2006). Diese ist im Gegensatz zu tierischen Zellen aber dazu in der Lage, auf erkannte Gefahren aktiv, mehr oder weniger, in Bezug auf Aktivierung durch Phytohormone, und anderer durch Fremd-Zellen ausgeschüttete Signale, selbstständig zu reagieren (Akira *et al.*, 2006; Medzhitov, 2007). Die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd durch Rezeptoren der tierischen angeborenen Immunantwort und durch die Rezeptoren der pflanzlichen *PAMP triggered immunity* (PTI) erfordert hochkonservierte Strukturen an den Pathogenoberflächen. Bei Pflanzen sind dies namentlich *pathogen associated molecular pattern* (PAMP), *microorganism associated molecular pattern* (MAMP) oder durch den Angreifer verursachte Schäden *damage associated molecular pattern* (DAMP), die an Rezeptoren binden und eine Reaktion hervorrufen (Akira *et al.*, 2006; Medzhitov 2007). Konservierte, durch das tierische Immunsystem erkennbare Strukturen finden sich in Peptidoglykan aus grampositiven Bakterien, Lipopolysacchariden in gramnegativen Bakterien, pilzliche Zellwandbestandteilen, Flagellin, unmethylierter bakterieller DNS-Fragmente und ähnlichen zur Vitalfunktion notwendigen Strukturen (Aderem & Ulevitch 2000; Girardin *et al.*, 2002). Zu den bekannten Effektoren für dieses pflanzliche System zählen Flagellin, Elongationsfaktors-Tu, LPS, Hairpin, Transglutaminase und Chitin (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Dow *et al.*, 2000; Wei *et al.*, 1992; Brunner *et al.*, 2002; Miya *et al.*, 2007).

1. 1.2. Pflanzliche Immunsysteme, Allgemein

Wie jedes aktive Abwehrsystem ist auch das pflanzliche notwendigerweise hochgradig reguliert, die nächsten Kapitel dienen der detaillierten Beschreibung dieser Systeme. Abbildung 1 gibt in Kürze einen Überblick über die möglichen Reaktionen nach Erkennung von Pathogenen. *PAMP triggered immunity* (PTI) wird durch die PRRs (*pathogen recognition receptors*) medierte Erkennung von PAMPs ausgelöst. Koevolution von Immunantwort und Pathogenen führen zur Ausbildung neuer Pathogenstrukturen, den Effektoren der *effector triggered susceptibility*, die eine Infektion erleichtern sollen. Durch diesen koevolutionären Prozess ist die pflanzliche Seite zur Selektion gegen Erkennung solcher Effektoren gezwungen. Diese Selektion führt zum Entstehen von Resistenz-(R) Genen und somit zu R-Proteinen. Sie binden Effektoren direkt oder erkennen sie durch ihre spezifische Funktion, zB. wird die Proteinspaltung durch eine Protease erkannt und löst in Folge die *effector triggered immunity* (ETI) aus. Eine schnelle und massive Immunreaktion ist die Konsequenz dieser Art von Immunität. Die Amplitude der Verteidigung zeigt diese Systeme in ihrer Wirkung. PTI wird aktiviert und eine Verteidigung findet statt. Effektoren der ETS senken nun diesen Wert, ihr Ziel ist es, die Verteidigung abzuschalten und eine Infektion zu erleichtern, einerseits durch Fehlen/bzw. Umprogrammieren der Immunantwort aber auch durch andere Mechanismen, zB. dem Öffnen der

Stomata, welches ein Eindringen der Pathogene in den Apoplasten erleichtern (Dangl & Jones, 2006).

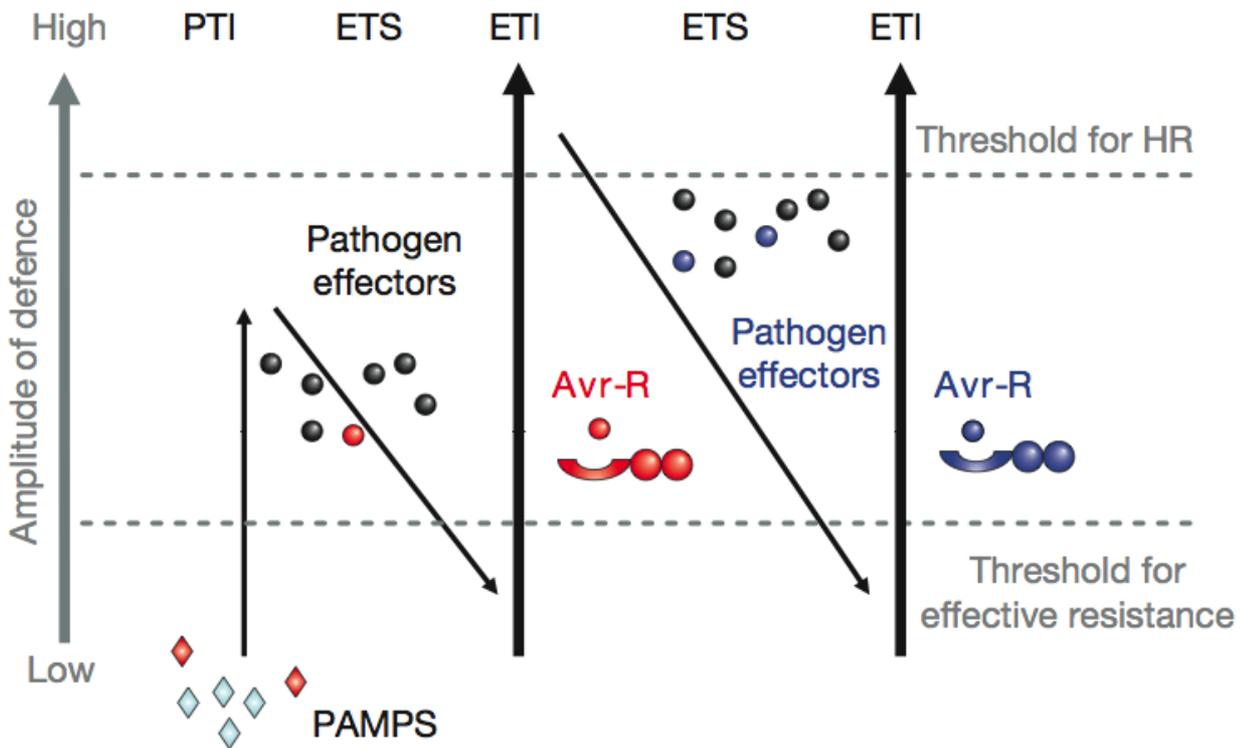


Abbildung 1 Das Zick Zack Modell nach Dangl und Jones (2006) zeigt die pflanzliche Immunreaktion

Die hier dargestellten Mechanismen und ihre Konsequenzen werden nun im Detail erläutert.

1.2.1. PAMP induzierte Immunität-PTI

In Säugetieren wird Flagellin hochspezifisch durch die extrazelluläre LRR Domäne von *toll like receptor 5* (TLR5) erkannt. Die Signalweitergabe nach der Bindung von des Flagellinepitops erfolgt hierbei über eine *Toll Interleucin1 receptor* (TIR) ähnliche zytoplasmatische Domäne (Mizel *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). Ähnlich dem Immunsystem der Pflanzen, deren Rezeptoren ebenfalls auf Kinasen zurückgreifen, wird durch die Ligandbindung die Proteinkinase Pelle aktiviert (Gomez-Gomez & Boller; 2002; Nürnberger *et al.*, 2004). Neben dem Mechanismus ist auch die Struktur der Rezeptoren durch die Ähnlichkeiten ihrer funktionellen Domänen vergleichbar. Das pflanzliche und das tierische System dürften sich aber durch konvergente Evolution unabhängig voneinander entwickelt haben (Chinchilla *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2003).

Die Erkennung von Pathogenen in Pflanzen erfolgt in den meisten Fällen mittels *leucin rich repeat* (LRR) Proteindomänen, nur in wenigen Fällen wird die Erkennung über die LysM Protein Domäne hergestellt. Diese in Glycan-bindenden-Proteinen vorkommende Domäne vermittelt die Bindung von Chitin, sowohl in Reis als auch in *Arabidopsis thaliana* (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2008; Ijazasa *et al.*, 2010; Buist *et al.*, 2008). Die um die 40 Aminosäuren lange LysM Domäne wird hauptsächlich in bakterieller Zellwand degradierenden Enzymen gefunden.

Als Beispiel für einen PTI-Mechanismus soll hier jener des in den meisten Pflanzen durch Orthologe repräsentierten Rezeptors, der LRR *receptor like kinase (RLK)*, der LRR-RLK Subfamilie 12 entstammenden, *Flagellin sensing 2 (FLS2)* dienen. FLS2 erkennt in *Arabidopsis thaliana* den synthetischen Flagellinabschnittes *Flagellin 22 (flg22)* (Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez & Boller; 2002). Die Bindung des Epitops wird hierbei durch wenige Aminosäuren in den exponierten β -strand/ β -turn Bereichen der LRR-Domänen 9-15 hergestellt (Dunning *et al.*, 2007). Nach Perzeption an den FLS2 Rezeptor, der sowohl in dikotylen als auch in monokotylen Pflanzen eine Rolle spielt, wird nun analog zum tierischen System eine Interaktion mit einer Kinase eingegangen und der FLS2 „*BRI1 Associated receptor Kinase 1*“ (BAK1) Komplex wird gebildet (Chinchilla *et al.*, 2007).

1.2.1.1 RLKs (*receptor like kinases*)

Die monophyletische Gruppe der RLK/Pelle-Familie besteht aus den Tyrosinkinase Pelle Drosophilas, IRAK der Säuger, und den pflanzlichen RLKs. Die RLKs sind unterteilt in ca. 400 membranständige und 200 zytoplasmatische Kinasen (RLCKs, *receptor-like cytoplasmic kinases*) (Shiu & Bleecker, 2001b; Shiu & Bleecker, 2003). In *Arabidopsis thaliana* sind um die 620 rezeptor-ähnliche Kinasen (*receptor like kinases* RLKs), die über divergente extrazelluläre Domänen und zytoplasmatische Kinase-Domänen verfügen, bekannt (Dardick & Ronald, 2006) (Shiu *et al.*, 2004). RLK sind in drei Bereiche aufgeteilt, in extrazelluläre Domäne, Transmembrandomäne, und zytoplasmatischer Kinasedomäne. Mögliche extrazelluläre Domänen sind *proline extensine-like receptor kinases*(PERK-) ähnliche Domänen, Thaumatin-Domänen (Shiu & Bleecker, 2001a), chitinbindende LysM Domänen (Miya *et al.*, 2007), pektin bindende *wall-associated kinase-* (WAK) ähnliche Domäne (Wagner & Kohorn, 2001) und Selbstinkompatibilitäts- (S-) Domäne, die wiederum an der Aktivierung der Selbstinkompatibilität in *Brassicaceae* beteiligt sind (Stein *et al.*, 1991). Die hier nun erläuterte Gruppe der LRR RLKs setzt sich aus Kinasen mit einer extrazellulären LRR Domäne zusammen. Unter den 235 Vertretern (Shiu & Bleecker, 2001a) befinden sich zB FLS2, BAK1, BRI1 (*brassinosteroid insensitive 1*) (Li & Chory, 1997), EFR und PSKR1 (Matsubayashi *et al.*, 2006, Matsubayashi *et al.*, 2002).

Die ein pflanzliches LRR-Protein kennzeichnende LRR-Domäne besteht aus jeweils ca. 24 Aminosäuren, deren Motiv (LXXLXXLXXLXXNXLGXIPXX) sich je nach Protein 1-32 mal wiederholt, und sich aus Exonverdopplung gebildet haben dürfte (Jones & Jones, 1997; Pan *et al.*, 2000). Diese Struktur dient dem Knüpfen von Protein-Protein-Interaktionen, deren Spezifität durch die variablen Stellen (X) der LRR-Domäne bestimmt wird. Die Sekundärstruktur entspricht β -Faltblatt/ β -Turn/ α - Helix Struktur, und aus dieser Sekundärstruktur entsteht abhängig von der Anzahl der LRR Wiederholungen eine hufeisenförmige Tertiärstruktur (Jones & Jones, 1997). Der jeweilige Ligand wird durch die innere Furche des Hufeisens ermöglicht (Hammond-Kosack & Jones, 1997)

In Pflanzen kommen drei Gruppen von LRR Domänen beinhaltenden Proteinen vor. Einerseits LRR-RLKs (*LRR-receptor-like kinases*), LRXs (*LRR-Extensine*), LRR-RPs (*LRR-receptor-like proteins*) und NBS-LRR Proteinen, die später erklärt werden (Baumberger *et al.*, 2003)

Rezeptoraktivierung für RLKs funktioniert analog zu jenen in tierischen Zellen. Nach der Ligandenbindung wird durch Konformationsänderungen in der extrazellulären LRR -Domäne die Bildung von aktiven homo- oder heterodimeren Komplexen ermöglicht. In tierischen Zellen werden für TLR beide Komplexe beobachtet (Underhill, 2003). In vielen pflanzlichen rezeptor-ähnlichen Proteinen (RPS) könnten konservierte Cysteine, welche die LRR Region umgeben, der Bildung von Disulfid Brücken dienen, um stabile Rezeptorkomplexe auszubilden (Trotochaud *et al.*, 1999; Van der Hoorn *et al.*, 2005).

Rolle von BAK1 (*BRI1 associated receptor kinase*) und BKK1 (*bak1 like 1*) in PTI

Teil der pflanzlichen RLK-Superfamilie sind die SERK Proteine. Die Partizipation der SERK an PTI ist durch Signaltransduktion ihrer Kinasedomänen gegeben. Der Ursprung des Namens SERK (*Somatic embryogenesis receptor-like kinase*) geht hierbei auf die Ähnlichkeiten der Proteinstruktur mit dem Karottenprotein DcSERK zurück (Schmidt *et al.*, 1997). Die SERK-ist Bestandteil der 14 Mitglieder umfassenden LRR-Type II Subfamilie der LRR-RLK (Shiu & Bleecker, 2001). BAK1 zählt zu der SERK Proteinfamilie, die in Summe fünf engverwandte LRR-RLK Proteine beinhaltet (Hecht *et al.*, 2001). Diese fünf zeigen partielle funktionelle Redundanz. Sowohl phylogenetische als auch funktionelle Analysen zeigen, dass das am engsten mit BAK1 verwandte Protein BKK1 (*BAK like 1*) ist (He *et al.*, 2007); die *BAK1* Nullmutanten sind lebensfähig, aber wachstumsdefizitär, während die *bak1/bkk1* (*SERK4*) Doppelmutanten letal sind (Chinchilla 2007).

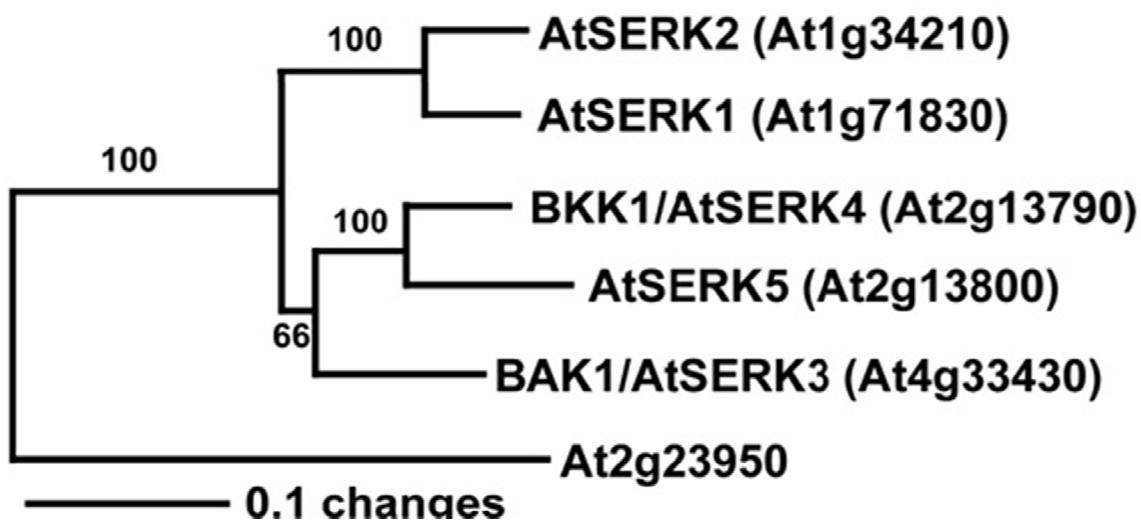


Abbildung 2 Homologie der SERK Proteinfamilie. *BKK1* (*Bak1 like 1*) ist das engste *BAK1* Homolog (He *et al.*, 2007)

1.2.1.2 Membrankomplexe und PTI

Die Bindung von flg22 an FLS2 wird nicht durch *bak1* beeinträchtigt, aber eine Signaltransduktion erfolgt nicht mehr in vollem Ausmaß (Chinchilla *et al.*, 2007). Weitere Kinasen sind mit dem FLS2/BAK1 Komplex assoziiert. Unter diesen PBS1 ähnlichen *receptor like cytoplasmic kinases* (RLCKs) ist *BOTRYTIS-INDUCED KINASE1* (BIK1). Sie wird als aktivierend für sowohl die Reaktion auf flg22 und elf18, dem Minimalepitop von EF-TU, eingestuft (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). BIK1 bildet mit FLS2 einen konstitutiven Komplex. Während der ersten Sekunden nach flg22 Gabe bildet sich zeitlich der FLS2-BAK1 Komplex, in den weiteren Minuten wird PBL1 und BIK1 phosphoryliert, und der Komplex BIK1 FLS2 wird aufgelöst. Vor dem Dissoziieren des Komplexes FLS2 BIK1 allerdings wird eine Transphosphorylierung von FLS2-BAK1 durch BIK1 ausgelöst (Lu *et al.*, 2010). Eine direkte Interaktion zwischen BAK1 und BIK1 ist zwar *in vivo* bisher nicht nachgewiesen, jedoch, wird für die Phosphorylierung BIK1 ein aktiver FLS2 BAK1, und umgekehrt dürfte die Transphosphorylierung weitere Downstreamsignale dieses Komplexes ermöglichen (Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010). BIK1 ist an PTI Ereignissen beteiligt, allerdings, eigentümlicher Weise, nicht an der Aktivierung der MAPK. Ein weiterer konstitutiver Interaktor und eine weitere Kinase des FLS2 BAK1 Komplexes ist *STOMATAL CYTOKINESIS DEFECTIVE1* (SCD1). Es ist Teil der ROS Produktionsregulation nach flg22 Erkennung (Korasick *et al.*, 2010)

Nach seiner Bildung wird jener BAK1/FLS2 Rezeptorkomplex internalisiert und führt zur Aktivierung des Abwehrsystems (Gomez-Gomez & Boller 2000; Altenbach *et al.*, 2008; Takai *et al.*, 2007; Hann *et al.*, 2007).

1.2.1.3 Kalziumsignale sind an der Signaltransduktion des PTI beteiligt

Nach der Zugabe von flg22 wird beinahe unverzüglich eine Alkalisierung und ein langanhaltender Anstieg der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration bemerkt. Sie ist einerseits abhängig von der eingesetzten Konzentration an flg22, andererseits von der erfolgten Perzeption des Epitops an FLS2, und respektive von der Signaltransduktion durch BAK1 ab (Jeworutzki, *et al.*, 2010). Wassilewskija (Ws-0) im Gegensatz zu Col-0 verfügt über kein funktionelles FLS2 (Zipfel *et al.*, 2004). Eine Einschränkung des Kalziumsignals in der Antwort auf flg22-nicht aber auf andere Elicitoren ist die Folge. Im Gegensatz zu FLS2 ist BAK1 notwendig für die Regulation des Kalziumsignals-die Einschränkungen betreffen die Reaktionen auf mehrere Elicitoren. Die Kinetik des Kalziumeinstroms weist hierbei auf zwei separate Mechanismen hin, eine davon dürfte auf der Endozytose des FLS2/BAK1 Komplexes basieren, die möglicherweise zur Öffnung der Kalziumkanäle führt (Jeworutzki, *et al.*, 2010). Das Auftreten der Membrandepolarisation ist zeitlich ähnlich der Produktion von ROS, die Abhängigkeit von ROS auf Kalziumeinstrom ist naheliegend, da notwendige Enzyme über EF-Hand Motive zur Kalziumbindung, und ohne Kalziumerhöhung keine Funktion aufweisen Es ist aber nicht völlig klar ob es in der Gegenrichtung Feedbackregulation zwischen ROS, durch NADPH-Oxidaseprodukte und Elektrolyteinstrom gibt (Jeworutzki, *et al.*, 2010). Downstreamsignale werden wieder durch WRKY Transkriptionsfaktoren in Expression umgesetzt, dazwischen liegt aber Signaltransduktion durch verschiedenen kalziumbindender Proteinen. Es sind drei Haupttypen von Ca²⁺ Sensoren in Pflanzen bekannt. Diese

sind im Einzelnen CAMs und CAM-ähnliche Proteine, Calcineurin B-ähnliche Proteine, und CDPKs (Ma *et al.*, 2008; Harper *et al.*, 2005; Boudsocq & Sheen 2009; Luan, 2009). CDPKs und MAPK reagieren teilweise unterschiedlich auf die MAMP. CDPKs sind für die frühe Signaltransduktion nach der Erkennung von flg22 durch FLS2 verantwortlich (Boudsocq *et al.*, 2010). Dieser Kalziumeinstrom aktiviert nun seinerseits *calcium-dependent protein kinases* (CDPKs) und RbohD, die NADPH Oxidase die für den schnellen ROS burst in Arabidopsis verantwortlich ist (Ogasawara *et al.*, 2008). Wie in Folge beschriebenen MAPK Signaltransduktionswege sind auch CDPK 4, 5, 6, und 11 an der flg22 bedingten Genexpressionsänderung beteiligt (Boudsoq *et al.*, 2010) CAM ähnliche Proteine, insbesondere CML24, werden für die Lipopolysaccharid (LPS)-medierte NO-Produktion benötigt (Smigel *et al.*, 2008). es gibt einen weiteren Zusammenhang zwischen Kalziumsignalen und oxidierten Stickstoffspezies. Die Membrandepolarisation ist in abhängig vom Vorhandensein von Nitraten. Der *oxidative Burst* ist abhängig von Ca^{2+} -Ionen. Dieser ist gekennzeichnet durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies. Zu diesen zählen Wasserstoffperoxid, Hydroxyl- und Superoxid-Anionen. Wasserstoffperoxid führt zur Quervernetzung von Zellwandproteinen (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994) und wirkt toxisch auf Pathogene im Apoplasten. Es sind diese Sauerstoffspezies, die letztlich zu lokalen Zelltodereignissen führen. Die Prozesse die durch Kalziumeinstrom ausgelöst werden sind vielfältiger Natur, und Crosstalk zu MAPK Signaltransduktion besteht. Dass aber heißt, dass eine Serie von Prozessen, die nach der Erkennung eines Epitops, mehrere Antworten durch wechselseitige Manipulation aufweisen kann.

Die Effekte dieser Aktivierung von PRRs führen so zur Ionenkonzentrationsveränderungen an der Membran, durch den Einstrom von Ca^{2+} , und H^+ und dem gleichzeitigem Ausstrom von Cl^- und K^+ (Blatt *et al.*, 1999; Jabs *et al.*, 1997). Die Spezifität dieses Signals ist aber notwendig, um die richtigen Programme anzuregen oder zu inhibieren. In Folge werden die MAPK die hier mit eine Rolle spielen erklärt werden.

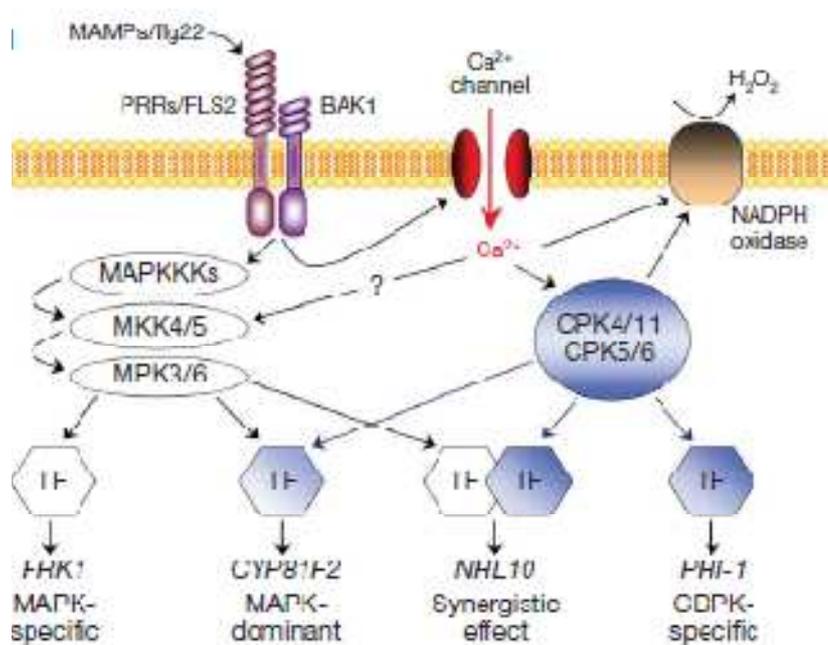


Abbildung 3 Ca^{2+} abhängige Signaltransduktion in Pflanzenimmunsystemen. Signaldiversifikation nach Rezeptoraktivierung (Boudsocq 2010)

1.2.1.4 MAPK und PTI

Wie bereits oben erwähnt ist nach erfolgter Komplexierung von BAK1-FLS2 eine Aktivierung von MAPK-Signaltransduktionswegen zu beobachten. MAPK in *Arabidopsis thaliana* sind hochgradig homolog, jedoch sind ihre Funktionen vielfältig, und trotz ihrer Homologie weisen sie eine erstaunliche Substratspezifität auf (Popescu *et al.*, 2009).

Im Rahmen des PTI sind zwei Kaskaden bekannt. Einerseits werden beide bei Überexpression zu Zelltod führenden *Mitogen activated protein kinase 3* (MPK3)/MPK6 und andererseits MPK4 nach PAMP Bindung aktiviert (Pitzschke *et al.*, 2009a; Popescu *et al.*, 2009; Ren *et al.*, 2006). MPK4 ist durch die MAP Kinase Kinasen MKK1 und MKK2, diese wiederum durch die MAP Kinase Kinase Kinase MEKK1 reguliert. MKK1 und MKK2 interagieren mit MEKK1 an der Plasmamembran, mit MPK4 sowohl an der Membran als auch im Kern (Gao *et al.*, 2008). Die Lokalisierung an der Membran impliziert eine direkte Aktivierung durch PRRs oder deren Korezeptoren, allerdings, ist keine direkte Interaktion gezeigt. Sie inhibieren die Immunantwort, bei Fehlen dieser Inhibitoren kommt es zum Ausbilden von Zwergenwuchs und konstitutiver Aktivierung des Immunsystems, (Gao *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Mészáros *et al.*, 2006; Qiu *et al.*, 2008a; Pitzschke *et al.*, 2009b) MPK4 nutzt nun MKS1, bezeichnenderweise als MAP Kinase Substrat1 bezeichnet, als Substrat, welches wiederum mit den WRKY Transkriptionsfaktoren 25 und 33 interagiert (Andreasson *et al.*, 2005). Der Name WRKY entspringt hierbei der Konsensussequenz der Proteinfamilie in deren DNS-bindenden Domäne, die aus dem über die gesamte Familie invarianten und stabilisierend wirkenden WRKYGQK Motiv und einem CX₄₋₅CX₂₂₋₂₃HXH Zink bindenden Motiv besteht (Yamasaki *et al.*, 2010). Die Interaktion zwischen WRKY33, MPK4 und MKS1 ist konstitutiv und wirkt inhibierend auf WRKY33. Erst die Phosphorylierung von MKS1, die in letzter Instanz aus der Gabe von flg22 herrührt, durch MPK4 entlässt WRKY33. Es setzt nun die Transkription von *phytoalexin deficient3* (PAD3) einem Cytochrome P450 in Gang (Qiu *et al.*, 2008b). MPK4 ist aber nicht nur als Aktivator von WRKY33 vonnöten. Gleichzeitig wirkt diese MPK4, zumindest in vitro, auf **resistance to *p. syringae pv maculicola*** (RPM1) *interacting protein4* (RIN4) phosphorylierend ein (Zhang & Zhou, 2010). RIN4 ist wiederum ein Inhibitor des R-Proteins RPM1, es zeigt sich also ein Zusammenhang zwischen ETI und PTI/MPK. Wobei der ETI erst später Erklärung finden wird. Kehren wir gedanklich wieder an die Membran und zum PTI zurück. Wir haben die erste aktivierte MAPK Kaskade nach flg22 Gabe betrachtet und werden nun die zweite begutachten. MPK3 und MPK6 werden ebenfalls nach flg22 Gabe aktiviert. Wiederum sind sie Ziel einer Kaskade, die durch MAPKK MKK4 und MKK6 angesprochen werden. Die somit für diese Kaskade relevanten Kinasen sind MPK3, MPK6, MKK4 und MKK5, die die pflanzliche Immunantwort positiv regulieren (Pitzschke *et al.*, 2009b). MPK3 ist für die Camalexinakkumulation nach *Botrytis cinerea* Infektion relevant, die *mpk3* Mutanten ist krankheitsanfällig (Ren *et al.*, 2008). Camalexin ist das Indol-Phytoalexin *Arabidopsis thaliana*s die Regulation und Funktion wird später beschrieben. Downstream von MPK3 liegt *VirE2-interacting protein* (VIP1), ein bZIP Transkriptionsfaktor (Djamei *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung von VIP1 ist nun notwendig für den Kernimport dieses Transkriptionsfaktors, der in weiterer Folge unter 1000 in Folge des PAMPs aktivierten Genen, das *pathogen related Gen PR1* transaktiviert (Djamei *et al.*, 2007; Zhang & Zhou, 2010). Die Veränderung von Transkription durch PTI-Ereignisse sind bedingt durch die oben beschriebenen und zusätzlich vielen verschiedenen WRKY-

Transkriptionsfaktoren und TGA-Transkriptionsfaktoren (Popescu *et al.*, 2009). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass Mitogen-aktivierte Proteinkinasesignalkaskaden durch Pathogenerkennung beeinflusst werden (Asai *et al.*, 2002; Kroj *et al.*, 2003). Sodass die Aktivierung von MAPK wiederum zur Expression von PR-Genen führt (Lee *et al.*, 2004; Asai *et al.*, 2002). Weiters ist auch eine Aktivierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren möglich, die an Promotoren mit W-Boxen anbinden und wiederum zur PR-Gen Expression führen (Eulgem *et al.*, 1999).

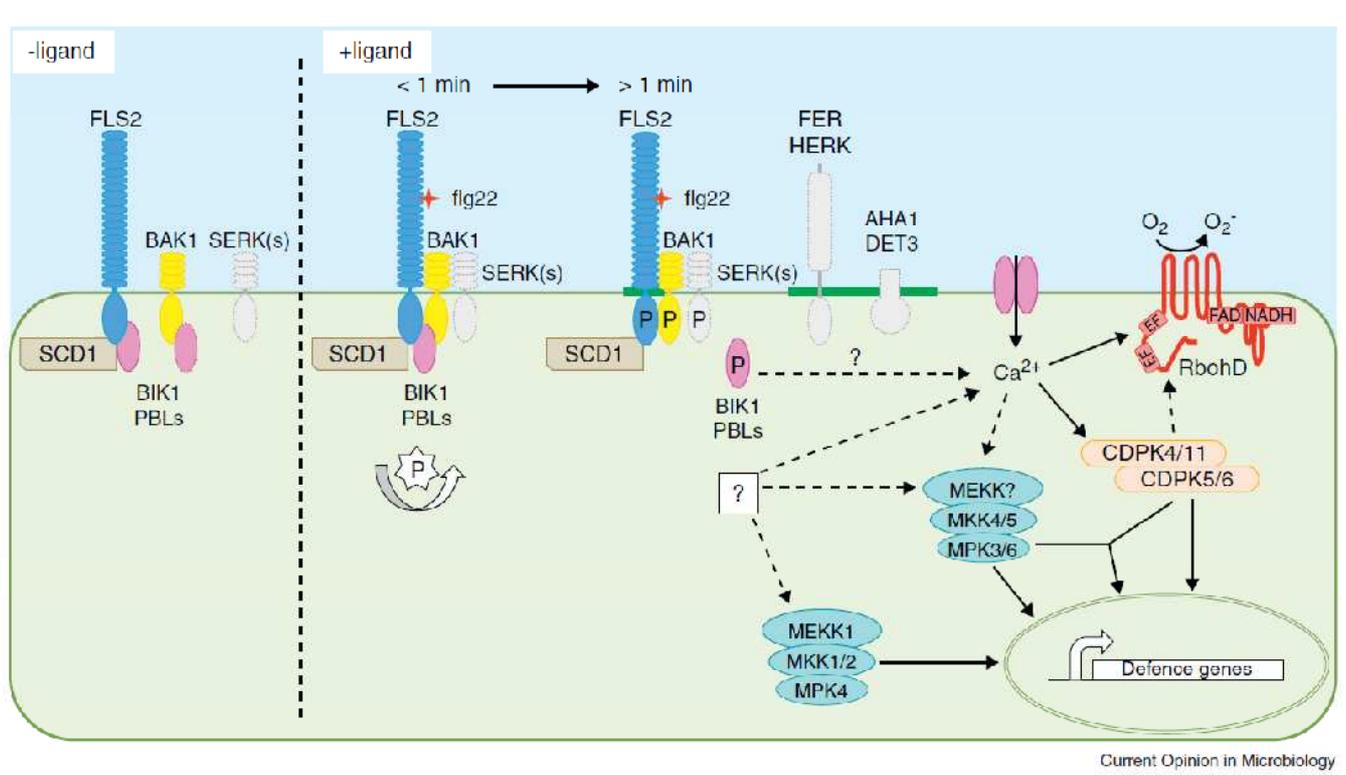


Abbildung 4 Reaktion nach Aktivierung des FLS2 Rezeptors (Segonzac and Zipfel, 2011)

1.2.2. Effektorinduzierte Suszeptibilität (ETS)

Die Interferenzeffekte zwischen Reaktionen mittels unterschiedlicher Phytohormonsignalkaskaden im Rahmen des PTI zeigen sich als durchaus nutzvoll für Pathogene, um falsche Reaktionen zu provozieren. So ist eine Signalkaskade über Jasmonat für einen nekrotrophen Organismus schädlich, eine Salicylatantwort jedoch hilfreich für Überleben und Vermehren dieser Organismen. Insofern, hier in umgekehrtem Kontext, ist die Nachahmung von Jasmonaten, und deren Injektion in pflanzliche Zellen dienlich für biotrophe Organismen, um Salicylatsignaltransduktionswege zu unterdrücken (Nürnberg *et al.*, 2004). Die Injektion von Coronatin basiert auf einer solchen Strategie (Laurie-Berry *et al.*, 2006). Aber nicht nur das Vortäuschen von Phytohormonen, sondern auch die gezielte Manipulation an den für die Signaltransduktion benötigten Proteinstrukturen dient dem Zweck des Abschaltens oder Modulierens der pflanzlichen Reaktion (Abramovitch *et al.*, 2006). Die Injektion von Effektorproteinen erfolgt mittels Typ 3-Sekretionssystemen (TTSS) bei gramnegativen Bakterien (He *et al.*, 2004). Werden Pflanzen mit nicht virulente Pto-DC3000 *hrcC* (*ohneTTSS*) *Pseudomonas* infiziert, so ist die Infektionsrate niedriger als bei Wildtypbakterien. Wird aber eine transgene, *AvrPto* exprimierende Pflanze infiziert, so erhöht sich die Rate wieder auf Wildtypniveau. Das Niveau verändert sich aufgrund der Unterdrückung des PTI. Es sind diese Effekte ebenfalls bei der transgenen

Expression von AvrRpm1, AvrRpt2, AvrB, AvrPtoB, HopAI1, HopF2, HopAO1 und HopG1 zu beobachten (Kim *et al.*, 2005; Shang *et al.*, 2006; de Torres *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009; Underwood *et al.*, 2010; Block *et al.*, 2010).

Mehrere Effektoren werden vom Bakterium gleichzeitig in die Wirtszelle eingebracht. Diese verteilen sich in Kompartments der Wirtszelle und verändern dort die Immunreaktion. Es ist die kollektive Effekt der Effektoren, die für eine erfolgreiche Veränderung der Immunreaktion notwendig ist. Wenn einer dieser in der Wirtszelle befindlichen Effektoren nun durch NB-LRR Proteine erkannt wird, kommt es zu einer starken, gegen das Pathogen gerichteten Antwort der Wirtszelle, die *effector triggered immunity* setzt ein (Chisholm *et al.*, 2006; Dangl & Jones, 2001; Jones & Dangl, 2006).

1.2.3. Effektorinduzierte Immunität (ETI)

Durch Koevolution entstanden einerseits auf Bakterienseite immer neue Mechanismen, um die pflanzliche Immunabwehr zu umgehen, auf der anderen Seite wurden die Mechanismen der Pflanzen entwickelt, um dem zu entgehen. Durch die evolutionäre Koentwicklung von spezifischen Abwehr- und Infektionsmechanismen entstehen rasse-kultivarspezifische Resistenzen und kultivarunspezifische Resistenzen. Die „Gen für Gen Hypothese“ Flors (1955) besagt, dass die rasse-kultivarspezifische Resistenz auf der Erkennung des Virulenzprodukten des Pathogens durch das Avirulenzprodukt der Pflanze beruht. Eine inkompatible Interaktion, die im Gegensatz zur kompatiblen Interaktion zur Resistenz führt, wird in Folge nur dann ausgebildet, wenn Avirulenzgene (avr-Gene) mit den entsprechenden Resistenzgenen (R-Genen) zusammentreffen (Schneider, 2002; Prell & Day, 2000). Nichtkompatible Interaktionen sind so geartet, dass ein Avr –Produkt sein entsprechendes R-Protein antrifft. Durch nichtkompatible Interaktionen wird Resistenz ausgelöst. Kompatible Interaktionen führen im Gegensatz dazu nicht zur Resistenz, das Avr-Produkt wird nicht erkannt. Die Detektion von Avirulenzprodukten durch R-Proteine erfolgt direkt oder indirekt. Ähnlich des PTI ist auch der ETI durch ROS-Akkumulation und *defense -gene* Aktivierung gekennzeichnet. Nicht desto trotz ist es nicht ein und derselbe Mechanismus, sondern beide Arten der Immunität sind von unterschiedlicher Kinetik und Quantität. ETI ist die gewalttätige Variante des PTI, sie äußert sich in Zelltod (Shirasu and Schulze-Lefert, 2000; Tao et al, 2003; Caldo et al, 2004).

Die wesentlichste Rolle in der ETI spielen NBS-LRR (*nucleotide binding site leucine rich repeat*) Proteine. Deren Aufbau lässt sich in zwei weitere Subklassen anhand deren N-terminalen Domänen unterteilen. Einerseits sind CC (coiled coil)-NBS-LRR Proteine bekannt, deren bekannteste Vertreter in *Arabidopsis* RPM1, RPP8, RPS5 und RPS2 sind (Nürnberger *et al.*, 2004). Die Immunreaktion wird hierbei von NDR1 ausgeführt (Century *et al.*, 1995). Die zweite Art von aminoterminalen Domänen ist die TIR ähnliche Domäne, deren Name *Drosophila Toll and Human Interleukin-1 Receptor* aus Ähnlichkeiten rührt. Sie sind abhängig von EDS1, PAD4 und SAG101 (Aarts et al 1998; Feys *et al.*, 2005; Glazebrook *et al.*, 1996; Parker et Al, 1996). Beide N-terminale Domänen dienen dem Erkennen von Interaktionspartnern und dem Aufbau von Protein-Protein-Wechselwirkung und beiden Klassen gemein ist eine Carboxyterminale LRR (Tameling *et al.*, 2002). Die LRR Region wird dem Auffinden von ETS Events zugeschrieben

(Kajava, 1998; Torii, 2004; Ellis *et al.*, 1999; Nimchuk *et al.*, 2003). Die Erkennung des Effektors wird von den variable Stellen in der C-terminalen LRR-Domäne der R-Proteine ausgeführt (Shen *et al.*, 2003). Eine Aktivierung von R-Proteinen führt häufig zu lokalisierendem Zelltod, der zur Eindämmung der Infektion genutzt wird (Noutoshi *et al.* 2005). Überexpressionen von R-Genen führen zu Reduktion der Saatgutmenge, Zwergenwuchs, konstitutiver Expression von PR-Genen, und zu höheren Resistenzen gegenüber Pathogenen (Tian *et al.*, 2003; Oldroyd & Staskawicz, 1998; Stokes *et al.*, 2002). Evolutionär betrachtet stellen R-Gene eine divergente Familie dar. Während dikotyle Pflanzen Gene für TIR- und CC-NB-LRR-Proteine aufweisen, sind in Monokotylen ausschließlich nicht TIR-NB-LRR-Proteine vertreten (Bai *et al.*, 2002; Monosi *et al.*, 2004).

In Säugetieren kommen NLR-Proteine, Analoge von NB-LRR-Proteinen als intrazelluläre Rezeptoren der Immunantwort vor (Franchi *et al.*, 2009). Auch hier bestehen einige Ähnlichkeiten zwischen Pflanzen und tierischen Systemen. NB-LRR und NLR (NOD-like-receptors) Proteine sind auf homologe Chaperone angewiesen. Wie NB-LRR sind auch NLR in der Lage, entweder direkt Effektoren oder indirekt durch Effekte einen Immunantwort auszulösen. Die zentrale NB-Domäne der R-Proteine ist strukturell verwandt mit den NB-Domänen von *apoptotic regulator human apoptotic protease-activating factor 1* (APAF-1) und *Caenorhabditis elegans* Homolog CED-4, man spricht von der NB-ARC-Domäne (van der Biezen & Jones, 1998). NB-ARC-Domänen beinhaltende Proteine werden wiederum der STAND-Familie zugerechnet, wobei STAND für *Signal transduction ATPases with numerous domain* steht, deren Vertreter in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und Tieren auftreten (Leipe *et al.*, 2004). Die Substrukturen dieser NB-ARC sind zwar zwischen APAF1 und CED-4 konserviert, sind aber unterschiedlich in pflanzlichen R-Proteinen, hier fehlt eine von vier Subdomänen, ARC3 (Shen & Schulze-Lefert, 2007). Bindung des Nukleotids obliegt aber konservierten Strukturen, den ARC1 und ARC2 (Shen & Schulze-Lefert, 2007). ATP und ATP-Hydrolyse regulieren durch Konformationsänderungen die Aktivität des Proteins, ATP-Bindung aktiviert es, ATP-Hydrolyse beendet die Aktivität (Tameling *et al.*, 2006). Das Histidin des Motivs hxhHD in ARC2 ist hierbei verantwortlich für die Bindung des Phosphats (Takken *et al.*, 2006; Riedl *et al.*, 2005). Dieses Motiv ist auch für die Aktivierung, bzw. für die Unterdrückung der Aktivierung verantwortlich. Mutationen der Histidine oder des Aspartats führen zur Autoaktivität der NB-ARC-Proteine (Bendahmane *et al.*, 2002; Shirano *et al.*, 2002; Tanabe *et al.*, 2004; Howles *et al.*, 2005; Tameling *et al.*, 2006). Aber nicht ausschließlich dieser Locus ist anfällig für Autoaktivierung, sondern ebenfalls Stellen zwischen NB-Domäne und LRR, bzw. N-terminale Teil der LRR-Domäne, was einen Zusammenhang der Funktion zwischen NB und LRR deutlich macht (Zhang *et al.*, 2003; Bendahmane *et al.*, 2002; Shirano *et al.*, 2002; Tanabe *et al.*, 2004; Takken *et al.*, 2006). Zeitlich betrachtet ergibt sich also folgende Situation: Nach Aktivierung der NLR und ähnlich für die NB-LRR-Proteine wird ihre LRR-Domäne so verändert, dass ihre NB-Domäne freigelegt wird und eine Oligomerisation eintritt, was wiederum zu einer Aktivierung von Molekülen führt, die durch die jeweilige N-terminale Domäne gebunden sind (Ting *et al.*, 2006). Somit gehen dieser Freilegung und Aktivierung von Downstreamkomponenten zwei Konformationsänderungen voraus. Einerseits die wird durch die Bindung der Effektoren/bzw. deren Effekte, der ATP/ADP-Zustand verändert, was eine zweite Konformationsveränderung verursacht, die die Freilegung der N-

terminalen Domänen erzwingt. Diese wird wiederum durch das Downstreamtarget erkannt (Shen & Schulze-Lefert, 2007). ATP Hydrolyse zwingt das Protein wieder in den Grundzustand zurück (Takken et al, 2006).

Einige wenige direkte Interaktionen zwischen Avirulenzprodukten und NB-LRR wurden gezeigt (Tang *et al.*, 1996; Jia *et al.*, 2000; Dodds *et al.*, 2006). Wesentlich häufiger wurden indirekte Wechselwirkungen beobachtet. Die kleine Zahl der verschiedenen NB-LRR Proteine in *Arabidopsis* impliziert, dass es sich hauptsächlich um indirekte Erkennung der Effekte, eher als der Effektoren handelt, um eine Aktivierung des ETI zu bewerkstelligen. Die hohe strukturelle Variabilität von bakteriellen Effektoren würde eine größere Anzahl von NB-LRR-Proteinen notwendig machen, wenn deren Aktivierung hauptsächlich auf direkten Interaktionen basieren würde. Ein Beispiel für ein Substrat verschiedener bakterieller Effektoren ist RIN4. RIN4 wird durch AvrB und AvrRpm1 als Substrat benutzt. RIN4 interagiert mit RPM1 und RPS2 (Grant et al 1995; Kunkel *et al.*, 1993). Diese Interaktionen dienen der Unterdrückung von Signalen durch die R-Gene ((Ellis & Dodds, 2003; Chisholm *et al.*, 2006). Durch den Abbau von RIN4 wird aber das NB-LRR Protein RPM1 aktiviert (Mackey *et al.*, 2002). Somit erkennt RPM1 quasi beide Avirulenzproteine durch deren Aktivität. Es ist aber gleichzeitig so, dass es sich mehrere R-Proteine um ein Effektorsubstrat „kümmern“. So wird RIN4 auch durch RPS2 bewacht und nach Abbau von RIN4 durch avrRpt2 aktiviert (Axtell & Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003). Ein anderes Beispiel für die Wirkungsweise von R-Genen ist das untypische R-Gen *RRS1*, das die Resistenz gegen den *Ralstonia solanacearum* PopA2 vermittelt (Deslandes et al, 2003). Sein Aufbau ist der eines klassischen R-Proteins, TIR-NB-LRR, jedoch weist es auch eine WRKY Domäne auf. Es wird durch eine Relokalisierung eines Trockenstress induzierten Host-Cystein-Protease RD19 in den Nukleus aktiviert (Koizumi *et al.*, 1993; Bernoux *et al.*, 2008). Diese wird vom bakteriellen Effektor popP2 in den Kern verschoben und dürfte dort den WRKY-Teil des R-Proteins als Transkriptionsfaktor aktivieren (Bernoux *et al.*, 2008). Wie bereits für *RRS1* gezeigt ist die Verteilung von Faktoren zwischen den Zellkompartementen für die Funktion der R-Gene wichtig. SNC1, supressor of npr1-1, constitutive1, weist ebenfalls eine Abhängigkeit seiner Lokalisation auf. Diese Abhängigkeit ist analog zu der des in Gerste gefundenen Faktors MLA, sowie auch zu der des in Tabak und *Arabidopsis* gefundenen Faktors RPS4. Beide sind in Kern und Zytoplasma verteilt. Dieser Verteilung resultiert aus Export und Importeigenschaften der jeweiligen R-Proteine (Zhang et al, 2003; Palma et al, 2005; Zhang & Li, 2005). Der Anteil der kernlokalisierten Proteine ist hierbei ein Indikator für die Aktivität der drei R-Gene. Ein weiteres Beispiel ist das Tabak R-Protein N. Es dient der Erkennung von p50. Diese erfolgt zytoplasmatisch, eine Veränderung der Lokalisierung von N und/oder p50 führt zu Veränderungen der Immunreaktionen (Burch-Smith et al, 2007). Ein Konkretes, wenn auch umstrittenes Beispiel liefert Avr Pto. Es wurde lange davon ausgegangen dass dieses Avr-Produkt den PTI durch Inhibierung von BAK1 unterdrückt. AvrPto könnte mit BAK1 interagieren, nicht aber mit FLS2 oder EFR Kinasedomänen, wobei dies unklar bleibt, neueren Publikationen zufolge ist BAK1 kein Target dieses Effektorproteins (Shan *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2011). Laut Xiang, der 2008 davon ausging dass diese Interaktion stattfindet wäre sie in der Lage gewesen den PTI zu unterbinden (Xiang *et al.*, 2008).

Downstream der R-Proteine liegen Transkriptionsfaktoren und eine Anzahl von anderen Proteinen, mit teilweise unverständenen Funktionen, die (un)-entbehrlich sind für die Aktivierung einer hypersensitiven Reaktion. Die

Unterscheidung der R-Proteine in TIR- und CC NB-LRR impliziert die Assoziation mit unterschiedlichen Downstreamkomponenten, da eine Interaktion mit diesen an den variablen Domänen auftritt. EDS1 und NDR1 sind zwei dieser Proteine, deren Funktion für die R-Proteine der beiden Typen benötigt werden, aber in einem unterschiedlichen Ausmaß in den beiden Klassen eine Rolle spielen (McDowell *et al.*, 2000; Glazebrook, 2001). Weitere Proteine, die zur Aktivierung benötigt werden, sind SGT1b und RAR1. Beide sind in gleichem Ausmaß wichtig für die Aktivität beider Klassen (Austin *et al.*, 2002; Tor *et al.*, 2002). EDS1 ist ein Regulator für biotischen und oxydativem Stress (Wiermer *et al.*, 2005). PAD4 und EDS1 sind mit Lipasen Homolog (Falk *et al.*, 1999; Jirage *et al.*, 1999). EDS1 weist keinerlei bekannte Chromatin- oder DNS- bindende Domänen auf und ist sowohl im Kern als auch zytoplasmatisch lokalisiert (Feys *et al.*, 2005; Wirthmueller *et al.*, 2007). EDS1 verändert die Aktivierung und Relokalisierung der R-Proteine nicht, es wirkt aber als Signal-Mediator der R-Proteinsignale. Bei Verlust der EDS1 Funktion kommt es zur Aufhebung des R-Proteinsignals, gleichzeitig zum Ausbleiben der Transkriptionsveränderung von 130 *defense related* Genen (Bartsch *et al.*, 2006; Wirthmueller *et al.*, 2007) EDS1 interagiert mit PAD4 und SAG101, ist dadurch wesentlich mit der Auslösung des HR verbunden und löst diesen nach der Erkennung einer Vielzahl von Pathogenen aus (Feys *et al.*, 2001, 2005; Hu *et al.*, 2005). PAD4 und EDS1 können in Bezug gesetzt werden zu Triacylglycerol Lipasen (Jirage *et al.*, 1999; Falk *et al.*, 1999). Diese Proteine werden bei den R-Genen eine weitere Rolle spielen. Phosphatidylsäure, deren Konzentrationen nach Abwehrreaktionen erhöht sind, werden von Phospholipasen D (PLD) hergestellt (Meijer & Munnik, 2003). PLD- γ wurde als Dämpfer für H₂O₂ ausgelöste Zelltodreaktionen beobachtet. PLD- γ selbst wird durch Ölsäure stimuliert, bei deren Fehlen entwickeln sich verletzungs-imitierende Phänotypen (Wang & Wang, 2001; Kachroo *et al.*, 2003) Ebenfalls sind Sphingosine an der Regulation des Zelltods beteiligt. So zeigt sich bei Fehlen von ACD11, einem Sphingosin-Transfer-Protein, ein PAD4- und EDS1- abhängiger Zelltod (Brodersen *et al.*, 2002).

NDR1 ist ein stark modifiziertes, verfügt es doch über einen C-terminalen Glycosylphosphatidylinositol-Anker und eine N-terminale Glycosylierung, Membranprotein mit Funktion in R-Proteinaktivierung (Century *et al.*, 1997; 1999; Coppinger *et al.*, 2004). Diese C-terminale Modifikation ist speziell. Dieser Anker ist, im Gegensatz zu den meisten so modifizierten Proteinen ist dieser Anker nicht durch Phospholipase C spaltbar (Coppinger *et al.*, 2004). NDR1 ist ein teils homolog zu Integrinen. Seine Funktionen sind die Regulation der Elektrolytsekretion und die Aufrechterhaltung der Struktur der Junctions an der Plasmamembran. Seine Funktionen umfassen die Reaktion auf Pathogene wie die Reaktion auf Stress (Century *et al.*, 1995, Knepper & Day, 2011). Ebenfalls von Interesse, wenn auch in der Erklärung des PTI zurückgestellt worden, ist die Funktion von NDR1, in der durch FLS2/BAK1 medierte Reaktion auf flg22. FLG22-INDUCED RECEPTORLIKE-KINASE1 (FRK1) ist ein früh exprimierter Marker nach Aktivierung des MAPK Pathways, nach Flg22 Behandlung. *ndr1-1* zeigen in der Expression dieses Markers einen eindeutigen Defekt gegenüber Wildtyp-Pflanzen. Ebenfalls reduziert sind MAPK3 und MAPK6 nach Behandlung mit flg22 (Beckers *et al.*, 2009; Knepper & Day, 2011). NDR1 ist ebenfalls als Interaktionspartner von RIN4 bekannt, wobei wieder der Link mit den MAPK des PTI hergestellt wäre (Day *et al.*, 2006).

Downstream einer Aktivierung dienen weitere Faktoren als Interaktionspartner mit R-Genen. WRKY Transkriptionsfaktoren binden an invariante N-terminale Domänen von CC-NB-LRR Proteinen an (Shen *et al.*, 2007). Diese Interaktion führt in weiterer Konsequenz zur Aufhebung deren Inhibierung und aktiviert MAMP-triggered Immun Antworten, was prinzipiell zu einem programmierten Zelltod (PCD) führen kann (Shen & Lefert, 2007). WRKY Proteine sind Transkriptionsfaktoren, verfügen typischerweise über eine WRKY Domäne, die an cis- aktive DNS Elemente, sogenannte W-Boxen bindet (Ulker & Somssich, 2004; Yamasaki *et al.*, 2005). Eine Interaktion mit der Maschinerie der Transkription konnte auch für RPM1 gezeigt werden. Es interagiert mit dem *DNA polymerase II accessory Protein* TIP49a, einem Inhibitor der pflanzlichen Immunantwort (Holt *et al.*, 2002).

Die Eingriffe in die Transkription sind die Folge der Aktivierung von R-Proteinen und der Kernlokalisierung des entstehenden Signals. Eine Aktivierung von R-Proteinen setzt zweierlei voraus: Einerseits ist die Aufhebung der Inhibierung, wie oben dargelegt durch jeweilige Effektoren, und andererseits das Vorhandensein eines Pools von funktionsfähigen Proteinen selbst vonnöten. Diese Voraussetzung wird durch ein enges Geflecht von R-Proteinen mit Chaperonen und Abbau-Pathways erfüllt. Die Domänenstruktur von RAR1 lieferte zuverlässige Vorhersagen seiner Interaktion mit SGT1 (Azevedo *et al.*, 2002). In Abwesenheit von RAR1, SGT1 oder HSP90 sind Senkung des Grundlevels der R-Proteinen zu beobachten (Tornerio *et al.*, 2002; Hubert *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Belkhadir *et al.*, 2004; Bieri *et al.*, 2004; Holt *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2006). HSP90 dient hierbei der Stabilisierung R-Proteine. Es interagiert mit diesen und mit den Cochaperon-ähnlichen RAR1 und SGT1 (Hubert *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2002; Shirasu and Schulze-Lefert, 2003; Takahashi *et al.*, 2003; Bieri *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Shirasu *et al.*, 2008). Degradation wird ebenfalls von diesem Komplex reguliert. RAR1 und SGT1 interagieren mit Untereinheiten des COP9 Signalosoms (Serino and Deng, 2003). SGT1 im speziellen interagiert mit SCF, einer Ubiquitin Ligase (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002).

Zusammenfassend lässt sich der ETI wie folgt in Kürze darstellen. Wie im SA Kapitel dargestellt führen Wechselwirkungen aus Ionenströmen und Hormonen letztendlich zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und zur Aktivierung der Expression, der für die Synthese von Abwehrstoffen benötigten Proteine (Yang *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998). Die Produktion von Callosebarrieren, die Verdickung der Kutikula, MeSA-Export etc..., führt zur Verhinderung einer Ausdehnung der Infektion, in deren Grenzen eine durch Zelltod gekennzeichnete Reaktion, die Hypersensitive (HR), einsetzt (Greenberg 1996; Heath, 2000; Bell, 1981; Hahlbrock & Scheel, 1989).

1.2.3. Erworbene Resistenz

Die Prozesse die beschrieben wurden führen aber gleichzeitig zur zellulären „Erinnerung“

Nonexpressor of PR1 (NPR1) wurde als Regulator verschiedener *pathogenesis related* (PR) Gene, und als wesentlich für die *systemic acquired resistance* (SAR) beschrieben (Dong, 2004). Als Konsequenz von SAR und somit als Funktionsweise von NPR1 werden viele verschiedene Proteine mit Aufgaben im sekretorischen Pathway und ER-Komponenten verstärkt exprimiert.

Die Fähigkeit, nicht betroffene Zellen über eine mögliche Gefährdung zu unterrichten, ist auch in der Pflanze gegeben (Ross, 1961a,b). Je nach Distanz zwischen der Infektion und der Resistenz spricht man von bei kurzen Distanzen von *local acquired resistance* (LAR) und bei weiteren von SAR (Ross, 1961a, b). SAR wird sowohl durch ETI- als PTI- Ereignisse induziert (Pieterse, *et al.*, 2009). Sie zeichnet sich insbesondere durch die Expression von pathogenesis-related- (PR-) Genen aus (van Loon *et al.*, 2006). Salicylat ist hierbei für die Signalübertragung zuständig (Pieterse *et al.*, 2009). Nicht SA abhängige Resistenzen sind jasmonat- und ethylen- abhängig und die sogenannte *induced systemic resistance* (ISR), sie ist ebenfalls jasmonat- und ethylen-abhängig und wird durch nicht pathogene Wurzelbakterien hervorgerufen (van Loon *et al.*, 1998; Pieterse, *et al.*, 2009; Staswick *et al.*, 1998; Thomma *et al.*, 1998; Vijayan *et al.*, 1998; Chang & Shockey, 1999; Thomma *et al.*, 1999). Eine Signalinterferenz zwischen den oben genannten Resistenzen ist möglich.

1.2.4. Phytohormone

Hormonsignale spielen in Pflanzen eine wesentliche Rolle in der Signaltransduktion innerhalb der Zellen und zwischen Zellen bzw. Zellverbänden. Die hier dargestellten Phytohormone wirken teilweise synergistisch und teilweise antagonistisch. Das Verständnis der jeweiligen Signaltransduktionswege ist notwendig, um einerseits den Zelltod zu verstehen, der in weiterer Folge in den Resultaten ersichtlich wird, andererseits gegen andere Signaltransduktionswege abzugrenzen, sprich die Erklärung der nicht an diesem Phänomen partizipierenden Hormone erscheint notwendig, um gegen sie zu diskriminieren.

Die Unterteilung der Pathogene in Nekrotrophe, Hemibiotrophe und Biotrophe spielt eine wesentliche Rolle in der Art der Pflanzenreaktion. Die Unterschiede in der Neigung, lebendes oder totes Gewebe zu besiedeln, führt dazu, dass spezialisierte Signaltransduktionswege, die durch Phytohormone reguliert werden, in den Pflanzenzellen notwendig sind, um eine angemessene Reaktion zu erlauben. So werden Nekrotrophe, also jene, die das Leben in abgestorbenem Gewebe vorziehen, durch Jasmonat regulierte Signaltransduktionswege Biotrophe durch salicylatbedingte (SA-bedingte) Signaltransduktionswege, eingedämmt (Spoel *et al.*, 2007; Robatzek *et al.*, 2006). Neben bakteriellen und pilzlichen Pathogenen sind herbivore Insekten zu betrachten. Bei Verwundungen prägen Jasmonate das Erscheinungsbild der Reaktion (Glazebrook, 2005; Pieterse *et al.*, 2009). Durch Überlagerung der Effekte von Phytohormonen, also positiver wie negativer Interferenz, werden weitere Möglichkeiten geschaffen.

Einerseits wirken Jasmonate- und Ethylen-regulierte Signaltransduktionswege synergistisch, Salicylat und Jasmonat antagonistisch (Glazebrook, 2005; Kunkel & Brooks, 2002; Tsuda *et al.*, 2009).

SA-Signale führen zur Anpassung der Redox-Systeme auf die sich veränderten Notwendigkeiten ROS-Bildung und Abbau zu kontrollieren bzw. auf abiotische Reize angemessen zu reagieren (Mou *et al.*, 2003; Mateo *et al.*, 2006). Eine schlussendliche Aktivierung von Enzymen ist die Folge (Ananieva *et al.*, 2004; Popova *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008). Chorismat dient der in den Chloroplasten ablaufenden Hormonsynthese als Ausgangssubstrat, wobei zwei verschiedene Synthesewege möglich sind (Wildermuth, 2006; Garcion and Métraux, 2006). Einerseits kann SA aus einer Reaktionskaskade mit den Intermediärprodukten Benzoesäurederivaten oder über Cummarylsäuren, die durch Phenylalanine Ammoniumlyasen gestartet wird, generiert werden. Andererseits ist eine zweistufige Reaktion möglich die via Isochorismatsynthese und Isochorismate Pyruvatlyase katalysiert wird (Strawn *et al.*, 2007; Wildermuth *et al.*, 2001; Verberne *et al.*, 2000). Diese Reaktion stellt den Hauptteil von SA, in Tabak und *Arabidopsis* während einer Infektion (Catinot *et al.*, 2008; Wildmuth *et al.*, 2001). SA wird weiter umgesetzt durch SA Glykosyltransferasen in Glukosederivate, hierbei unterscheidet man Verbindungen mit Speicherfunktion, die in der Vakuole gelagert werden und bioaktive, zytoplasmatische Verbindungen (Dean *et al.*, 2003,2004,2005; Lee and Raskin, 1998, 1999; Song, 2006). Durch die Umsetzung von SA in MeSA wird ein Transport des Hormons von infizierten Geweben in systemische Gewebe möglich, dies dient der Generierung eines systemic required resistance (SAR) Signals (Vlot *et al.*, 2009). SA-Niveaus sind in Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress erhöht. Abhängig von der Distanz des Events ist eine graduelle Senkung der SA-Konzentration zu verzeichnen. Während „systemische“ Organe, also solche, die nicht direkt infiziert werden, in Infektionsversuchen eine schwache, bis zu 5facher Erhöhung verzeichnen, ist eine Induktion der SA-Menge in direkt infizierten Organen bis zu 100fach gegenüber des Grundniveaus zu verzeichnen. SA bindet in weiterer Folge an verschiedenen Enzymen, darunter Katalasen zum Abbau von Peroxiden und anderen ROS, und löst eine Inhibierung der Abbaufunktion dieser Katalasen aus (Chen *et al.*, 1993). Die weitere Einwirkung von SA auf andere ROS Abbauende Enzyme führt zu einer Anreicherung der Zelle mit ROS (Vlot *et al.*, 2009).

SA-Antworten werden zeitlich in zwei Gruppen eingeteilt. Einerseits frühe Antworten, die nach spätestens 30 Minuten auftreten, werden durch sowohl in Tabaken als auch in *Arabidopsis* durch TGA-Transkriptionsfaktoren hervorgerufen, und benötigen keine *de Novo* Synthese von Proteinen (Horvath *et al.*, 1998; Blanco *et al.*, 2005; Thurow *et al.*, 2005). Unmittelbare SA-abhängige Veränderungen sind nicht Nonexpressor of PR1 (NPR1) abhängig, jedoch erhöht sich die NPR1 Abhängigkeit in Folge (Blanco *et al.*, 2005, 2009). Transkription ist durch *SA-responsive Loci* (SARLc) dem Einfluss der SA unterworfen. ETI und PTI sind die Grundlage der Expression von SARLc. Sie führen durch die Akkumulation von SA zum Erreichen des, für weitere Antworten benötigten SA-Spiegels. PTI aktiviert den Phenylpropanoid-Metabolismus, der wiederum für eine Erhöhung der SA Menge verantwortlich ist (Navarro *et al.*, 2004; Tsuda *et al.*, 2008; Wildermuth, *et al.*, 2001; Yaeno & Iba, 2008; Garcion *et al.*, 2008). Wie oben erwähnt ist auch die Synthese von Transkriptionsfaktoren erhöht. Diese wiederum sind an der Expression der frühen SARLc

beteiligt. Unter diesen befinden sich PAD4, EDS1, NPR1 und die Isochorismatsynthase1 ICS1 (Wiermer *et al.*, 2005; Feys *et al.*, 2001; Jirage, 1999; Wildermuth, 2002; Yu *et al.*, 2001; Rochon *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2008). ICS1 konvertiert Isochorismat in SA, diese Reaktion stellt den Hauptanteil des SA nach Infektionen (Wildermuth *et al.*, 2002). NPR1 wird während der SA Akkumulation in den Kern transportiert und monomerisiert (Rochon *et al.*, 2006; Tada *et al.*, 2008). Diese Monomere interagieren nun direkt mit TGA Dimeren und heben die Inhibierung der späten SARlc auf, gleichzeitig wird eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren hervorgerufen (Johnson *et al.*, 2008). Späte, durch SA hervorgerufene Transkriptionsveränderungen beinhalten das hier untersuchte Gen *PR1* (Lebel *et al.*, 1998). Die Expression von *PR1* erfordert die Interaktion von vier TGA Faktoren und NPR1, mit unterschiedlichen Eigenschaften bzgl. deren aktivierenden oder inhibierenden Eigenschaften (Kesarwani *et al.*, 2007). Hierbei ist nicht die Bindung an Promotorstrukturen, sondern die Wechselwirkung zwischen den Faktoren SA abhängig (Rochon *et al.*, 2006). Ebenfalls an der Transkriptionsveränderung durch SA beteiligt sind WRKY Transkriptionsfaktoren, die abhängig von TGA und NPR1, eine Art Feedbackregulation der SA Antwort darstellen (Wang *et al.*, 2006; Vlot *et al.*, 2009). Man unterscheidet wie oben erwähnt verschiedene Stadien nach dem Zeitpunkt ihrer Aktivierung. Die späte, durch SA verursachte Transkriptionsveränderung benötigt große SA-Mengen, die durch die frühe Aktivierung und Feedback-loops erreicht wird (Tsuda *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Die Aktivierung der „systemic acquired resistance“ SAR, als letzter Teil der Immunantwort, benötigt SA, der ETI verursacht deren Akkumulation (Loake & Grant, 2007; Vlot *et al.*, 2008). Spezifische Chromatinmodifikationen sind ein zugrundeliegender Mechanismus der Genaktivität an den SARlc. Durch SA Zugabe und Infektion verändern sich Modifikationsmuster an den Histonen. 12-48 Stunden nach Infektionen werden vermehrt die Modifikationen H3Ac, H4Ac, H3K4me2 und H3K4me3 beobachtet (Mosher *et al.*, 2006; Butterbrodt *et al.*, 2006; Koorneef *et al.*, 2008). Diese Chromatinveränderungen dürften als epigenetisches Gedächtnis dienen, und dürften SUMOylierungsreaktionen beinhalten (SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER), die den gesamten Vorgang regulieren (van den Burg and Takken, 2009; Lyst *et al.*, 2007).

SA spielt eine Rolle im Zelltod. Mutanten mit veränderter Fähigkeit der Akkumulation von SA führen zu unterschiedlichen Ereignissen im Zelltod. Es ist sowohl ein vollständiges Verschwinden, eine Reduktion sowie kein Effekt zu beobachten, was den Schluss zulässt, dass SA eine Rolle im manchen, aber nicht allen Zelltodereignissen spielt (Lorrain *et al.*, 2003). Hohe SA Konzentrationen finden sich wie oben beschrieben am Ort der Infektion. Diese hohen Konzentrationen werden dann in weiterer Folge mit anderen Signalen zu zelltodstimulierenden Funktionen umgewandelt, dies wurde in der späten Phase erklärt. Niedrige SA Konzentrationen, durch den Export bedingt, könnten ein Überlebenssignal darstellen, MeSA ist am SAR beteiligt. Dieser so gewonnene Gradient ist dann demnach in der Lage, Zelltod in die vorgesehenen Grenzen zu weisen und eine Infektionsausbreitung zu unterbinden (Alvarez *et al.*, 2000). Es ist weiters eine Feedbackregulation zwischen SA-abhängiger ROS-Produktion und SA-Synthese durch die Wirkung von ROS naheliegend (Leon *et al.*, 1995).

NO löst in Zellkulturen Zelltod aus, wirkt hierbei synergistisch zu SA, um eine hypersensitive Reaktion (HR) beziehungsweise die Verteidigung zu aktivieren (Durner *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 2000). Die Ursache eines HR wird

hierbei als ein Ungleichgewicht von NO und Wasserstoffperoxidkonzentrationen angesehen (Delledonne *et al.*, 2001).

Auf diesem Niveau, der Aktivierung und der Antwort bedingt durch die Aktivierung von WRKY Faktoren, findet auch der Crosstalk zwischen den Hormonen den Jasmonsäuren (JA) und SA statt, die teilweise synergistische Wirkung auf WRKY Faktoren aufweisen, sich aber hauptsächlich gegenseitig ausschließen (Vlot *et al.*, 2009). Diverse andere ethylenabhängige Transkriptionsfaktoren spielen weitere Rollen in der Auslösung von HR. Sie sind SA abhängig, unterscheiden sich aber durch ihre Abhängigkeit von NPR1 (Eulgem *et al.*, 2005).

JA sind weitere Phytohormone. Sie wirken positiv auf Immunantworten, Reproduktion, und negativ auf Wachstum und Photosynthese ein (Katsir *et al.*, 2008a). JA werden aus Linolsäure in den Chloroplasten über mehrere Reaktionstufen gebildet. Wie SA ist eine Umsetzung in aktive und inaktive Formen die Fortsetzung der Reaktionskaskade. Aktive Formen führen zur Interaktion zwischen Proteinen, darunter *Coronatinsensitive1* COI1, und zum Abbau spezifischer Inhibitoren (Xie *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2002). COI1 interagiert nach JA-Gabe mit Komponenten des SCF Komplexes, einem proteolytischen Komplex, diese Interaktion führt zum Abbau von für die Expressionsinhibierung von JA-abhängigen Genen verantwortlichen Proteinen (Xu *et al.*, 2002; Devoto *et al.*, 2002; Lorenzo and Solano, 2005; Chini *et al.*, 2007; Thines *et al.*, 2007; Katsir *et al.*, 2008b). Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Abbau deren Inhibitoren führt zur Expression deren Inhibitoren (Thines *et al.*, 2007; Chini *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2007; Vanholme *et al.*, 2007; Chung *et al.*, 2008). Jasmonsäure und Ethylen kontrollieren Zelltod bedingt durch Stress und Entwicklung, Jasmonat ist hierbei ein negativer Regulator unter oxydativem Stress, wirkt aber unter Pilztoxineinfluss Fumosin B1, wie auch Ethylen, als positiv auf den Zelltod (Rao & Davis, 2001; Asai *et al.*, 2000).

Auxin ist während des Wachstums des Keims ein Signal für die Lage der Zelle im Keimling und gibt Informationen über äußere Verhältnisse wie Licht und Schwerkraft weiter (de Smet & Jurgens, 2007; Friml, 2003). Aux/IAA, Inhibitoren der Auxinantwort, binden Transkriptionsfaktoren, die *Auxin response factors* oder ARFs und verhindern so deren Aktivität. Die auxinregulierten Transkriptionsfaktoren werden ebenfalls konstitutiv inhibiert und erst durch Auxin aktiviert (Guilfoyle and Hagen, 2007).

Brassinosteroide (BR) sind wie Auxin an der Entwicklung beteiligt und aktivieren Transkriptionsfaktoren (Yin *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2002). Brassinosteroide sind zB an Differenzierungsereignissen in *Z. elegans* beteiligt, welche das autolytische Zelltodprogramm beinhalten (Fukuda *et al.*, 2001).. Es sind mehrere Kinasen und Phosphatasen bekannt, die Transkriptionsfaktoren regulieren. Phosphorylierungen und Phosphataseaktivitäten führen zu Veränderungen der „Antwort“-Komplexe, d.h. Inhibierung von Homodimeren und Bildung von Heterodimeren mit veränderten Eigenschaften, die in weiterer Folge zum Ausbleiben der Anbindung an

DNS-Strukturen führen (He *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2004; Vert and Chory, 2006 ; Gampala *et al.*, 2007; Ryu *et al.*, 2007). Eine BR-Gabe führt zur Hypophosphorylierung, eine Bindung an DNS-Strukturen, und Aktivierung von BR-induzierter Transkriptionsveränderung (He *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005.) Die Regulation dieser Komponenten beinhaltet den Abbau der agierenden Proteine. Dieser Abbau ist Abhängig von Phosphorylierungsmustern. Die Bindung von BR wird an und für sich der Membran ausgelöst, und führt zur Veränderung der Phosphorylierungsmuster, und verhindert so den Abbau der Proteine. BRI1, der Brassinoidbindende Rezeptor, besitzt eine extrazelluläre Domäne aus 25 LRR Domänen und einem 70 Aminosäure langem Einschub zwischen 21. und 22. LRR-Domäne, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Ser/Thr Kinase. Dieser Einschub ist für die spezifische Bindung von BR an BRI1 erforderlich. Neben dem Komplex BRI1-BAK1 existieren noch zwei weitere BRI1 homologe Rezeptoren, deren Funktion im BR Signalweg liegt (Yin *et al.*, 2002). Eine BR Bindung führt zu einer Phosphorylierungskaskade und konsequenterweise interagiert BRI1 mit SERK1 und BAK1 (Kinoshita *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2002; Nam & Li, 2002; Russinova *et al.*, 2004). Nach der Bindung von BR an BRI1 verändert BRI1 seine Affinitäten. Sein Inhibitor BKI1 (*BRI1 Kinase Inhibitor 1*) wird entlassen und BAK1 gebunden. Semi-Zwergenwuchs in BAK1 Mutanten ist BR-abhängig, nicht jedoch die Infektionsanfälligkeit durch Pilze und die erhöhte Zelltodrate (Kemmerling *et al.*, 2007). Der BAK1-BRI1 Komplex findet sich wie der FLS2-BAK1 Komplex neben der Membran auch in Endosomen, es ist aber unklar, ob er sich im Gegensatz zu FLS2-BAK1 konstitutiv endozytiert oder ähnlich wie FLS2-BAK1 erst nach Ligandenbindung internalisiert wird (Russinova *et al.*, 2004; Geldner & Robatzek, 2008; Kemmerling persönliches Gespräch). BAK1 dient also verschiedenen Perzeptionsereignissen als Signalvermittel, sowohl in der Immunantwort als auch in der Reaktion auf Brassinosteroide (Heese *et al.*, 2007).

Für die Morphogenese sind mehrere Hormone vonnöten, die sich in gegenseitiger Abhängigkeit von einander befinden (Nemhauser *et al.*, 2006; Nozue & Maloof, 2006). BR wirken mit Auxinen synergistisch bei der Steigerung der Zellelongation und zeigen bei Missregulation bzw. bei Mutationen, deren Synthese betreffend, Zwergenwuchs (Halliday 2004). Der synergistische Effekt resultiert aus den gemeinsamen frühen Target-Genen, hierbei werden Gene, die bei BR-Gabe verändert werden, durch ARFs mitreguliert (Goda *et al.*, 2002; Mussig *et al.*, 2002; Nemhauser *et al.*, 2004; Yin *et al.*, 2002, Goda *et al.*, 2004). Nicht nur die Koregulation der BR-abhängigen Gene durch Auxin wird beobachtet, es sind gleichzeitig Elemente bekannt, die auf beide Hormone ansprechen. Diese weisen DR5 auf, eine durch Auxin und BR ansprechbare ARF-Bindungsstellen ähnliche Bindungsstelle, deren volle Aktivität von beiden Hormonsignalwegen abhängt (Nemhauser *et al.*, 2004; Nakamura *et al.*, 2003). Eine Beeinflussung beider Signaltransduktionswege ist aber auch auf Protein Niveau gegeben, da Einzelkomponenten sich wechselseitig regulieren (Vert *et al.*, 2008).

Ethylen hingegen ist an Seneszenz und Zelltodereignissen in der Entwicklung, insbesondere der von Wurzeln bei Sauerstoffmangel, beteiligt (Orzaez & Granell, 1997; Drew *et al.*, 2000). Es aktiviert ebenso ROS in Verletzung imitierenden Mutanten (Young & Gallie, 2000).

Ein dichtes Netzwerk von Regulatoren ist also verantwortlich dafür, dass an der Membran, und im Zytoplasma ausgelöste Signale in den Nukleus und in den Nukleus der Nachbarzellen zu transportieren. Einführend erwähnt wurden Mechanismen zur Manipulation dieser Signale.

1.2.5. Endozytose, Exozytose und Sekretion im Rahmen der Immunantwort

Membranprozesse spielen in vielen biologischen Prozessen entscheidende Rollen. Die sind auch an der pflanzlichen Immunantwort beteiligt. Es wird Endozytose/Exozytose ebenso beobachtet wie Import und Export Prozesse durch Kanäle und Transporter.

Der FLS2-BAK1 Komplex ist erst dann in Endosomen aufzufinden, wenn der entsprechende Ligand, Flg22 gebunden wurde, wurde aber bereits beschrieben (Robatzek *et al.*, 2006). Andere Prozesse die die Membran betreffen folgen. *PMR4* kodiert die Callose Synthase, die für pathogeninduzierte Calloseeinlagerung verantwortlich ist. Calloseeinlagerungen dienen einerseits der schnellen Expansion während der Embryogenese, fehlen aber in adulten Zellwänden. Es ist bekannt, dass callosedefiziente Zellen Probleme mit der Zytokinese aufweisen. Sie zeichnen sich durch eine Vielzahl von Kernen pro Zelle aus (Thiele *et al.*, 2009). Callose wird auch nach Penetration der Pflanze durch Pathogene eingelagert. Bei Mutation von *PMR4* erhöht eigenartigerweise die Resistenz gegenüber einiger Pathogenen, sie zeigt Akkumulation von SA und insofern eine Aktivierung der SA-abhängigen Verteidigung (Nishimura *et al.*, 2003). Diese Calloseeinlagerungen verändern die Membran. *PEN1*, PEN steht für Penetration, kodiert ein plasmamembranständiges SNARE Protein. Es mediiert die Fusion von Vesikeln mit antimikrobiellem Inhalt zur Sekretion (Collins *et al.*, 2003). Ein verwandtes SNARE-Protein, *SYP132*, wurde in Tabak als wesentlich für die Resistenz gegenüber Pathogenen identifiziert (Kalde *et al.*, 2007). Spezifische *mildew resistance locus O* (MLO) Familienmitglieder inhibieren die *PEN1* abhängige Sekretion (Collins *et al.*, 2003 Assaad *et al.*, 2004). Bei Fehlen dieser Inhibitoren tritt eine Resistenz gegen echten Mehltau auf (Consonni *et al.*, 2006). Es ist also naheliegend, dass die Induktion der MLO, die die *PEN1* abhängige Sekretion inhibiert, durch den Pilz ausgelöst wird, was auf Koevolution von Pilz und Pflanze und damit auf den ETS/ETI Mechanismus hindeutet (Jones and Dangl, 2004). *PEN2* ist an der Synthese von Glucosinolate-derivaten Sekundärmetaboliten beteiligt (Bednarek *et al.*, 2009). Antifungale und antiherbivore Funktionen werden diesen zugeschrieben, wobei der Export dieser Sekundärmetaboliten mutmaßlich von einem ABC Transporter *PEN3*, nicht durch Aggregation, ausgeführt wird. Hinweise hierauf liefern Mutantenscreenings (Stein *et al.*, 2006). *PEN2* und *PEN3* werden durch *flg22* Behandlung induziert, was eine Rolle im PTI impliziert (Jones & Dangl, 2004). Bei *PEN1* und *PEN2/PEN3* handelt es sich also um unterschiedliche Sekretionswege (Lipka *et al.*, 2005). Nach der Penetration durch Pathogene werden *PEN*-Proteine und *PMR4* synthetisierte Callose an der Penetrationsstelle beobachtet (Meyer *et al.*, 2009) Die Lokalisation ist abhängig von mehreren zugrundeliegenden Mechanismen (Underwood & Somerville, 2008). Es ist zwar seit langem bekannt, dass Sekretion in der Immunreaktion eine wesentliche Rolle spielt, der genaue Mechanismus ist aber nicht bekannt (Van Loon & Van Kammen, 1970). Eine Erklärung hierfür ist die Notwendigkeit, die nun erhöhten Vesikeltransporte und die Sekretion der PR-Proteine besser koordinieren zu können, um auf erneute Infektionen schnellere Reaktionen zu

ermöglichen (Wang *et al.*, 2005). Wenn diese Systeme durch Mutationen ausfallen, ist keine angemessene Immunreaktion mehr möglich. Es werden weder PR-Gene sekretiert, noch ist die Resistenz der Mutante gegenüber bakteriellen Effektoren ausreichend hoch, um diese zu bekämpfen (Wang *et al.*, 2005).

2. 1.3. Spezielle Einführung

Einzelne Mutanten von Genen mit membranständigen Proteinprodukten, die im PTI eine wesentliche Rolle spielen, führen zu Zelltod. An und für sich würde das nicht weiter verwundern, da die Theorie des ETI/ETS Phänomens davon ausgeht, dass es sich um hierbei um potentielle Ziele von ETS Events handelt, die durch ein/bzw. mehrere R-Gene zu schützen sind. Jedoch gibt es für diese Proteine, namentlich BAK1, BKK1, BIR1 BIK1 und SCD1 wenn überhaupt, doch nur sehr kontrovers diskutierte sie ansprechende Effektorproteine, wie beispielweise AvrPto. Eine andere, wenn auch weit problematischere Erklärung könnte darin liegen, dass spezifische Interaktionen tatsächlich zelltodinhibierend wirken und der Zelltod, der in den Mutanten auftritt, nicht das Produkt eines isolierten R-Proteins ist, sondern quasi wie der tierische MHC Komplex Immunreaktionen und Überlebenssignale integriert. Es handelt sich bei dem Zelltodereignis dieser Mutanten um einen SA-abhängigen Mechanismus. Ein doppelter Mechanismus wäre hingegen eine eleganteste Lösung beider Probleme. Die R-Protein Variante oder die Frage nach dem „Was löst den Zelltod aus“? kontrolliert das Vorhandensein des Immunkomplexes und reagiert bei Ausbleiben des Überlebenssignals, der Frage „nach evolutionären Ursachen?“ als „Selbstmord“-Kontrolle. Mit dem letzten Satz nähern wir uns immer mehr dem eigentlichen Thema dieser Arbeit, welche die Frage nach spezifischen Interaktionspartnern von BAK1, BKK1 und BIR1 die Downstream von diesen eine Erklärung bereithalten könnte, wie putative Überlebens-/Zelltodsignale der Rezeptorkinasen an der Membran weitergegeben werden können und ob es tatsächlich einen Apparat von zytoplasmatischen Interaktoren gibt, die diese Funktion erfüllen. Neben der Funktion in PTI-Signaltransduktion interagieren BAK1, SERK1, SERK2 und BKK1 mit BIR1. *BIR1* kodiert eine membranlokalisierte RLK. Die Nullmutante *bir1-1* zeigt Ähnlichkeiten zu autoaktivierten R-Genen. Sie zeigt Zwergenwuchs, hohen SA Gehalt, sie exprimiert konstitutiv PR1 und zeigt in jedem Stadium Zelltod. Der Phänotyp dieser Mutante ist temperaturabhängig. Das Wachstum wird bei 28°C erhöht. Die *bir1-1* Mutation wird durch Deletion von PAD4 EDS1 und NDR1 aufgehoben (Gao *et al.*, 2009). BIR1 hat ebenfalls einen Effekt auf die MAPK4 nach der Behandlung mit *flg22*, das lässt vermuten dass dieses Proteinen als positiver Regulator von *flg22*-induzierten Immunantworten dient (Cécile Segonzac and Cyril Zipfel, 2011).

1.3.1. Regulation und Rolle von SNC1 Suppressor of npr1-1, Constitutive1

SNC1 ist ein TIR-NB LRR R-Protein (Zhang *et al.*, 2003). Die *gain of function* Mutation von SNC1 führt zu konstitutiver Aktivierung anderer R-Proteinen und Downstream Antworten, unabhängig von der Anwesenheit von Pathogenen. Dies drückt sich in der Akkumulierung von SA, konstitutiver Expression von PR-Genen und erhöhter Resistenz gegenüber Pathogenen aus (Li *et al.*, 2001). Die Regulation von SNC1 erfolgt über mehrere bekannte wie unbekannte Mechanismen. Es ist bekannt, dass die Chromatinstruktur durch *defect in DNA methylation1* DDM1 verändert wird,

das seinerseits durch MOS1 (*modifier of SNC1 1*) reguliert wird (Li, 2010). Es ist ebenfalls bekannt, dass SNC1 Autoaktivierung zeigt (Li *et al.*, 2004).

Die Mitglieder der P-Loop-NTPase-Domän-Superfamilie lassen sich durch deren Walker-A- und B-Motive kennzeichnen. Sie binden sowohl an die β - und γ -Phosphate von Nukleotridtriphosphaten als auch an Mg^{2+} -Ionen. Die Toll/Interleukin-1 Rezeptordomäne ist eine intrazelluläre Signaldomäne. Sie beinhaltet drei hochkonservierte Regionen und vermittelt Protein-Protein-Wechselwirkungen (Marchler-Bauer *et al.*, 2011).

In der vierten LRR Domäne liegt letztlich das für die Liganderkennung von R-Proteinen wichtige exponierte β -Faltblatt (Yi und Richards, 2009)

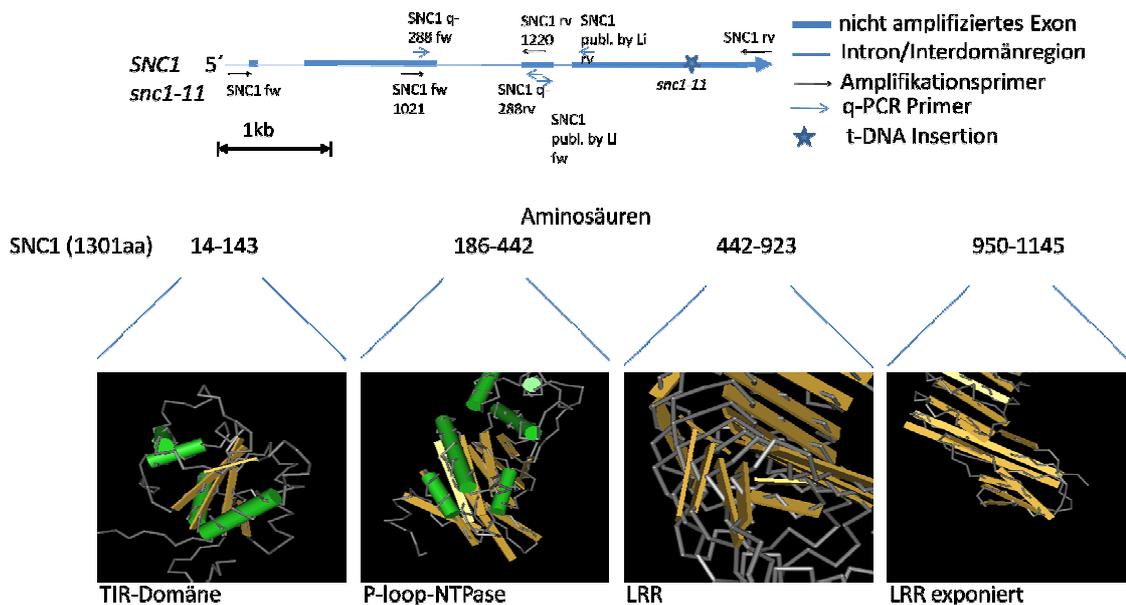


Abbildung 5 SNC1, ein ca. 1300 Aminosäure großes TIR-NB-R-Protein, verfügt über eine TIR und eine P-Loop-NTPase Domäne. *snc1-11* ist eine die Expression weitestgehend unterbindende T-DNS Insertion. Zur zwischen 974 und 1301 auftretenden „resistant to *p. syringae 6*, provisional“ Domäne gibt es keine Strukturdaten. Diese lassen sich aber als LRR Region darstellen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>).

Viele konstitutiv aktive R-Gen-Mutanten sind temperatursensitiv. Das Ausmaß dieser Sensitivität schwankt allerdings zwischen den R-Genen. *RPP4* ist ein zu *SNC1* hochhomologes und am Selben, nämlich dem *RPP5* Locus platziertes Gen. Dieser Locus ist mit *SNC1* koreguliert (Yi & Richards, 2007). Beide weisen ebenfalls dieselben Intron Exon Nummern auf (van der Biezen *et al.*, 2002). Insofern von Relevanz ist das *snc1-1*, die konstitutiv aktive Mutante von *SNC1*, bei 4-22°C zwar klein im Wuchs und die Immunantwort aktiv ist, jedoch Saatgut produziert, aber bei 28°C keine Wachstumsprobleme zeigt (Yang & Hua, 2004; Zhang *et al.*, 2003). Die konstitutiv aktive *RPP4*-Mutante ist unter 12°C lethal (Huang *et al.*, 2011). Diese E₅₅₂K Punktmutation, *snc1-1*, zeigt geänderte Eigenschaften bezüglich der Fähigkeit in den Nukleus zu gelangen. SNC1 ist abhängig von den *modifier of snc1 3* MOS3 und MOS6. MOS3 ist homolog zum Vertebraten *Nucleoporin 96*, und dem Hefe CNup145p, einem Teil des konservierten Nup107-Nup160

Kernporsubkomplexes, die sowohl Kernporenassemblierung als auch RNA Export als Funktion aufweisen (Vasu & Forbes, 2001; Walther et al, 2003). *MOS6* kodiert Importin $\alpha 3$, das wiederum an das NLS (*nuclear localisation signal*) des Zielprotein bindet und über *MOS3* importiert (Palma et al, 2005). Weiter unklar bleibt aber, ob durch *MOS3* und *MOS6* das autoaktivierte *snc1-1* importiert wird und so seine Funktion erlauben oder ob spezifische mRNAs exportiert werden, worauf Homologe von *MOS3* hindeuten, auf alle Fälle wird der *snc1-1* Phänotyp teilweise durch das Fehlen von *MOS3* und *MOS6* aufgehoben (Palma et al, 2005; Zhang & Li, 2005).

SNC1 ist aber von weiteren Teilen des Kernporenkomplexes *MOS7* (Modifier of *SNC1* 7) /Nup88 abhängig, bei deren Mutation eine Aufhebung des Phänotypen von *snc1-1* sichtbar wird (Wiermer et al., 2010). Da R-Gene oder R-ähnliche Gene dieselben Downstream-Komponenten verwenden, wie zB *EDS1* (Li et al., 2001), ist die Temperatursensitivität der R-Proteine auf Eigenschaften der R-Proteine selbst zurückzuführen, nicht aber abhängig von anderen Faktoren (Huang et al., 2011; Zhu et al., 2010).

Mutationen im Tetratrivopeptidwiederholungen enthaltenden Protein *SRFR1* führt zur Expression von *SNC1* (Kim et al., 2010). *SRFR1* ist ein negativer Regulator von AvrRPS4 induzierter Immunität in *rps6* Mutanten (Kwon et al., 2009). Gleichzeitig erhöhen Mutationen in *SRFR1* die HopA1 induzierte Immunität in *rps6* Mutanten (Kim, 2009).

Interaktionen zwischen *SRFR1* mit *RPS4* und *SNC1* finden in der mikrosomalen Fraktion statt. *RPS4* ist ein *EDS1* abhängiges TIR-NB-LRR R-Protein (Gassmann et al., 1999; Aarts et al., 1998). *SNC1* ist ebenfalls *EDS1/PAD4* abhängig (Zhang et al., 2003). Der Anteil an kernlokalisiertem *SNC1*, *SRFR1* und *RPS4* ist normalerweise gering (Wirthmüller et al., 2007), wird aber insbesondere bei der konstitutiv aktiven Mutante *snc1-1* extrem hoch. Dieser Anteil bestimmt die Aktivität des Proteins *SNC1* (Zhou et al., 2010). Diese Komplexbildung könnte die Translokation in den Nukleus unterbinden und dadurch beide R-Proteine inhibieren (Kim et al., 2010).

Weiters existiert eine Regulation von *SNC1* durch Copine. So ist bekannt das *BONZAI1* (*BON1*), *BONZAI* assoziiertes Protein (*BAP*) 1 und sein Homolog *BAP2* als generelle Inhibitoren von Zelltod und Immunantwort dienen (Yang & Hua 2004; Yang et al., 2006a; Yang et al., 2007).

Für die Funktion von *SNC1* wurde 2010 ein Modell von Zhu erstellt. So erkennt *SNC1* nach Pathogenerkennung das *TPR1* (topless related1), das seinerseits *DND1* und *DND2* an der Expression hindert. *DND1* und *DND2* sind demnach Repressoren der Immunantwort, die erst durch die Bildung des aktiven Komplexes *SNC1-TPR1* abgeschaltet werden. Insofern ist es nicht die Aktivierung der Genexpression, sondern das Gegenteil, die Verhinderung der Expression, die die Aktivität der TIR-NB-LRR-R Proteine ausmacht (Zhu et al., 2010). *SNC1* ist auch Teil der Reaktion auf Stickstoffdioxid. Nach der Gabe von Stickstoffdioxid verändert sich in *snc1* Mutanten das für den Redoxstatus so wichtige Verhältnis von Gluthation zu Gluthationdisulfat extrem stark, was in weiterer Folge eine höhere Antioxidanzkapazität für die ROS bietet. (Schaffer & Buettner 2001, Xu et al., 2010). Diese Effekte sind ähnlich denen von Mutanten deren SA-response über eine Überfunktion verfügt.

1.3.2. Funktion und Rolle von Copinen

Copine sind über eine Vielzahl von Eukarioten hochkonservierte, kalziumabhängige phospholipidbindende Proteine. Mehrere Copinhomologe existieren sowohl in *Paramecium*, *Arabidopsis*, *C. elegans*, Mäusen, und Menschen. Charakteristisch sind zwei, oder mehr N-terminale C2 Domänen und eine C-terminale A Domäne. Diese A Domäne ist ähnlich der Sequenz der von Willebrand A Domäne (vWA) in Integrinen. Der weitere Verlauf der Domänenstruktur nach der A Domäne ist variabel (Creutz *et al.*, 1998).

Neben den klassischen Copinen gibt es auch Proteine, deren Struktur über nur eine oder aber mehrere C2 Domänen verfügt. Die Anzahl der Domänen korreliert hierbei mit der Funktion. So finden sich einzelne C2 Domänen in Proteinen mit Funktion in Signaltransduktion, mehrere C2 Domänen deuten hingegen auf eine Funktion im Membranverkehr hin (Jimenez *et al.*, 2003; Nalefski *et al.*, 1996). Copine binden, analog zu anderen C2 Domänen aufweisenden Proteinen, in einer Ca^{2+} abhängigen Art und Weise an Phospholipide (Creutz, *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 1999; Hua *et al.*, 2001; Tomsig *et al.*, 2000).

BONZAI1 (BON1) ist ein Copin mit zwei C2 Domänen. Die C2A und die C2B Domäne sind N-terminal. Diese beiden C2 Domänen sind nicht funktionell redundant (Li *et al.*, 2010). Die Nullmutante *bon1-1* zeigt eine feuchtigkeit- und temperaturabhängige Neigung zur HR, konstitutiver PR-Gene Expression und erhöhter Resistenz gegenüber Bakterien und Oomycten (Jambunathan *et al.*, 2001). Diese sind bei 22°C kleinwüchsig, und können weder durch Hormongaben noch durch Mutationen in Hormonsignalwegen auf Wildtyperscheinung gebracht werden, zeigen aber auch keine Veränderungen in der Fettsäurezusammensetzung (Hua *et al.*, 2001).

Die Funktion von BONZAI (BON1) ist abhängig von seiner Membranlokalisierung. Diese wird durch N-terminale Myristoylierung hergestellt. Die Bindung an Phospholipide durch eine der C2 Domänen reicht nicht aus. Ebenfalls wesentlich für die Funktion BON1s ist die Interaktion mit BAP1, so dass Mutationen, die diese Wechselwirkung stören, die Funktion aufheben (Li *et al.*, 2010). In vitro Experimente zeigen, dass unter Anwesenheit von Ca^{2+} beide C2 Domänen in der Lage sind, Lipidvesikelaggregation zu stimulieren (Hua *et al.*, 2001).

Copine sind Proteine mit zwei C2 Domänen und einer vWA (von Willebrandfaktor A) Domäne, einer über Eukaryonten konservierte Proteinfamilie, die sich ausschließlich in Hefen zurückentwickelte. Die Bindung an die Membran wird durch die Myristoylierung hergestellt. Die Bindung an Phospholipide durch eine der C2-Domänen reicht nicht aus. Diese C2-Domänen sind nicht äquivalent, sie haben offenbar unterschiedliche Funktionen. Die Funktionsweise von C2 Domänen wurde in Synaptogaminen, Homologen von Copinen mit zwei C2 Domänen charakterisiert. Die C2A Domäne ist für die Fusion von synaptischen Vesikeln verantwortlich, sie stellt Ca^{2+} -abhängig

SNARE Interaktionen her (Lynch *et al.*, 2007). Es binden in Gegenwart von Ca^{2+} an Phosphatidylinositol Bisphosphate (PIP2) durch die C2B, in Abwesenheit von Ca^{2+} an Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-Triphosphate (PIP3). Die C2B Domäne reguliert ebenfalls den Recyclingstep von synaptischen Vesikeln. In-vitro-Experimente zeigen, dass unter Anwesenheit von Ca^{2+} beide C2-Domänen in der Lage sind, Lipidvesikelaggregation zu stimulieren-jedoch sind sie nicht äquivalent-dh. für eine Funktion in vivo sind beide Domänen notwendig, was auf ähnliche Eigenschaften wie die der Synaptogamine hindeutet (Hua *et al.*, 2001) BON1s Interaktion mit BAP1 wird durch die VWA Domäne hergestellt, sie ist ebenfalls essentiell für die Funktion.(Li *et al.*, 2010) Die von Willebrand-factor-type-A-Domäne, eine ca. 200 Aminosäuren lange Sequenz, fand sich erstmalig im von Willebrand-factor a. Diese Domäne ist wie die C2 Domänen über Eukaryonten konserviert und ist beteiligt in Zell-Migration, Zell-Differentiation , Adhäsion, Signaltransduktion, Membranformation und Immunantwort (Whittaker & Hynes, 2002) Die vWA-Domäne baut Protein-Proteinwechselwirkungen auf, eine Kinasefunktion ist strittig (Hua *et al.*, 2001)

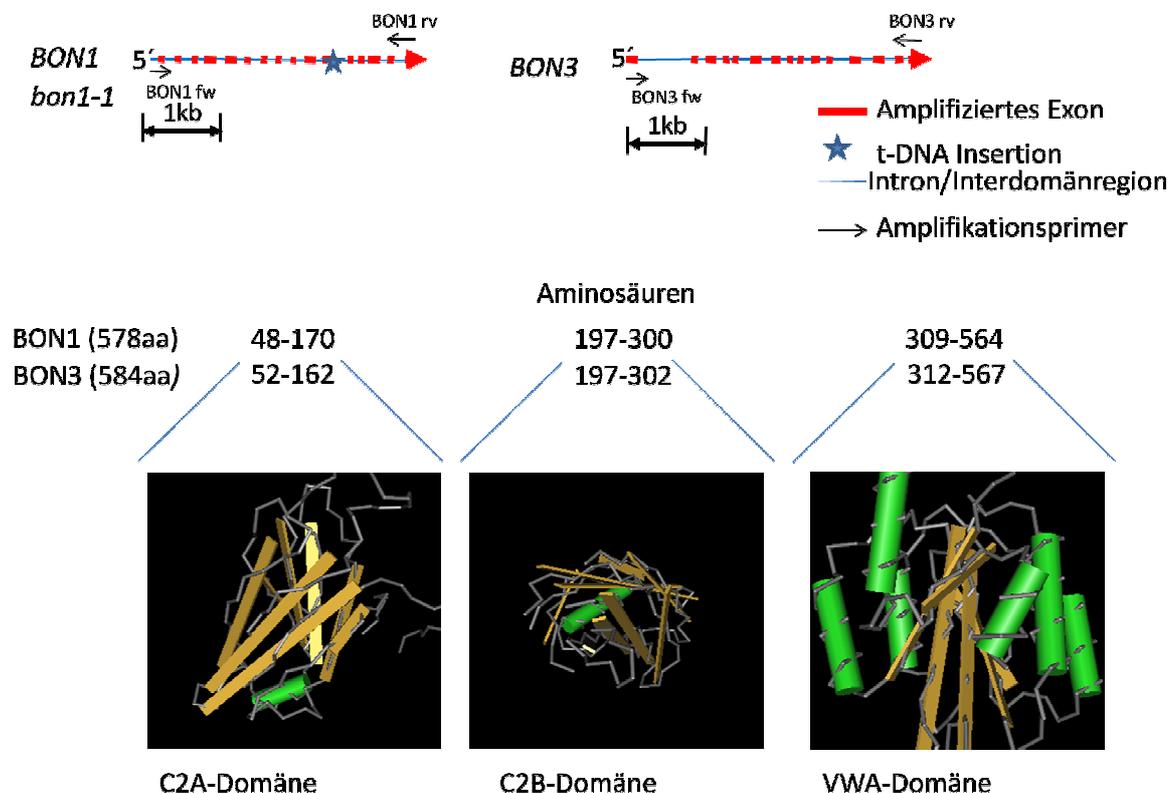


Abbildung 6 Copine BON1, ein 600 aa großes Copine, zeigt die für Copine klassischen Strukturen. Einerseits Ca^{2+} abhängige Phospholipidbindungsstellen, den C2-Domänen, andererseits eine Von Willebrand A Domäne, die Protein-Protein Wechselwirkung erlaubt. Die ebenfalls für die Proteinfunktion notwendige N-Terminale Myristoylierung erlaubt, Membranassoziation. *bon1-1* ist eine T-DNS Insertion, die die *bon1-1* Funktion unterbricht. Der Blick in die C2B Domäne zeigt die Ca^{2+} bindende Furche (Marchler-Bauer A *et al.*, 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>) C2 Domän Strukturen entsprechen denen von Synaptotagmin 4, die vWA Struktur der von von Willebrand Faktor.

BON1s Funktion könnte im Aufrechterhalten der Spezifität des Ca^{2+} Signals liegen. Es könnte so die Aktivierung von Abwehrmechanismen in SNC1 beinhaltenden Pflanzen verhindern, wenn ein Ca^{2+} Signal nicht aus Pathogenattacken herrührt (Lee *et al.*, 2008). Ca^{2+} Flüsse aus niedrigen Temperaturen oder niedriger Feuchtigkeit könnten so von jenen unterschieden werden, die aus Pathogenerkennung herrühren (Lee *et al.*, 2008).

1.3.3. Funktion und Rolle von BON1 assoziierte Proteine (BAP)

Die VWA Domäne von Copinen, zB. BON1, haben kanonische Kinase Motive. Obwohl eine Kinaseaktivität im menschlichen Copin 3 beobachtet wurde, ist es noch strittig, ob Copine als Familie tatsächlich über diese Eigenschaften verfügen. BON1 könnte keine Kinasefunktion besitzen, da bei Mutation des für die katalytischen Eigenschaften notwendigen Lys391 keine Veränderung der Funktion zu bemerken ist (Li *et al.*, 2010). BON1s VWA scheint auf die Herstellung von Protein-Protein-Wechselwirkungen beschränkt. Insbesondere die Interaktion mit BAP1 und BAP2 sind hier hervorzuheben. BAP1 besteht aus 191 Aminosäuren, und besitzt eine C2 SRC2 ähnlichen Domäne. Die C-Terminale Domäne BAP1s ist zu 54% ident mit SNC1. Diese Domäne ist mit keinem anderen Motiv verwandt (Hua *et al.*, 2001). Weder BAP1 noch BAP2 besitzen Introns. Beide verfügen nur über eine einzelne C2 - SRC2 ähnliche Domäne (*Soybean genes Regulated by Cold2*), was darauf hindeutet, dass sie für die Signaltransduktion eine Rolle spielen (Jimenez *et al.*, 2003; Nalefski *et al.*, 1996).

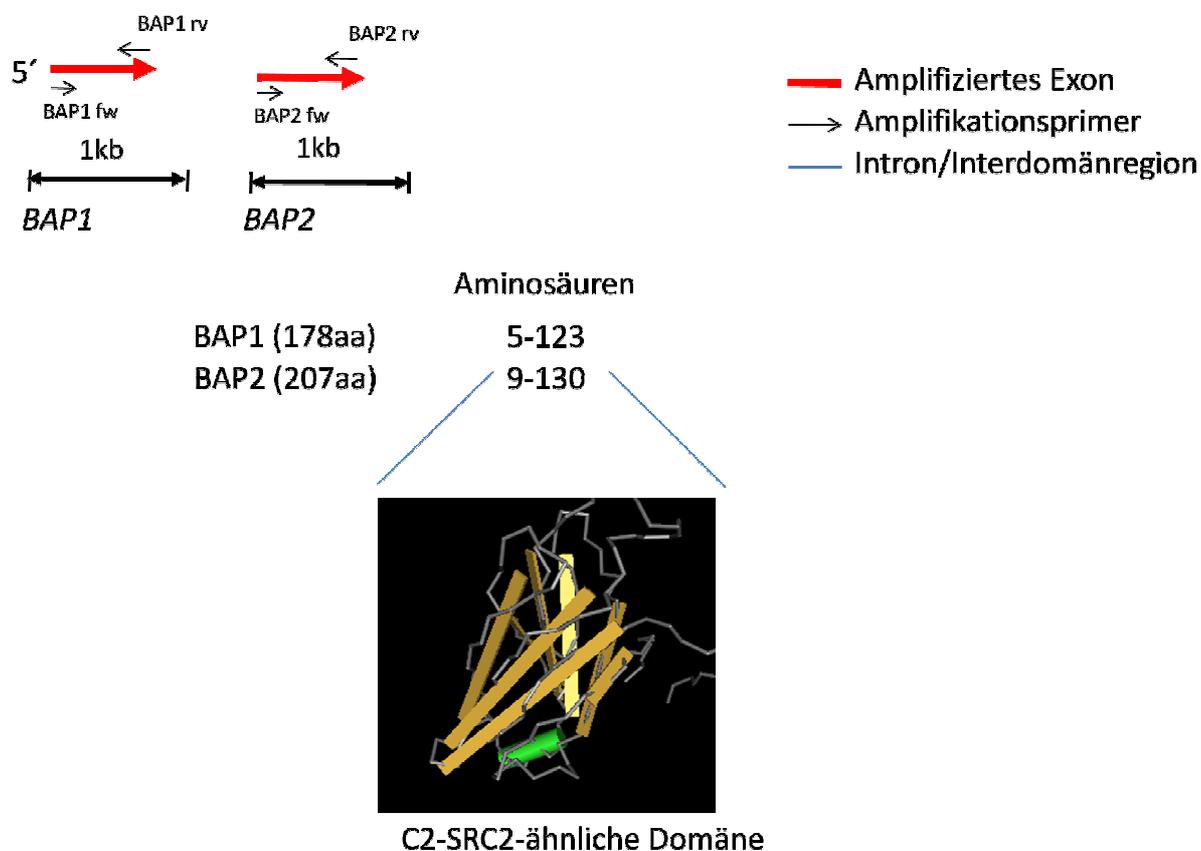


Abbildung 7 Das kleinere BAP1 wie auch BAP2, mit knapp 200 aa, verfügen über eine C2-SRC2 ähnliche Domäne, und scheinen Protein-Protein-Wechselwirkung zu vermitteln. An BAP1 C-Terminus existiert eine SNC1 ähnliche, aber strukturell sonst nicht zuordenbare Domäne. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>)

Die Rolle BAP1 und seinem Homolog BAP2 erscheint nicht vollständig redundant. Die Phänotypen der BAP1, verglichen mit den BAP2 Nullmutanten, scheinen unterschiedlich. *bap1* zeigt eine konstitutiv aktive Immunabwehr, mit allen Folgen, wohingegen *bap2* ausschließlich über einen beschleunigte HR gegenüber avirulenten *Pseudomonas* verfügt. Die Doppelmutante ist aber lethal (Yang et Al, 2007).

1.4. Ziel dieser Arbeit

bak1 Mutanten zeigen einen schwachen Zelltodphänotypen. Dieser ist SA abhängig, und in NahG –Linien unterdrückt (He *et al.*, 2007). In *Alternaria brassicicola* Infektionsstudien zeigen die *bak1* Mutanten eine Ausdehnung der Läsionen (Kemmerling *et al.*, 2007). Weitere RLK sind mit BAK1 assoziiert. Da die bisherige Funktion von BAK1 durch Interaktionen mit anderen RLKs bestimmt wurde, und Zelltodmutanten in diesen Interaktoren identifiziert wurden ist es möglich dass es sich bei diesen RLKs um für den Phänotypen erforderliche Proteine handelt. Insbesondere BIR1 ist ein solches Protein, aber auch ein weiteres Protein könnte eine Rolle in der Zelltodregulation spielen. Der zu Grunde liegende Mechanismus ist jedoch unklar. Die Wahl potentieller Interaktoren werden aufgrund von Ähnlichkeiten in Bezug auf *bak1/bkk1* Doppelmутanten und den Einzelmutanten, der ähnlichen Lokalisierung, der Temperatursensitivität und der Art der R-Genaktivität gewählt. Die Funktionen von BAK1 in BR Signal, Signaltransduktion nach Bindung von Liganden im Rahmen des PTI und BR-unabhängigen Zelltod-Signalen sind mit Korezeptoren verknüpft. Mutanten dieser Korezeptoren zeigen aber andere Phänotypen, wie zB. die *bri1* Mutanten. Sie zeigen verlängerte Lebensspannen, dunkelgrüne Phänotypen und niedrigere Expression von Seneszenz-Genen. In Summe liegt also der Schluss nahe, dass es sich hier um einen eigenständigen Apparat handeln muss, sodass es spezifischer Interaktoren bedarf, um eine korrekte Signalübertragung zu gewährleisten (He *et al.*, 2007). Es ist vernachlässigbar, ob die Endozytose von BAK1 mit FLS2 anders funktioniert als mit BRI1. Es ist nur von entscheidender Bedeutung, dass Vesikel gebildet werden, nachdem eine Kinase ihre Funktion erfüllt.

Die Downstreamkomponenten werden aus folgendem Grund gewählt: Sie regulieren SNC1 über einen unbekanntem Mechanismus und sind entgegen der anderen *modifier of SNC1*(MOS) -Proteine membranlokalisiert. SNC1 ist haplotypspezifisch und fehlt in *Ws-0*, nicht aber in *Col-0* (Yang *et al.*, 2004). Der Zelltod in den RLK Kandidatenmutanten ist ebenfalls unterschiedlich zwischen diesen genetischen Hintergründen. Mutanten der hypothetischen Downstreamkomponenten *bap1*, *bap2*, *bon1* und *bon3* zeigen phänotypische Ähnlichkeiten mit *bak1*. Sie regulieren TIR-NB-LRR (SNC1) und durch SNC1 wird die Expression von CC-NB-LRR Proteinen beeinflusst, gleichzeitig beeinflussen MAPK-Phosphatasen diese Prozesse, die in weiterer Folge wiederum CC-NB-LRR Proteine betreffen (Bartels *et al.*, 2009). Der *bak1* Phänotyp weist auf die Abhängigkeit von CC-NB-LRR und TIR- R-Proteinen hin. Eine weitere Bedeutung hat die Ähnlichkeit der Phänotypen in Bezug auf Temperaturabhängigkeit des Zelltods, dieser ist bei 28°C bei beiden aufgehoben. Das Ausbleiben von Zelltod in *Ws-0* ist nur ein schwaches Argument, da es zwar darauf basiert, dass *SNC1* in *Ws-0* fehlt, aber gleichzeitig fehlt in diesem genetischen Hintergrund auch *FLS2*. Ein Nachweis von Interaktionen zwischen BAK1 und Mitgliedern dieser Gruppe könnte Hinweise auf den Signalweg liefern, über den BAK1 Zelltodprozesse reguliert.

Eine direkte Interaktion mit SNC1 ist eher unwahrscheinlich, da die Interaktion mit einer membranassoziierten Komponente nicht unbedingt den Ausschlag für seine Aktivität gibt. Eine Bindung an der Membran, nicht aber an die Membran, ist zwar nachgewiesen, SNC1 interagiert mit SRRF1, jedoch ist kein Link zu den tatsächlich mit den membraninsetierten Proteinen bekannt. Es ist bekannt das inaktives SNC1 an der Membran lokalisiert ist. Diese

Lokalisierung könnte zu der Möglichkeit einer direkten Interaktion mit RLK führen. Jedoch gibt es Gründe anzunehmen dass diese Interaktion nicht direkter Natur ist. Die membranassoziierten Proteine BON1 interagieren mit BAP1. BAP1 wird erst durch diese Bindung an der Membran zu einem zelltodinhibierenden Faktor. SNC1 und BAP1 weisen Homologie auf, das könnte ein gemeinsames Target impliziert. Aber erst die Freisetzung BAP1, gezeigt durch Domänenwapexperimente, Deletion von Lipidmodifikation, Mutationen in Kalziumbindenden Domänen und Expression der vWA (in *bon1* Hintergrund) von BON1, führt zu SNC1 Aktivierung, d.h. zu Zelltod. Es scheint hier also so zu sein, dass ein Abstand von der Membran notwendig ist um SNC1 zu aktivieren. Aufgrund der nicht stattfindenden Interaktionen BAP/BON-SNC1 ist anzunehmen, dass hier Verdrängung, nicht aber Komplexierung eine Rolle spielen, und diese Verdrängung nicht an der Membran von statten geht. Die Kernfrage muss also nicht lauten ist SNC1 an einem hypothetischen Membranständigen Komplex beteiligt, sondern, ist BAK1 in der Lage Phosphorylierung die zur Bindung von BAP1 an BON1 benötigt werden zu verursachen? Diese Frage lässt sich weiter begründen, mit den Homologien der Proteine zu anderen Copinen, und Copinähnlichen Proteinen. BON1 ist Kinasedefekt, besitzt zwei C2-Domänen, dies deutet also auf Funktionen in Vesikelbildung hin. Allgemein ist die VWA Domäne, jene Kinase die Defekt ist, an Komplexbildung beteiligt. Eine Kinase an der Membran könnte, was wiederum spekulativ ist, die Rolle der Kinase übernommen haben. Es gibt keinen Grund zu Glauben das SNC1 von BAK1 direkt beeinflusst wird. Es gibt jeden Grund zu glauben dass eine Kinase, die Endozytiert wird, deren Wirkung aber gleichzeitig letztlich für Vesikel und Sekretionsfunktion verantwortlich ist Proteine bindet die als einzige konservierte Funktion ihre C2 Domänen, sprich Phospholipidbindung, und also aufgrund von Homologien Vesikelbildung hervorrufen kann, aufweist. Es ist nicht die Membranlokalisierung SNC1s die hier eine Rolle spielen wird, sondern ausschließlich die Kernlokalisierung, die letztlich zu einem Phänotypen führt, der in Folge zur Erhärtung des Verdachts benutzt werden kann. Eine hypothetische Interaktion hätte aber weitere Modelle zur Folge. BON1/3 wird, aufgrund seiner Homologien, als regulatorischer Schalter zwischen Kalziumsignalen verschiedener Ereignisse betrachtet. BAK1 Aktivierung führt zu Aktivierung von Kalziumsignaltransduktion, bzw. erst den Einfluss von Kalziumionen. Diese Kalziumsignale sind in ihrer Qualität aber unterschiedlich zu Kalziumsignalen aus abiotischen Stresssignalen. Die Wirkung unterscheidet sich ebenfalls. SNC1 als R-Gen bewacht scheinbar in irgendeiner Art und Weise BON1. Es erscheint daher eine lohnenswerte Spekulation dass die beobachteten Phänomene zwar unabhängig von PTI existent sind, und sich respektive auch nicht durch BR Gabe inhibieren lassen, aber durch die Existenz eines gemeinsamen Mechanismus erklären lassen, der durch die Interaktion von BAK1/BON/BAP beschrieben werden kann. Die BR Gabe kann dann nicht retten wenn die Endozytose von FLS2 und BRI1/BAK1 Prozessen aufgrund dieser BON/BAP/BAK1 Interaktion auftritt und respektive das in irgendeiner Form an SNC1/SRFR1/RPS4 weitergegeben wird. Eine derartige Spekulation wird hier nicht bewiesen, das Gedankenspiel kann aber als Argument dienen, um bei etwaiger Interaktion von BAK1 mit BON1, BON3, BAP1, BAP2 darauf hinzuweisen dass BAK1 ein Knotenpunkt der Interaktion ist, und insofern durch ETI Events geschützt werden wird. Das heißt dass diese Spekulation in irgendeiner Form das Vorhandensein von Phosphorylierungen an BONs und BAPs impliziert, und überraschenderweise ist BON1 und BON3 kinase-inaktiv, sodass Phosphorylierungen nur durch andere Proteine vorgenommen werden könnten. Da weder *fls2*, noch *bri1* Mutanten einen derartigen Zelltod Phänotypen aufweisen, könnte das Vorhandensein eines Membranständigen Komplexes mit Pufferfunktion, vielleicht einer mit BAK1 interagierenden RLK, die den

BON/BAP/BAK1 Komplex in irgendeiner Form reguliert, anzunehmen. Aufgrund der bisher bekannten Mechanismen des Proteins BAK1 ist es naheliegend, dass diese Funktion aufgrund von Heterodimerisierung mit anderen Membranproteinen zustande kommt. Es sind einige Kandidatenproteine bekannt, deren Interaktion mit BAK1 gezeigt und deren Phänotyp in das Bild einer Zelltodmutante passen könnte. Beide RLK-Kandidaten wurden als Interaktoren von BAK1 gezeigt, beide zeigen ähnliche Phänotypen in Knockoutversuchen, sind also temperaturabhängig in ihrem Zelltod, zeigen erhöhte SA-Menge, zeigen konstitutive PR-Genexpression, sind phänotypisch in Ws-0 anders als in Col-0 und sind somit tatsächlich ähnlich dem snc1-1 Phänotypen. Fassen wir also kurz zusammen. Die Suche nach einer hypothetischen BAK1/BAK1-Interaktor-RLK/BON/BAP –Interaktion ist einerseits begründet aufgrund ähnlicher Phänotypen. Die Suche basiert aber auch auf den ähnlichen Funktionen, der Homologen die sie erfüllen müssen, oder verursachen, sodass, mit Respekt auf eine rein menschliche Betrachtung, eine evolutionäre Logik nicht vorausgesetzt, diese Proteine eine sinnvolle Anordnung ergeben können, um Signaltransduktion, Endozytose, und Regulation durchzuführen.

Es ist nunmehr konkret zu definieren in welche Richtung diese Versuche gehen werden. Einerseits wird mittels in Silicon Analyse ein erster Eindruck der möglichen Interaktionen vermittelt werden. Eine Analyse der Expressionsmuster sollten nun zeigen, dass die Grundlage jeder in vivo Interaktion, die Expression beider Proteine an einem zeitlichen und räumlichen Punkt, erfüllt ist. Weitere Interaktionsstudien werden folgen die zeigen könnten dass eine Koregulation zwischen den Kandidaten in Stresssituationen vorliegt. Dieser Eindruck wird im Anschluss mit Y2H Interaktionsanalysen weiter zu begründen sein. Vergleiche zwischen Mutanten werden im Abschluss die Situation in Stresssituationen durch *Alternaria brassicicola* Infektionsstudien beschreiben und ebenfalls vergleichend werden Downstreamtargets analysieren mittels q-PCR analysiert. Somit werden Eindrücke gewonnen die den Verdacht erhärten, oder widerlegen werden. Die Verwendung zweier Temperaturen in den Vergleichsstudien dient dem Vergleich zwischen Mutanten mit und ohne aktivem SNC1. Wie bereits oben erklärt ist SNC1 bei 28°C inaktiv, die 28°C Versuche sollten so die Situation ohne Downstreamsignal zeigen.

Material und Methoden

2.1. Materialien

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. Es wurde, wenn nicht anders angegeben, durch eine MILLI-Q-Apparatur (Direct-QTM Tap-Fed Water Systems, Millipore, Schwalbach) filtriertes Wasser, das nach Autoklavieren als H2O_{dd} bezeichnet wurde, verwendet.

2.1.2. Nährmedien

Nach Abkühlung auf 60 °C wurde den Medien, gemäß Tabelle 1, die für die Selektion erforderlichen Antibiotika in der entsprechenden Konzentration zugegeben. In Tabelle 2 sind die verwendeten Nährmedien aufgelistet. Es wurden entweder flüssige Nährmedien eingesetzt oder aber zu den Bakterien- und Pilzmedien 15 g/l Bacto-Agar (Difco Lab) hinzugefügt.

Tabelle 1 Verwendete Antibiotika und Endkonzentrationen

Antibiotikazusätze	zu	Endkonzentration
Selektionsmedien		
Carbenicillin		50 µg/µl
Cycloheximid		50 µg/µl
Kanamycin		50 µg/µl
Rifampicin		50 µg/µl (aus 25 mg/ml in Methanol)
Spectinomycin		100 µg/µl

2.1.3. Verwendete Plasmide

In den folgenden Tabellen sind alle verwendeten Vektoren mit ihren wichtigsten Eigenschaften aufgelistet.

Tabelle 2 Verwendete Donorplasmide

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung	Hersteller
pCR8/GW/TOPO®	f1 ori pMB1 ori lacZα MCS M13 T7 Promotor KanR AmpR	PCR-Produkt Klonierungsvektor mit Topoisomerase zur beschleunigten Ligation	Invitrogen
pDONR207®	rrnB T2 transcription termination sequence, rrnB T1 transcription termination sequence, attP1, ccdB gene, Chloramphenicol resistance gene, attP2, Gentamycin resistance, pUC Ori	PCR-Produkt Klonierungsvektor	Invitrogen

Tabelle 3 Destinationsvektoreigenschaften

Plasmide	Eigenschaften	Verwendung	Hersteller
pDEST 15®	attR1, attL2 site, T7 promoter, RBS, Initiation ATG, GST tag, Chloramphenicol resistance gene (CmR), ccdB gene, T7 transcription termination region, bla promoter, Ampicillin (bla) resistance gene, pBR322 origin, ROP ORF	Destinationsvektor mit n-Term GST	Invitrogen
pDEST 24®	attR1, attL2 site, T7 promoter, RBS, Initiation ATG, GST tag, Chloramphenicol resistance gene (CmR), ccdB gene, T7 transcription termination region, bla promoter, Ampicillin (bla) resistance gene, pBR322 origin, ROP ORF	Destinationsvektor mit c-Term GST	Invitrogen
pDEST 42®	attR1, attL2 site, T7 promoter, RBS, Initiation ATG, V5-Epitoptag, 6x His Tag, Chloramphenicol resistance gene (CmR), ccdB gene, T7 transcription termination region, bla promoter, Ampicillin (bla) resistance gene, pBR322 origin, ROP ORF	Destinationsvektor zur Durchführung des Kinaseinteraktionsversuchs	Invitrogen
pGADT7-GW	attR1, attL2 site, GAL-AD, HA-Tag, LEU2, pUC ORI, 2µ ORI, AmpR	Destinationsvektor zur Durchführung des Y2H	
pGBKT7-GW	attR1, attL2 site, GAL-BD, HA-Tag, LEU2, pUC ORI, 2µ ORI, KanR, TRP1,	Destinationsvektor zur Durchführung des Y2H	

Tabelle 4 Eigenschaften der Entryplasmide zur Nutzung des Multisitegateway-System, laut Herstellerinformation

Vektor	Eigenschaften	Verwendung	Hersteller
pK7m34-GW	attR3, attR4 site, Kan-Resistenz, ccdB,t35S	Destinationsvektor zur Durchführung des Split YFP	VIB
pEN-L4-2-R1	attL4, attR1-site, pCANN 35S, Kan-Resistenz,	35S Promotor zur Expression des Split-YFP Konstrukts	VIB
pEN-R2-cGFP-L3	attR2, attL3-site, te-GFP, Kan-Resistenz	c-terminaler YFP Abschnitt zum Split-YFP Versuch	VIB
pEN-R2-nGFP-L3	attR2, attL3-site, he-GFP, Kan-Resistenz	c-terminaler YFP Abschnitt zum Split-YFP Versuch	VIB

3. 2.2. Anzuchtbedingungen

2.2.1. Anzucht von *Escherichia coli*

Die *E.coli*-Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, 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 Konzentratione (Tab. 1) zugegeben.

2.2.2. Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens des Stammes C58C1 wurde auf LB-Agar oder in LB-Medium mit Rifampicin, Carbenicillin 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.

2.2.3. Anzucht von *Alternaria brassicicola*

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

2.2.4. Anzucht der Versuchspflanzen

Die Samen der Versuchspflanzen wurden auf dampfsterilisierter GS90-Erde (Gebr. Patzer), die zuvor mit Vermikulit 1:1 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 Kurztagsbedingungen wurden die Pflanzen einem 8 h Licht- (150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$) /16 h Dunkel-Rhythmus ausgesetzt, unter Langtagsbedingungen waren es 16 h Licht und 8 h Dunkelheit. Die Temperatur betrug in allen Fällen 22 °C und die Luftfeuchte lag bei 40-60%

4. 2.3. Methoden

2.3.1. Polymerasekettenreaktion - PCR

2.3.1.1. Präparative PCR

Das Gemisch für die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-Reaktionen bestand, sofern nicht anders angegeben, aus 0,5 µM 5'- und 3'-Primern (MWG), 0,125 mM dNTP Gemisch (Biomaster), 1x Taq-Polymerase Puffer (Biomaster), 1 µl genomischer DNA oder cDNA aufgefüllt mit H₂O auf 19,5 µl und 0,5 µl (0,05 U/µl) Taq-Polymerase (Biomaster). Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Allgemeinen mit folgendem Programm:

94 °C für 2 min; 20-40 x: 94 °C für 15 sec., Tanneal für 30 sec., 72 °C für 1 min pro kb; 72 °C für 10 min. und 4 °C für ∞.

Bei Verwendung von Pfu-Polymerase verdoppelte sich die Synthesezeit auf 2 min pro kb.

Die Reaktionen wurden mit dem Gerät PTC-200 der Firma MJ Research (Waltham, USA) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Anhang in Tabelle 7.1 aufgelistet.

2.3.1.2. q-PCR

Die q-PCR Experimente werden sämtlich auf Biorad IQ5 durchgeführt. Hierbei wird auf 96 well-plates zurückgegriffen. Das Standardprogramm hierbei entspricht 94 °C für 2 min; 20-40 x: 94 °C für 15 sec., Tanneal für 30 sec., 72 °C für 1 min pro kb; 72 °C für 10 min. und 4 °C für ∞. , wobei ein erschöpfender Lauf mit 60 Zyklen durchgeführt wird. Im Anschluss daran wird eine Schmelzkurve erstellt, deren Ergebnis durch Schmelzsimulation der Amplikons validiert werden kann, somit wird die Spezifität der Primer bzgl des Amplikons verifiziert. Als positiv werden Resultate gesehen, deren Ct Wert signifikant niedriger ist als der der Negativkontrollen. Berechnungen werden per Delta-Delta-Methode durchgeführt, wobei mit den Col-0 22°C Daten verglichen wird (Livak *et al.*, 2001).

Selbsterstellte Primer werden zusätzlich zu den allgemein gültigen Primerdesigningideen (Dimerisierung, Schmelzpunkte, Länge des Amplikons, AG Verhältnis, GC Clamp) nach zwei Gesichtspunkten ausgewählt. Spezifität der Primer, die mittels NCBI-primer-blast-tool ermittelt wird. Diese müssen genspezifisch, lokusspezifisch ausschließlich an *A. thaliana* Strukturen binden können, es wird hierbei gegen das Humangenom diskriminiert (www.ncbi.nlm.nih.gov/tool/primer-blast). Andererseits wird darauf Wert gelegt, dass die Primer einen Bereich von 100-300bp amplifizieren, der nach Möglichkeit ein Intron überdeckt, um zwischen Transkript, etwaig anfallenden Pseudogenen und Verunreinigungen durch genomische DNA zu unterscheiden. Dabei wird darauf Wert gelegt, dass die Größen der Amplikons sich maximal unterscheiden. Optimalerweise sind hier Werte von 100/1100, 200/2400, 300 /3600 angestrebt worden, was aber aufgrund der Allgemeinen Primerwahlparameter (AG Verhältnis, GC clamp, Schmelztemperaturen, Primerdimerisierung, Ampliconsekundärstrukturen) und der kurzen Intronlängen nicht erreichbar war.

Desweiteren, zwar für die Durchführung dieses q-PCR Experiments unerheblich, deshalb ein zurückgestelltes Auswahlkriterium, betrifft die Sekundärstruktur des Amplicons. Primerpaare mit ähnlichen Eigenschaften, werden auf die Nützlichkeit in etwaigen Genotypisierungsexperimenten verglichen, die sich eben durch unterschiedliche Ampliconstrukturen unterscheidet. Hierbei wird dem Primerpaar mit den instabilsten Ampliconsekundärstrukturen Vorrang eingeräumt, um bei eventuellen Folgeexperimenten mit Sonden Testexperimente und Kosten zu sparen.

2.3.2. DNA-Analytik

2.3.2.1. Plasmid-Minipräparation aus *Escherichia coli* 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 selektivem Antibiotikum 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 20 800 x g und RT für 15 min abzentrifugiert. Aus dem wässrigen Überstand wurde die DNA mit 300 µl Isopropanol gefällt und anschließend abzentrifugiert (20 800 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 H₂O aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.3.2.2. Plasmid-Minipräparation aus *E. coli* mittels QIAprep spin Miniprep kit

Für Anwendungen, die eine hohe Reinheit der Plasmid-DNS erfordern, wurde der *kit QIAprep spin Miniprep* der Firma QIAGEN nach den Angaben der Hersteller verwendet, wobei nach der alkalischen Lyse die DNA über einen säulenchromatographischen Schritt mit Silicagel aufgereinigt und die DNA mit 50 µl H₂O eluiert wird.

2.3.2.3. Plasmid-Minipräparation aus *Agrobacterium tumefaciens*

Zur Plasmid-Minipräparation aus den entsprechenden *Agrobakterien* wurden 3 ml einer Übernachtskultur bei 100 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 Kaliumacetatpuffer (60 % (v/v) 5 M Kaliumacetat; 11,5 % (v/v) Essigsäure, pH 4,75) 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:Isoamylalkohol 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 gelöst.

2.3.2.4. 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. 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.

2.3.2.5. Restriktionsanalyse

Es wurden 2 bis 4 µl Plasmid-DNA, 2 µl 10 x Reaktionspuffer mit H₂O auf 19,75 µl aufgefüllt und 0,25 µl Restriktionsenzym hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für mindestens 4 h inkubiert und dann mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

2.3.3. Klonierungen

2.3.3.1. TOPO-Klonierung

Für die TOPO-Klonierung wurden Pfu-Polymerase-amplifizierte PCR-Produkte verwendet. Nach Anhängen von Poly(A)-Überhängen durch Inkubation von 7,8 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 1 µl 10 mM dATP, 1 µl 10x Taq-Puffer und 0,2 µl Taq-Polymerase für 10 min bei 72 °C, wurde das PCR-Fragment in den pCR8/GW/TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Dafür wurden 4 µl des PCR-Fragments mit 1 µl Salzlösung und 1 µl des TOPO-Vektors gemischt, für 5 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Das Produkt der TOPO-Klonierung wurde in *E.coli* DH5α-Zellen transformiert und die Sequenz durch Restriktionsanalysen (s. Kap. 2.4.5) und Sequenzierung (s. Kap. 2.4.12) geprüft. Der pCR8/GW/TOPO-Vektor eignet sich für nachfolgende Gateway-LR-Rekombinationsreaktionen (s. Kap. 2.4.7).

2.3.3.2 Klonierung mit der Gateway®-Klonierungstechnologie

Zur Klonierung in Gateway-Vektoren wurden ~100 ng des pCR8-Eingangsvektors (s.Kap.2.4.6), mit 150 ng des jeweiligem Expressionsvektors und 2 µl LR Clonase™ II Enzym Mix (Invitrogen) gemischt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 10 µl aufgefüllt. Nach zweimaligem kurzem vortexen wurde die LR-Reaktion über Nacht bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Transformation in *E.coli* DH5α-Zellen. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem für den Expressionsvektor spezifischen Antibiotikum.

2.3.3.3 Klonierung mit der Multi-Gateway® Klonierungstechnologie

Zur Klonierung in Multigateway-Vektoren wurden je 5 fmol der Entryvektoren mit 10 fmol des pk7m34gw-Destinationsvektors und 2 µl LR Clonase™ II+ Enzym Mix (Invitrogen) gemischt und mit H₂O auf ein Endvolumen von 5 µl aufgefüllt. Nach zweimaligem kurzem Vortexen wurde die LR-Reaktion über Nacht bei 25 °C inkubiert, gefolgt von einer Transformation in *E.coli* DH5α-Zellen. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit dem für den Expressionsvektor spezifischen Antibiotikum Kanamycin.

2.3.4. Transformationen

2.3.4.1. *E. coli* Transformation

Chemisch kompetente Bakterienzellen der Linien DH5α finden Verwendung. Nach Auftauen der bei -80°C gelagerten Bakterien wird die Plasmid-DNS dazu pipettiert und der Mix zehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach erfolgreichem Hitzeschock bei 42°C, und 90 Sekunden erfolgt die Aufnahme in 450 µl SOC - Medium. Die im Anschluss erfolgende einstündige Inkubation bei 180 upm und 37°C wird gefolgt vom Ausplattieren von jeweils 50 µl und 450 µl Kultur auf LB-Agar und dem jeweiligen Antibiotika. Anzucht erfolgt auf 37°C für etwa 18-24 Stunden, Lagerung bei 4°C.

2.3.4.2. Hefetransformation

Die *S. cerevisiae* Hefen des PJ69-4A Stammes wurden mittels Lithiumacetat-Methode transformiert (Gietz & Woods, 2002). Fünf Milliliter einer YPD -Vorkultur, die bei 30°C und 230 rpm über Nacht inkubierte, wurde in 100 ml vorgewärmtes YPD aufgenommen und bei 30°C und 230 rpm auf OD₆₀₀ 0,6-0,8 inkubiert. Es folgte die Zellernte mittels Pelletierung (3 min bei 4000 rpm), Waschung mittels ddH₂O (steril) und Resuspendierung in 1ml 0,1M sterilfiltrierter Lithiumacetatlösung. Erneute zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) und Aufnahme des Pelletts in 800 µl Lithiumacetat werden von 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur gefolgt. Pro benötigter Plasmidkombination wurden 15µl der vorbereiteten Hefe mit 70µl 50% (w/v) PEG 3000, 10,5µl 1M Lithiumacetat, 1,5µl aufgekochte Lachssperma-DNA (10 mg/ml) und 3µl 1xTE (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) sowie jeweils 1µl der Plasmide gemischt. Es erfolgte eine Inkubation des Mixes für 30min bei 30°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (1 min bei 2000 rpm) wurde das Pellet mit Wasser gewaschen und anschließend in 150 µl 2%iger (w/v) Glucoselösung resuspendiert. Das Ausplattieren der Zellsuspension fand dann abhängig, ob pGADT7 oder pGBKT7 Plasmide transformiert wurden, auf -T, -LT oder -HALT Dropoutplatten (Formedium) statt.

2.3.4.3. Transiente Expression von Proteinen in *Nicotiana benthamiana*

Die transiente Expression von Proteinen in *N. benthamiana* erfolgte über *Agrobacterium tumefaciens*. 50µl elektrokompente Agrobakterien (Stamm C58C1) werden hierfür mit 1µg Plasmid-DNA versetzt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und elektroporiert. Nach Zugabe von 300µl LB Medium erfolgt eine 1h Inkubation bei 230 rpm und 28°C

inkubiert. Auf Platten des entsprechenden Antibiotikas wird ausgestrichen und für zwei Tage bei 28°C inkubiert. Die Anzucht der transformierten Agrobakterien erfolgte über Nacht bei 28 °C und 230 rpm in 25 ml LB-Medium. Die Ernte der Bakterien erfolgt durch Zentrifugation (15 min bei 5000 rpm), wonach das Pellet in 10 mM MgCl₂ aufgenommen und auf eine OD₆₀₀ =1 eingestellt wird. Jeder Ansatz wurde dann zu gleichen Teilen mit einer Kultur von p19-Protein enthaltenden Agrobakterienkultur versetzt (Voinnet *et al.*, 2003) Nach Zugabe von 150 µM Acetosyringon erfolgt eine Inkubation für 6 Stunden bei Raumtemperatur und anschließend die Infiltration in Blätter drei Wochen alter *N. benthamiana*-Pflanzen (Romeis 2001). Analysen mittels Fluoreszenzmikroskop erfolgen an Tag 4, 5 und 6.

2.3.4. Gelelektrophoretische und assoziierte Methoden

2.3.4.1. Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

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

2.3.4.2. Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

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

2.3.5. Sequenzierung von DNA

Für eine Sequenzierung wurde entweder gereinigtes PCR-Produkt (c = ~ 15 ng/100 bp) oder 15 µl Material einer Plasmid-Minipräparation (750 - 1500 ng) an die Firma MWG gesandt.

2.3.6. Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

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

2.3.7. RNA-Methoden

2.3.7.1. *Isolierung von RNA aus Blattmaterial*

Zur Isolierung von RNA aus Blattmaterial wurden pro Probe 2 Blätter in ein 2 ml Reaktionsgefäß geerntet, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Plastikpistill gemörsert. Nach Zugabe von 1 ml Trizol (0,4 M Ammonium-Thiocyanat; 0,8 M Guanidinium-Thiocyanat; 0,1 M Natriumacetat; 5 % Glycerol, pH 5; 38 % Aqua-Phenol) wurde das Gemisch unter Vortexen aufgetaut und 5 min bei RT belassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, etwa 15 sec 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% (v/v) DEPC (Diethylpyrocarbonat) in Wasser lösen, über Nacht bei RT rühren, autoklavieren] wieder gelöst. Die RNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.3.7.2. *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.

2.3.7.3 . *Reverse Transkription*

Zur reversen Transkription wurde RNA aus einer DNaseI-behandelten (s. Kap. 2.5.2) RNA-Präparation verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mittels M-MuLV (*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*) reverser Transkriptase (Fermentas). Es 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 M-MuLV RT-Puffer (Fermentas) und 1 µl M-MuLV Reverse Transkriptase hinzugefügt und mit 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 *EF1α*- und *PR1*-genspezifischen Primern relative Quantifizierungen durchgeführt werden (s. Kap. 2.4.9.1).

2.3.8. Lasergestützte Konfokalmikroskopie

Zur Analyse der zellulären Lokalisation von PSK2-GFP in Blättern, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, die ein PSK2-GFP-Fusionsprotein unter Kontrolle des 35S-Promoter überexprimierten. Es wurden Scheiben aus Blättern von ca. 7 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen ausgestanzt, und das eGFP-Fluoreszenzsignal mit dem Laserkonfokalmikroskop *TCS SP2* von Leica (Heidelberg) und der vom Hersteller mitgelieferten *Software Leica Confocal Software, Version 2.5* visualisiert. Die eGFP-Fluoreszenz des Fusionsproteins wurde dabei mit einem Argon/Krypton Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und das emittierte Licht im Wellenlängenbereich von 500-600 nm detektiert.

2.3.9. Infektion von Testkandidaten mit *Alternaria brassicicola*

Die Sporenpräparation des nekrotrophen Pilzes *Alternaria brassicicola* erfolgte wie in (Thomma *et al.*, 1999) beschrieben (Kap. 2.2.4). Die Sporen wurde auf je zwei Blättern der Pflanzen aufgebracht, indem je 5 µl einer Suspension von 5×10^5 Sporen/ml in sterilem Wasser auf 4 Stellen eines Blattes getropft und die Pflanzen unter 100 % Luftfeuchte gehalten wurden.

2.3.10. Datenbankanalysen

Zur Vorbereitung der Experimente wird auf Daten aus dem *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp>) zurückgegriffen. Außerdem wurde die Datenbank von *TAIR – The Arabidopsis Information Resource* (<http://www.arabidopsis.org/index.jsp>) verwendet. Zur Vorhersage von Protein-Proteininteraktionen findet *PAIR* (<http://www.cls.zju.edu.cn/pair/interaction>) anwendung.

2.3.11. Microarray-Literaturdatenanalyse

Die hier dargestellten Microarraydaten beruhen auf unterschiedlichsten Analysen, zusammengefasst auf *eFP Browser* (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>; Schmid *et al.*, 2005). Die Daten der Expression bei biotischem Stress basieren auf Publikationen der Gruppen Nürnberger/Kemmerling und Dong. Die Daten der Expression bei abiotischem Stress basieren auf Arbeiten von Killian, 2007. Die Daten wurden mit GCOS Methode normalisiert, der TGT Wert ist einhundert. Die meisten Datenwerte entsprechen Triplikaten.

Die dementsprechenden Versuchsbedingungen sind auf (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) auffindbar. Jeweils eine hier dargestellte Datenreihe entspricht der unbehandelten Expression des jeweiligen Gens in entsprechenden Geweben und Entwicklungsstadien, die andere Serie entspricht behandelten Pflanzen (zB Kältestress, Infektionsstudien etc...) . Alle Microarraydaten wurden unter Verwendung von Affimetrix AT1H Chips gewonnen, wurden aber zur besseren Vergleichbarkeit relativ zur Maximalexpression in Prozentualwerte umgerechnet.

Die Daten der Expressionsstudien nach Behandlung sind ebenfalls dem eFP Browser entnommen (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) Sie wurden mithilfe des AT1H Chip gewonnen und stellen jeweils ein Triplikate von 5 Wochen alten Blättern dar. Die Versuche Pseudomonas Infiltration und Effektoren stammen von der Gruppe Nürnberger, die Versuche abiotischer Stress von Killian *et al.*, 2007. Die Belichtungsverhältnisse entsprechen 8h hell zu 16h dunkel. Die Werte wurden mittels GCOS normalisiert. Dies entspricht auch der Behandlung der nicht behandelten Pflanzen.

5. 3.1. Indizien der Interaktionshypothese zwischen BAK1 BON1/3 bzw. deren assoziierten Proteinen

3.1.1. Makroskopische Phänotypen der *bon1-1*, *snc1-11/bon1-1* und *snc1-11* Mutanten im Vergleich zu *bak1* und *bak1* assoziierten Mutanten

Das Auftreten von Ähnlichkeiten zwischen den Mutanten der oben vorgestellten Interaktionskandidaten liefert insofern ein erstes Indiz für eine hypothetische Interaktion als das insbesondere *bak1-3/bkk1-1* temperaturbedingt wachstums- und zelltodeigenschaftsspezifisches Verhalten analog zu *bon1-1* aufweist. Wesentlich hierbei ist, dass wie bereits einführend erwähnt, die temperaturbedingten Unterschiede in der SNC1 Expression zu beachten sind. Diese, bei 28° verringerte Aktivität, ist Hauptursache für den Zwergenwuchs *bon1-1* Mutanten. Diese Analogien im Wachstumsverhalten, zwischen *bon1-1* und *bak1-3/bkk1-1* sind in Abbildung 8 dargestellt. Spontaner Zelltod, also die Tendenz spontanen Zelltod aufzuweisen, ist bei *bak1-3/bkk1-1* bei 28°C gegenüber der in 22°C gewachsenen Pflanzen um 2 bis 3 Wochen verzögert, bei *bon1-1* in 28°C aufgehoben.



Abbildung 8 Die hier dargestellten Pflanzen weisen Wachstumsdefizite in den zu vergleichenden Mutanten auf. Sie werden in jeweils 22°C oder 28°C angezogen.

3.1.2. *In silico* Ansatz möglicher Interaktionen

3.1.2.1. Identifikation von möglichen BAK1 Interaktoren *in silico*

Interaktionsvorhersagen in Abbildung 9 die mittels PAIR erstellt wurde, liefern ein weiteres Indiz einer möglichen Interaktionshypothese. Die hier dargestellte Interaktionskarte wurde, um unnötige Komplexität zu vermeiden, auf die wesentlichen Suchparameter reduziert. Diese waren, die Interaktionskandidaten, und die bei Suche nach allen möglichen Interaktionen gefundenen Knotenpunkte. Man beachte, dass die hier dargestellten Netzwerke keine direkte Interaktion aufweisen, sondern das BAK1 und BKK1 indirekt über PLD γ 2/3 und PSKR1 mit BON1 und BAP1 interagieren. PLDs sind Phospholipasen, deren Produkte als Signalmoleküle insbesondere in Membranprozessen erwartet werden (English 1996; Ktistakis *et al.*, 1996). Phosphatidylsäure, deren Konzentration nach Abwehrreaktionen erhöht ist, ist eines dieser Produkte (Meijer & Munnik, 2003). Die Funktion des Programms an sich bezieht knapp 6000 nachgewiesene Interaktionen ein, um mittels Vergleich von Struktur, bekannten homologen Interaktionen, und Lokalisierungsdaten, Vorhersagen über neue Interaktionen möglich zu machen. Die Zuverlässigkeit liegt laut den Autoren bei 44%, wobei 22% des gesamten Interaktoms abgedeckt werden (Lin *et al.*, 2010). -Es ist also festzustellen, es handelt sich hierbei um eine Vorschau dessen was möglich sein kann.-Nicht dessen was tatsächlich sein muss.

PSKR1, eine LRR Rezeptorkinase, erkennt das Peptidhormon PSK (Matsubayashi *et al.*, 2002). PSK ist ein fünf-Aminosäuren langes sulfatiertes Peptid (Matsubayashi & Sakagami, 1996). Mutationen in *PSKR1* und seinen Homologen führen zu Wachstumsdefekten, früher Seneszenz, kleinen Blättern und kurzen Wurzeln (Matsubayashi *et al.*, 2006; Amano *et al.*, 2007). Es wird von kleinen Vorläuferaminosäure abgeleitet, zuerst modifiziert dann geschnitten (Yang *et al.*, 1999; Matsubayashi *et al.*, 2006).

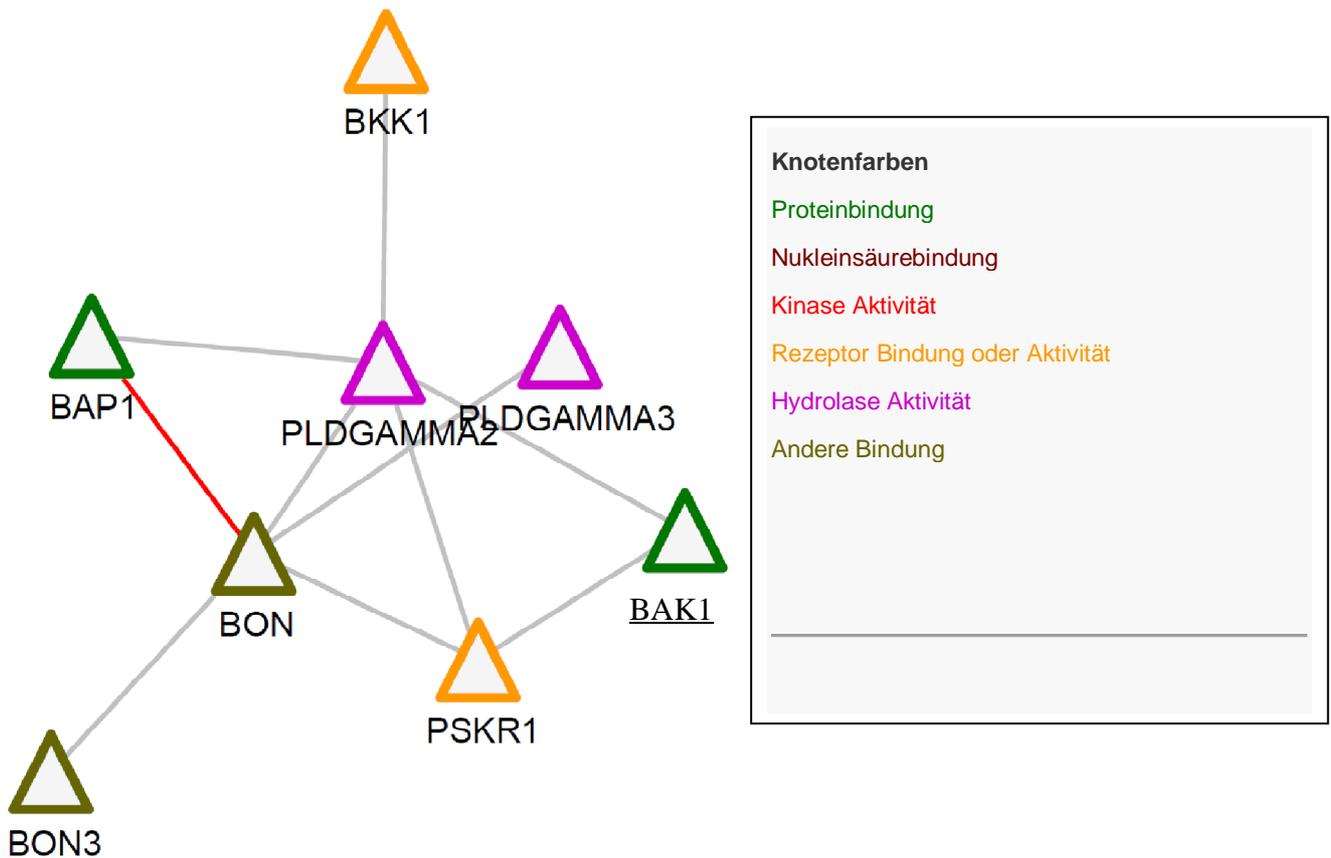


Abbildung 9 BAK1 Interaktionsvorhersage mittels PAIR (<http://www.cls.zju.edu.cn/pair/interaction>) Rote Linien zeigen experimentell bestätigte Vorhersagen an, hier die für den Y2H als Positivkontrolle herangezogene BOND1 (hier als BOND bezeichnet)-BAP1 Interaktion, grau werden durch Simulation vorhergesagt, sind aber nicht durch homologe Interaktionen in anderen Spezies vorhergesagt (blaue Linien) (Lin *et al.*, 2011).

3.1.2.2. BIP89 (AT3G28450) ist ebenfalls Teil eines vorhergesagten Netzwerks

Abbildung 10 impliziert eine indirekte Interaktion zwischen BIP89 und BOND1 über AT5G25930. Hier wird nahegelegt, dass es andere Interaktionspartner als BAK1 und BKK1 benötigt. BIP89 und BAK1 sind als Partner in einer Interaktion nachgewiesen. Hier ist BAK1/BKK1 nicht gezeigt, um etwaige Manipulationen im Bild nicht vornehmen zu müssen. BIP89 interagiert über eine weitere Kinase mit BOND1.

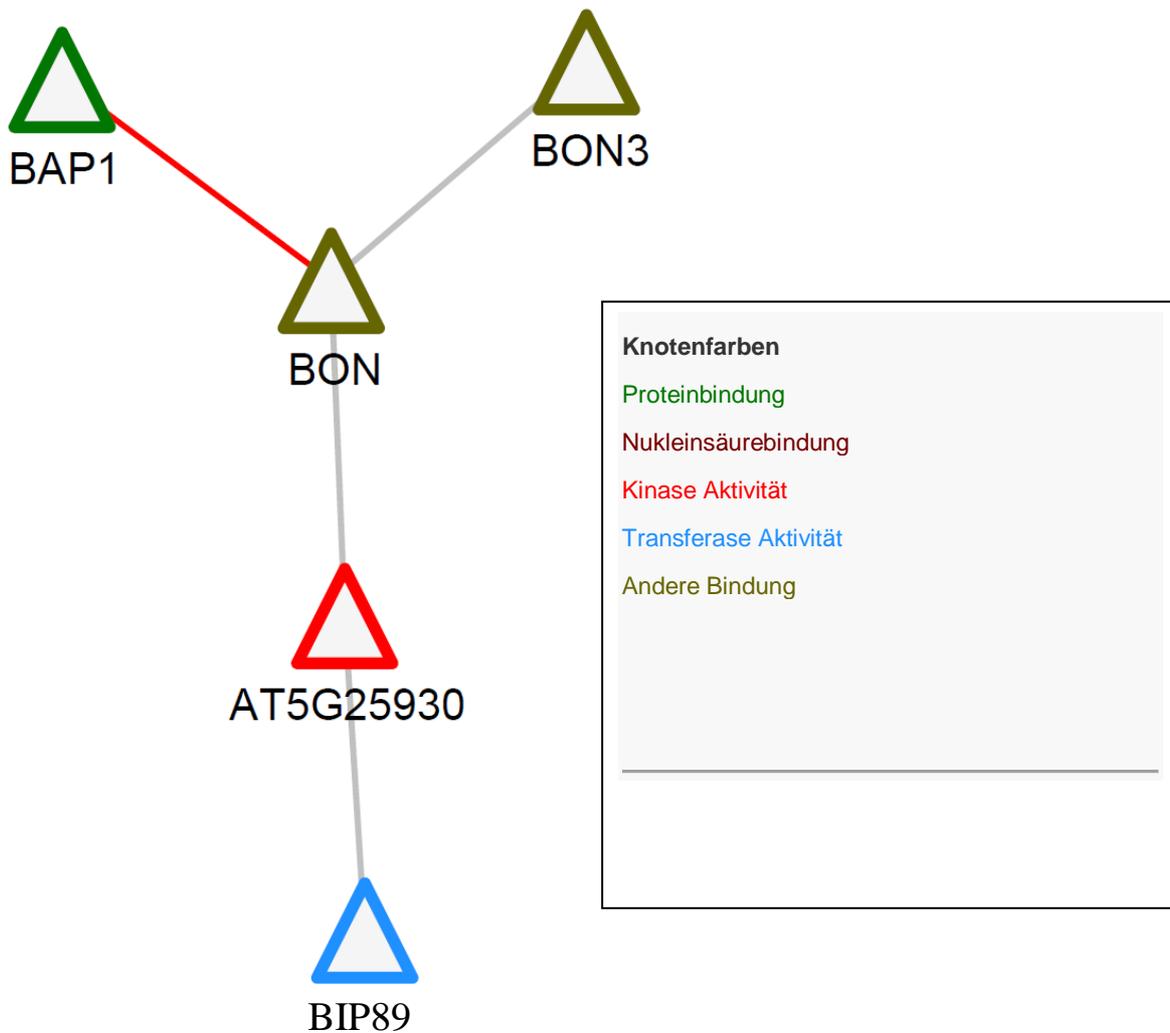


Abbildung 10 Interaktionsvorhersage mittels PAIR (<http://www.cls.zju.edu.cn/pair/interaction>)

3.1.2.3. Vorhersage der BIR1 Interaktion mit BON1

BIR1, wie in Abbildung 11 gezeigt, interagiert laut PAIR mit BON1 indirekt, bezieht aber BAK1 Komponenten (PSKR1, PLD) und BIP89 Komponenten mit ein (At5g25930). Die BIR1 Vorhersage gibt hierbei Grund zur Annahme, dass die Interaktion mit BON1 durch alle drei Proteine tatsächlich vorkommt, dass es sich aber hierbei um zwei unterschiedliche Mechanismen handeln könnte. Aufgrund dieser Vorhersagen ist zumindest die räumliche Nähe zwischen Copinen und LRR-rezeptorähnlichen Kinasen wahrscheinlich.

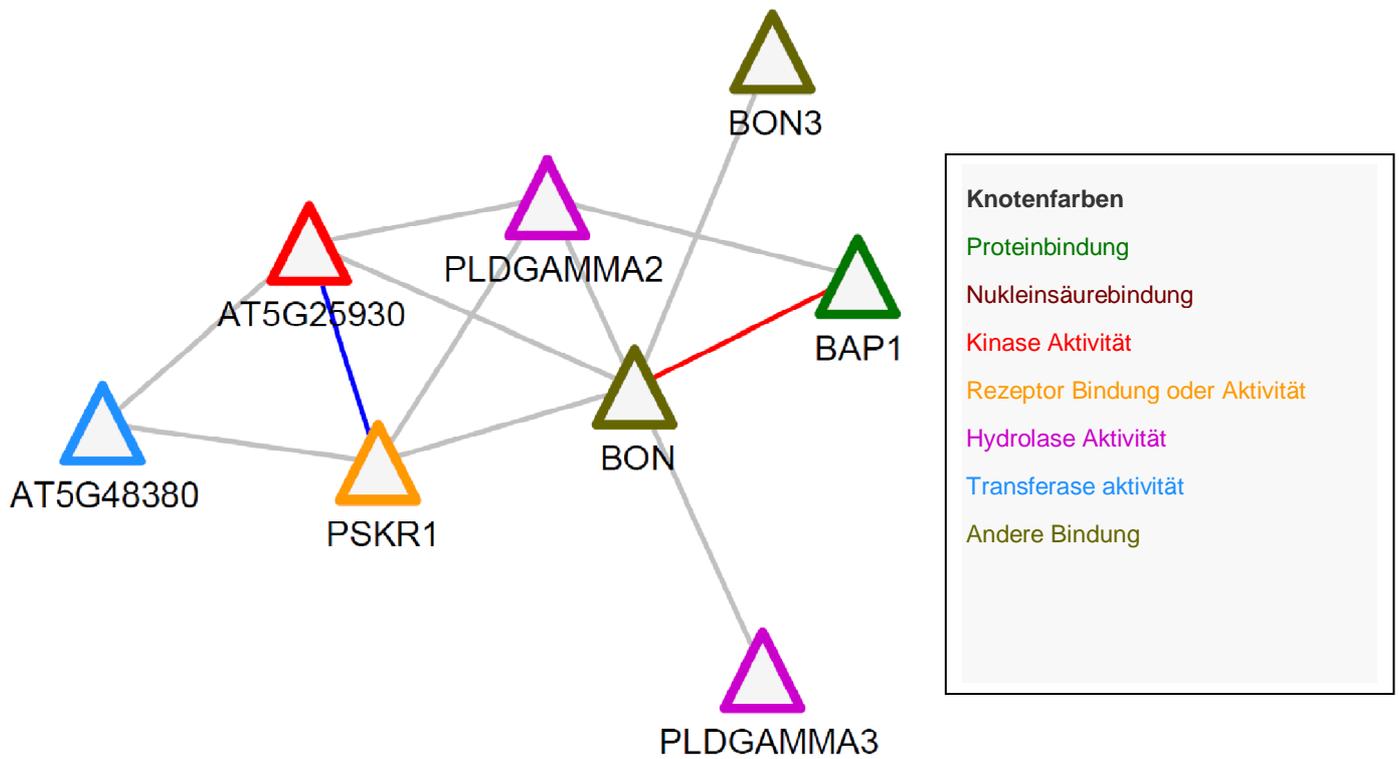


Abbildung 11 BIR1 (At5G4380) Interaktionsvorhersage mittels PAIR (<http://www.cls.zju.edu.cn/pair/interaction>).

3.1.3. Microarray-Literaturdatenanalyse

3.1.3.1 Microarraydaten der SNC1 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

Die SNC1 Expressionsdatenanalysen, dargestellt in Abbildung 12, zeigen unter Standardwachstumsbedingungen in reifen Pollen sowie in Wurzelgeweben Inhibierung. Allgemein erscheint es in Blattgeweben, verglichen mit der Expression in reifen Pollen, stark exprimiert wobei im Besonderen in seneszenten Blättern und Stängelblättern eine verstärkte Expression zu verzeichnen ist. Die Fluktuationen der Messdaten erscheinen bei SNC1- im Vergleich zu den Daten der anderen hier dargestellten Gene relativ hoch, sie liegen im Mittel bei 10% der Expression. Insofern relevant ist dies im Hinblick auf die später beschriebene q-PCR.

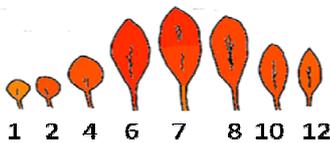
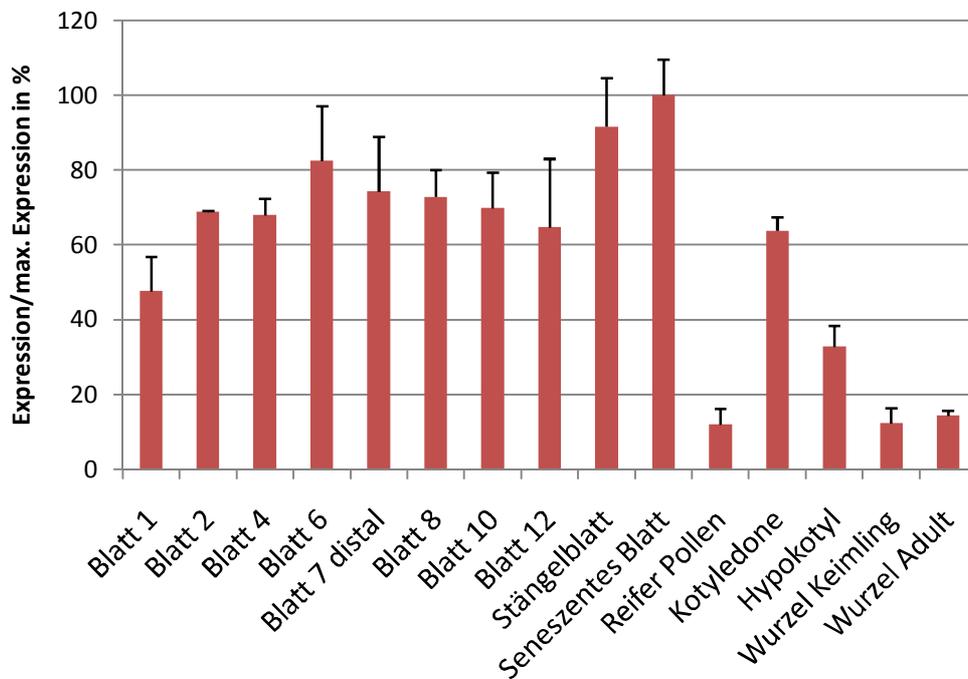


Abbildung 12 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. Das jeweilige Blattstadium ist unten stehend abgebildet.

SNC1 ist Temperatur- und *Pseudomonas*-abhängig reguliert. Ebenfalls zu beobachten ist eine leichte Erhöhung der Transkription nach Behandlung mit GST-NPP. Eine Reduktion der Temperatur führt nach sechs Stunden zur Hochregulierung der Expression, die sich in weiterer Folge steigert. Eine Erhöhung der Temperatur führt zur Reduktion von *SNC1*. *Pseudomonas* Infiltration wirkt sich nach 24h bei bei *P. syringae* Typ III Sekretions System defizienten und bei *Ps. Syringae* pv. *phaseolicola* in einer Erhöhung der *SNC1* Expression aus.

HrpZ ist ein HR zelltodauslösendes Harpin-Protein, das in *E. coli* und *Ps. syringae* und vielen anderen pathogenen Bakterien vorkommt (Alfano *et al.*, 1996). NPP1, necrosis-inducing *Phytophthora* protein 1 induziert ebenfalls zelltodähnliche Läsionen. Infiltration in *Arabidopsis* führt zu Expression von *PR1* Genen (Fellbrich *et al.*, 2002). *Pseudomonas syringae* pv. *Phaseolicola* ist das Fettfleckenkrankheit erzeugende Bakterium in *Phaseolus vulgaris* – Samen.

Tabelle 5 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>). Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. . Die hier dargestellten Daten entsprechen den Differenzen gegenüber den Kontrollen.

SNC1

Auslöser	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm Flg22	-17,13	35,3	-0,7	17,08
10 µM HrpZ	-17,67	36,81	44,33	32,47
100µg/ml LPS	27,8	26,15	-6,36	38,61
1µM GST-NPP1	8,34	23,82	83,1	44,63

<i>Pseudomonas Syringae</i> Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	0,93	17,98	-1,8	19,7	-17,37	21,05
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	1,33	40,74	-11,8	29,85	97,4	8,83
Type III Sekretions System defizient	0,27	21,8	-7,23	10,6	142,07	7,75
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. phaseolicola</i>	-16,13	19,98	16,93	17,71	122,17	14,38

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	18,44	26,02	-2,93	47,26
3h 38°C dann 25°C Erholung	-65,34	11,58	1,06	12,81
4°C	-73,67	45,05	168,87	70,83

3.1.3.2. Microarraydaten der *BON1* Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

Abbildung 13 zeigt, dass *BON1* mit Ausnahme von reifen Pollen in jedem hier dargestellten Gewebe stark exprimiert wird. Eine Reduzierung liegt lediglich in jungen Blättern vor, die bei 30% der maximalen Expression notiert sind. Weiters liegen die Werte der Blätter im Durchschnitt zwischen 50 und 90%, wobei kein Trend im Rahmen der Blattentwicklung auffällig ist.

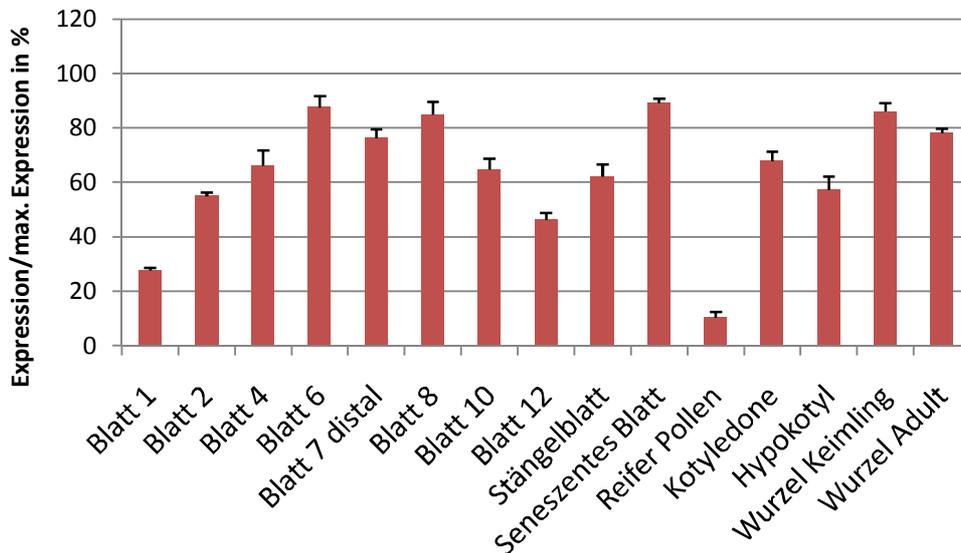


Abbildung 13 Expressionsdaten von *BON1* laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. *BON1* wird mit Ausnahme von Reifer Pollen in allen Stadien und Geweben ähnlich exprimiert.

Die *BON1* Expression wird durch Effektoren, wie Flg22, Hrpz und GST-NPP erhöht. Ebenfalls zur Erhöhung der Expression führt die Infiltration mit *Avirulenten Pseudomonas syringae pv tomato avrRpm1* und mit *P. pv Phaseolicola*. Insbesondere die Blatinokulation mit *Pseudomonas syringae pv. tomato (Pto) strain DC3000 (avrRpt2)* in Anwesenheit von RPS2 führt zu einer schnellen und transienten *BON1* Transkriptakumulation (Jambunathan & McNellis, 2003).

Sowohl osmotischer wie Temperaturstress führen zu einer kurzfristigen Senkung von *BON1* Transkript. Nach sechs Stunden wird die Transkription auf Normalniveau erhöht, bzw. im Fall von Salzstress über das Grundniveau angehoben.

Tabelle 6 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>). Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. Die hier dargestellten Werte entsprechen der Differenz gegenüber den Kontrollen.

BON1

Auslöser	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm Flg22	81,3	30,45	27,76	16,98
10 µM HrpZ	93,69	44,51	69,13	34,2
100µg/ml LPS	-1,07	35,32	-10,53	19,71
1µM GST-NPP1	51,95	39,69	47,3	18,98

<i>Pseudomonas Syringae</i> Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	9,77	18,04	14,73	75,51	14,73	75,51
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	70,5	18,06	37,9	65,89	18,76	71,02
Type III Sekretions System defizient	10,94	15,33	-21,44	43,04	-40,34	42,53
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. phaseolicola</i>	19,8	19,04	255,36	155,49	27,79	63,26

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	-78,99	0,4	69,55	2,31
3h 38°C dann 25°C Erholung	-65,46	12,29	12,08	13,16
4°C	-76,76	11,17	4,22	7,01

3.1.3.3 Microarraydaten der BON3 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

Die Abbildung 14 zeigt *BON3*, welches ausschließlich in reifen Pollen exprimiert wird. Es konnte keine Expression in Blattgeweben beobachtet werden.

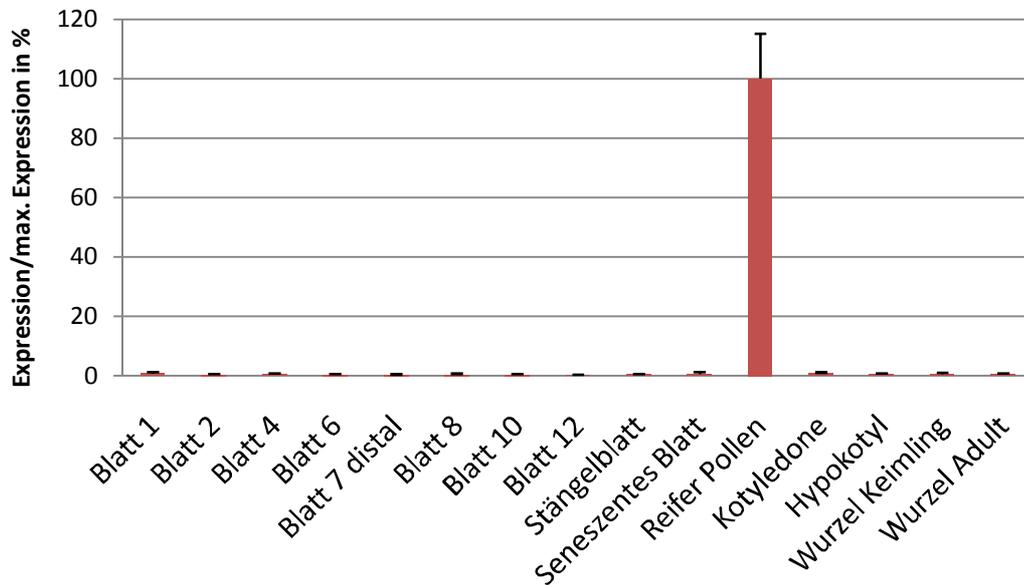


Abbildung 14 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. *BON3* wird ausschließlich in reifen Pollen exprimiert und scheint hier *BON1* funktionell zu ersetzen.

BON3 zeigt leichte Erhöhung der Transkription nach Behandlung mit HrpZ, GST-NPP, und *Pseudomonas syringae* pv *tomato avrRpm1*. Eine Senkung der Expression ist bei Behandlung mit *Type 3 Sekretions System defizienten Pseudomonas syringae* zu beobachten. Im Allgemeinen ist aber die Expression zu niedrig um gesicherte Aussagen treffen zu können.

3.1.3.4 Microarraydaten der BAP1 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

BAP1, Interaktionspartner von BON1 scheint, analog zu seinem Partner speziell hoch in Wurzelgeweben exprimiert zu sein. Die hier dargestellten relativen Daten aus Abbildung 15 sollten allerdings nicht darüber hinwegtäuschen, dass *BAP1*, selbst bei 10% Expression gegenüber des Maximalwertes bereits das maximale *SNC1* Expressionslevel von 140 aufweist. Insofern ist *BAP1* mRNA in jedem dargestellten Gewebe zu beobachten.

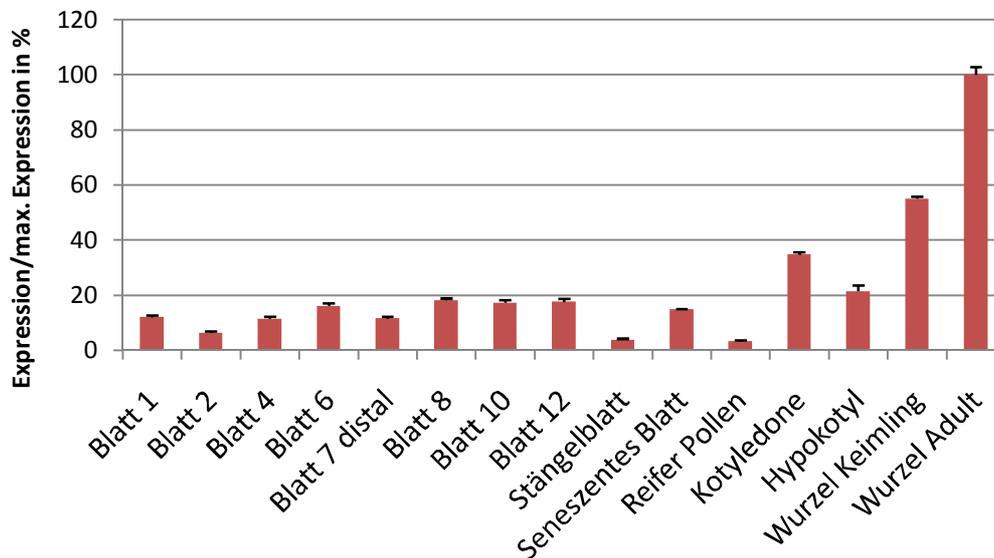


Abbildung 15 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. BAP1 erscheint überall exprimiert. Die hier dargestellten Werte deuten auf eine hohe Expression in Wurzeln hin, wobei aber auch in allen anderen Geweben starke Expression vorhanden ist.

BAP1 reagiert auf beinahe alle Reize, außer LPS, Salz, und Temperaturerhöhung, in **Fehler! Ungültiger Eigenverweis auf Textmarke.** dargestellten Bedingungen mit Hochregulierung der Transkription.

Tabelle 7 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>). Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. Die hier dargestellten Werte entsprechen der Differenz gegenüber den Kontrollen.

BAP1

Auslöser	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm Flg22	323,47	22,95	73,57	30,92
10 µM HrpZ	467,21	181,22	212,1	53,67
100µg/ml LPS	18,19	123,71	0,57	7,84
1µM GST-NPP1	189,69	76,51	149,1	53,45

Pseudomonas syringae Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	76,7	59,54	49,96	95,97	208,4	31,49
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	274,94	20,73	207,43	91,12	285,3	118,16
Type III Sekretions System defizient	57,24	17,33	-33	63,41	45,8	12,35
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. phaseolicola</i>	174,67	26,65	338,73	204,8	228,74	69,65

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	-2,95	2,13	3,1	4,03
3h 38°C dann 25°C Erholung	1,36	2,55	4,22	2,22
4°C	25,35	7,7	241,38	19,16

3.1.3.5 Microarraydaten der BAK1 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

BAK1 wird in jedem in Abbildung 16 dargestellten Gewebe unter Standardbedingungen exprimiert. Die Werte relativ zur Expression zur Keimlingswurzelexpression liegen zwischen 50 und 70% für Blätter, 90% für seneszenzente Blätter, 20% für reife Pollen und 50-60% für Kotyledone und Hypokotyl.

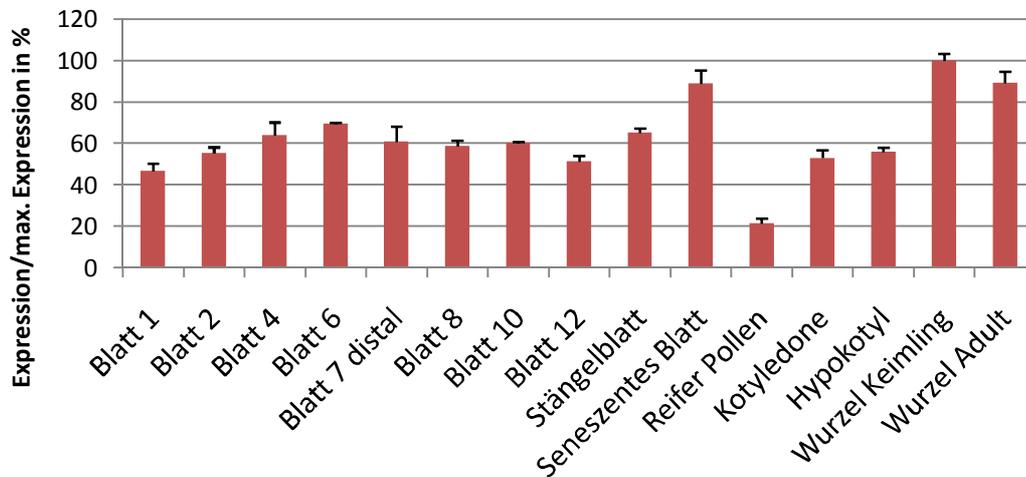


Abbildung 16 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. BAK1 wird gleichmäßig in allen Stadien und Geweben exprimiert.

BAK1 Transkription ist erhöht nach Behandlung mit verschiedenen PAMPs wie *P. syringae* Flg22 (Felix *et al.*, 1999) und *HrpZ* (Lee *et al.*, 2001) Besonders die Infiltration mit *Pseudomonas syringae* bewirkt eine Erhöhung der BAK1 Transkription. Sowohl Salz- als auch Kältestress führen zu leichten und kurzfristigen Erhöhungen der Transkriptmenge.

Tabelle 8 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>). Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. Die hier dargestellten Daten entsprechen den Differenzen gegenüber den Kontrollen.

BAK1

Effektoren	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm flg22	266,23	70,05	177,67	43,89
10 µM HrpZ	191,02	33,01	402,14	125,16
100µg/ml LPS	8,96	58,27	54,33	109,08
1µM GST-NPP	143,99	67,12	380,2	128,81

Pseudomonas syringae Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	238,6	76,4	-71,54	106,8	67,73	14,55
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	261,24	161,75	199,26	95,76	293,7	71,15
Type III Sekretions System Defizient	315,93	90,69	167,7	87,6	323,27	69,67
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. phaseolicola</i>	337,74	107,63	473,93	77,78	290,57	29,57

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	22,37	9,44	-13,98	12,94
3h 38°C dann 25°C Erholung	-8,33	11,18	-2,04	9,09
4°C	31,95	8,02	3,59	11,9

3.1.3.6 Microarraydaten der BIP89 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

BIP89, wird unter Standardbedingungen in den meisten Geweben, dargestellt in Abbildung 17, exprimiert. Mit 5% der Maximalexpression ist der *BIP89* mRNA Gehalt in reifen Pollen eine Ausnahme. Im Mittel bewegt sich die Expression in den Blätter zwischen 50 und 80%, in Keimlingen zwischen 40 und 60%, in Wurzeln ebenfalls bei 60%.

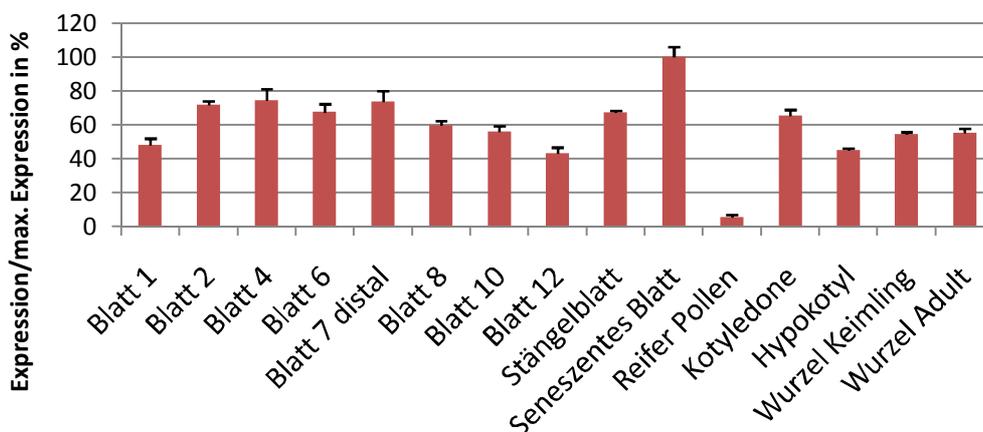


Abbildung 17 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten

Standardabweichung. BIP89 zeigt eine gleichmäßige Expression in allen Geweben und Stadien. Wird aber in reifen Pollen vermindert detektiert.

BIP89 wird in den meisten Fällen nach Behandlungen hochreguliert (Tab. 9). Effektoren und *Pseudomonas Syringae* regulieren dieses Gen langfristig hoch. Abiotischer Stress erscheint hingegen wenig bis keinen Einfluss zu haben.

Tabelle 9 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>). Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. Die hier dargestellten Daten entsprechen den Differenzen gegenüber den Kontrollen.

BIP89

Auslöser	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm flg22	66,64	28,46	78,7	31,32
10 µM HrpZ	47,74	37,75	160,54	64,88
100µg/ml LPS	13,5	22,04	-3,43	34,47
1µM GST-NPP1	45,41	62,79	117,83	57,39

<i>Pseudomonas syringae</i> Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	52,97	48,81	-61,11	20,85	23,1	15,65
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	83,77	78,89	40,5	29,48	216	30,21
Type III Sekretions System defizient	112,87	47,15	56,53	15,67	264,1	42,71
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. Phaseolicola</i>	69,63	25,24	218,46	39,48	251,44	24,35

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	17,58	10,79	17,04	9,76
3h 38°C dann 25°C Erholung	-1,43	3,67	-1,82	7,2
4°C	1,76	3,63	3,54	4,93

3.1.3.7 Microarraydaten der BIR1 Expression in verschiedenen Geweben und Stadien

BIR1 wird besonders in Blättern unter Standardbedingungen laut Abbildung 18 stark exprimiert. Senescente Blätter erscheinen hier bei 90%, Wurzeln und Keimlinge bei 20 bis 50%, wobei hier die Kotyledonen den höchsten Wert mit 50% aufweisen. In reifen Pollen liegt der BIR1 mRNA Gehalt bei 2% des Maximalwerts.

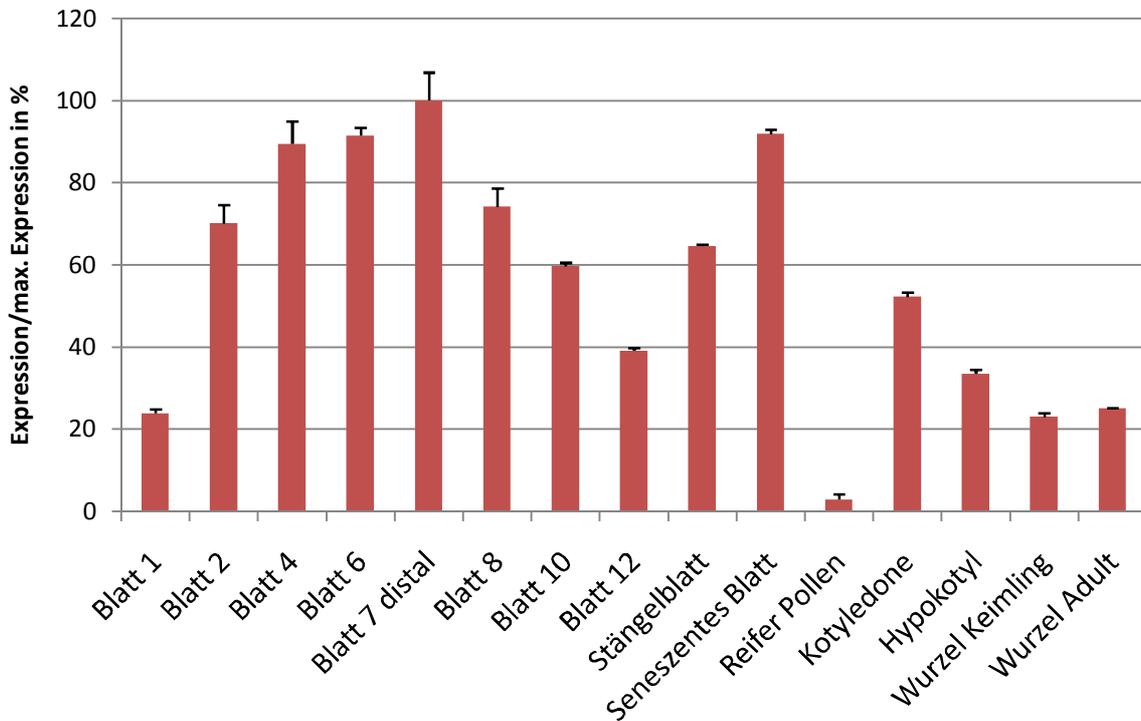


Abbildung 18 Expressionsdaten laut ATH1 GeneChip (Affymetrix), entnommen dem e-FP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>) sind hier abgebildet. Die Fehlerwerte entsprechen hierbei der auf die gewählte Darstellungsform normalisierten Standardabweichung. BIR1 wird speziell in Blättern stark, in Wurzeln schwächer exprimiert.

BIR1 wird insbesondere nach Behandlung mit Effektoren hochreguliert und zeigt nach Behandlung mit *Pseudomonas syringae* eine langfristige Erhöhung der Expression. Extreme Temperaturen verringern den BIR1-Gehalt in den ersten Stunden.

Tabelle 10 Mikroarraydaten nach Behandlung. Diese entsprechen den Angaben von <http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>. Rot bedeutet hohe Steigerung der Expression, rötlich orange meint leichte Steigerung der Expression und blau meint Senkung der Expression nach Behandlung. Die hier dargestellten Daten entsprechen den Differenzen gegenüber den Kontrollen.

BIR1				
Auslöser	1h	Standardabw.	4h	Standardabw.
1µm Flg22	577,14	90,33	408,2	247,69
10 µM HrpZ	362,78	118,46	796,76	171,44
100µg/ml LPS	103	119,53	35,2	223,23
1µM GST-NPP1	333,96	77,58	208,2	145,53

<i>Pseudomonas syringae</i> Infiltration	2h	Standardabw.	6h	Standardabw.	24h	Standardabw.
Virulent 10e8 cfu/ml pv tomato DC3000	53,2	58,72	-297,74	140,89	41,67	40,06
Avirulent 10e8 cfu/ml pv tomato avrRpm1	-6,34	248,27	-61,24	123,05	665,5	163,27
Type III Sekretions System defizient	224,86	149,81	-40,01	127,27	910,67	182,25
Nichtwirts Bakterium 10e8 cfu/ml <i>Ps pv. phaseolicola</i>	262,96	178,67	463,9	127,81	896,9	55,11

Abiotischer Stress	1h	Standardabw.	6h	Standardabw.
150 mM NaCl	-26,46	61,5	38,84	37,22
3h 38°C dann 25°C Erholung	-69,72	54,39	-12,75	4,15
4°C	-75,81	46,46	41,74	7,83

3.2. Interaktionsstudien zur empirischen Ermittlung des Verdachts der Wechselwirkung zwischen RLK und Copin und Copinähnlichen Proteinen

3.2.1. Herstellen der Donorplasmide mittels TOPO-TA-Gateway® Klonierung

Die PCR, wie beschrieben in Material und Methoden, PCR führt zu in den meisten Fällen zu ausreichender Produktmenge.

Mit Ausnahme von SNC1, das trotz verschiedener Strategien, cDNAs aus verschiedenen Mutanten, intensiver Testung unterschiedlicher Amplifikationsbedingungen und verschiedener Primer nicht in ausreichendem Maße amplifiziert werden konnte, wurden die in Tabelle 11 dargestellten Plasmide erzeugt. Ohne und mit Stop dienten hierbei C- und N-terminalen Fusionen mit unterschiedlichen Tags zur Analyse von in-vitro- und in-vivo-Interaktionen, beziehungsweise dem Herstellen von Plasmiden zur Durchführung eines in-vitro Phosphorylierungsversuchs (siehe Anhang).

Tabelle 11 Herstellung der Entryvektoren mittels TOPO-TA-Gateway®-Klonierung führt zu folgenden Konstrukten.

Gen	Primer vorwärts 5'-3'	Primer rückwärts 5'-3'	Schmelztemperatur
BAP1 mit Stop pCR8®	ATGATATATT TTGGTA GATC	TTAAAATTGGCGTTG ATAC	49°C
BAP2 mit Stop pCR8®	ATGTCGTATT CAACAT TCAA	TATCAACGGCCGTC TTAA	49°C
BON1 ohne Stop pCR8®	ATGGGGAATTGTTGC TCCGA	TCATGGAGGAATCG GTTTC	54°C
BON1 mit Stop pCR8®	ATGGGGAATTGTTGC TCCGA	TCATGGAGGAATCG GTTTC	54°C
BON3 ohne Stop pCR8®	ATGGGAGGTTGTTTA TCTGG	TCAAATTGCTGGAG CTCC	56°C

3.2.2. Herstellung der Expressionsplasmide mittels LR-Reaktion

Yeast 2 Hybrid Versuche erforderten die Herstellung von speziellen Expressionsplasmiden. Deren Eigenschaften sind im entsprechenden Kapitel Material und Methoden dargestellt. Aus den LR-Klonierungen der Eingangsvektoren der jeweiligen Gene und pGADT7 entstehen jeweils die pGADT7 und pGBKT7 Variante von BAP1/2 und BON1/3. Die zweite Serie der für die Versuche benötigten Kandidaten, namentlich BAK1, BIR1 und BIP89, tragende Plasmide wurden, auf deren zytoplasmatische Domäne reduziert, bereitgestellt.

3.2.2.1. *Y2H Versuche zur Verifikation einer direkten Interaktion mit BON1, BON3, BAP1 und BAP2*

Abbildung 19 zeigt das Hefewachstum beruhend auf der Interaktion zwischen BAK1 und den Interaktionskandidaten. Insofern liegt hier eine Interaktion zwischen der BAK1-Kinasedomäne mit BON1 und BAP1 nahe, eine Interaktion mit BON3 wird zwar nicht ausgeschlossen, dennoch ist dieses Wachstum deutlich schwächer als jenes der Positivkontrolle und der zugehörigen Hefen auf den Kontrollplatten. Die Interaktion mit BAP2 wird ausgeschlossen. Die Platten der Negativkontrollen zeigen kein Wachstum auf –HALT. Die Kontrollplatten –LT sind im Gegensatz zu

den selektiven –HALT Versuchsplatten gleichmäßig angewachsen. Die Kontrollen implizieren dass das Wachstum der Versuchshefen aufgrund von spezifischen Protein-Proteininteraktionen zustande gekommen ist.

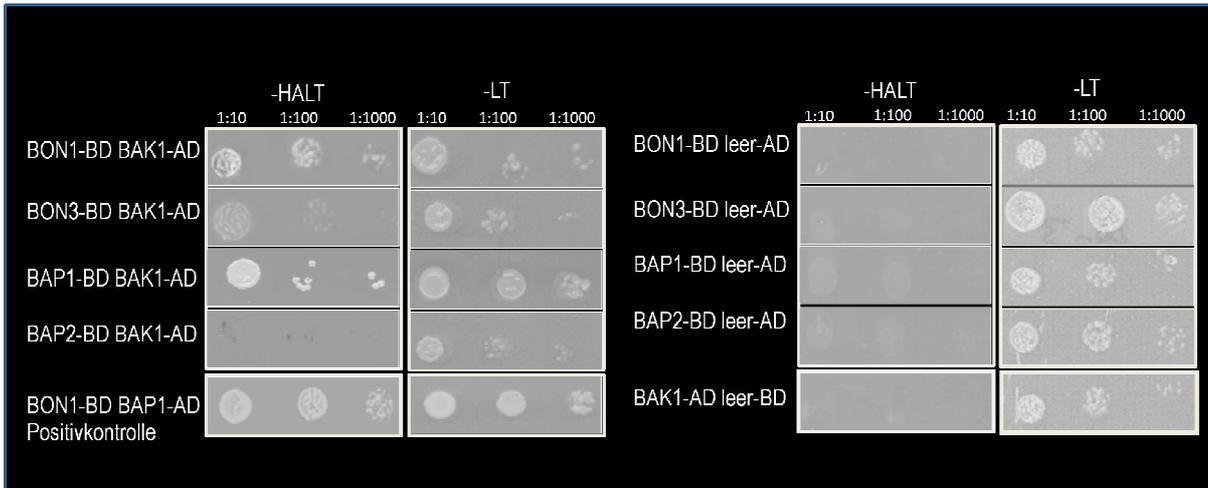


Abbildung 19 Hefe 2-hybridversuche zur Identifikation der Interaktion BAK1s mit potentiellen Interaktoren BON1, BON3, BAP1, und BAP2. Fusionskonstrukte mit der GAL4 Bindungsdomäne (BD) bzw. Aktivierungsdomäne AD und der zytoplasmatischen Domäne von BAK1 wurden in Hefe kotransfomiert, und über Nacht in –LT bzw –HALT Medium wachsen gelassen. Auftropfen der über Nacht gewachsenen auf das entsprechende Medium erlaubt nach durchschnittlich 2,5 Tagen eine entsprechende Dokumentation.

3.2.2.2. *Interaktionsstudie von BIP89 Kinasedomäne mit zytoplasmatischen Kandidaten*

Abbildung 20 analog zu Abbildung 19 zeigt das Hefewachstum des Y2H Versuchs mit BIP89 und den Interaktionskandidaten. Die Kontrollen, da es sich um die selbe Versuchsserie wie in Abbildung 19 handelt, sind gleich. BIP89 Kinasedomänefusionen führen zum interaktionsbedingten Wachstum mit BON3, BAP1 und BAP2. BON1 scheint nicht mit BIP89 zu interagieren. Das gleichmäßige Anwachsen der Hefen auf –LT Kontrollplatten erlaubt den direkten Vergleich mit Abbildung 19 und Abbildung 21.

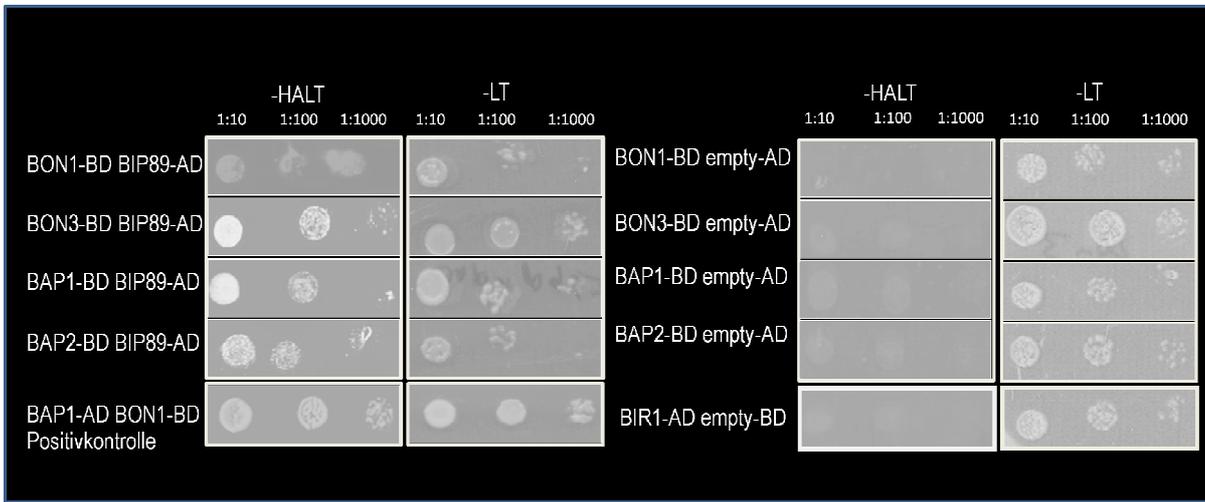


Abbildung 20 Hefe 2-hybridversuche zur Identifikation der Interaktion BIP89s mit potentiellen Interaktoren BON1, BON3, BAP1, und BAP2. Fusionskonstrukte mit der GAL4 Bindungsdomäne (BD) bzw. Aktivierungsdomäne AD und der zytoplasmatischen Domäne von BIP89 wurden in Hefe kotransformiert, und über Nacht in –LT bzw –HALT Medium wachsen gelassen. Auftropfen der über Nacht gewachsenen auf das entsprechende Medium erlaubt nach durchschnittlich 2,5 Tagen eine entsprechende Dokumentation.

3.2.2.3. Interaktionsstudie von BIR1 Kinasedomäne mit zytoplasmatischen Kandidaten

Abbildung 21 entspricht der selben Versuchsreihe wie Abbildung 19, insofern sind wieder die Kontrollen die Selben wie oben. BIR1-Kinasedomänfusionen führen mit beiden Copinen und mit BAP1 zu Wachstum auf dem –HALT Selektivmedium. Die Kontrollplatten –LT wachsen gleichmäßig an. BAP2 erscheint wiederum als schwächer als die Hefen der Positivkontrolle und auch wesentlich schwächer als die Hefen auf –LT Kontrollplatten anzuwachsen, es erscheint als ausgeschlossen, dass es sich hier um eine positive Aussage handelt, vielmehr erschien das hier dargestellte Bild als Schatten, nicht aber als Wachstum.

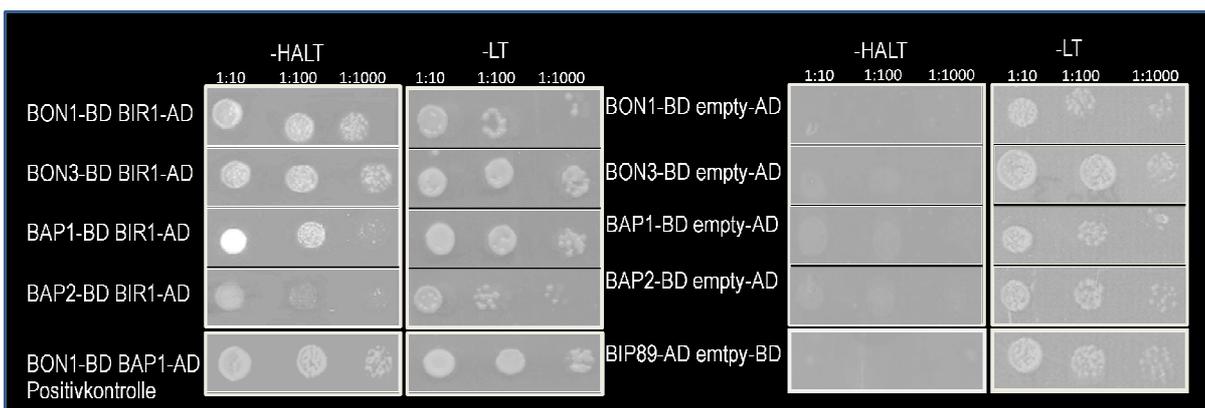


Abbildung 21 Hefe 2-hybridversuche zur Identifikation der Interaktion BIR1s mit potentiellen Interaktoren BON1, BON3, BAP1, und BAP2. Fusionskonstrukte mit der GAL4 Bindungsdomäne (BD) bzw. Aktivierungsdomäne AD und der zytoplasmatischen Domäne von BIR1 wurden in Hefe kotransformiert, und über Nacht in –LT bzw –HALT Medium wachsen gelassen. Auftropfen der über Nacht gewachsenen auf das entsprechende Medium erlaubt nach durchschnittlich 2,5 Tagen eine entsprechende Dokumentation.

3.3. Verifikation der Interaktion der Kandidaten mit BAK1 bzw. BAK1-assoziierten Proteinen in vivo mittels BiFC

3.3.1. Multisitegatewayssysteme als flexible Strategie zur Überprüfung der in vivo Interaktion von Proteinen

Das Etablieren eines Multisitegatewaysystems dient dem Herstellen von Plasmiden zur Durchführung eines BiFC. Die Vorteile der Verwendung dieses Systems liegen in der Flexibilität, mit der man beispielsweise den Baustein des Promotors gegen einen anderen Promotor austauschen kann. Zu diesem Zwecke werden die benötigten Entry, DONR und Expressionsplasmide eingesetzt. Durch unterschiedliche Rekombinationsstellen wird die Spezifität der Rekombination erreicht. Eine Rekombination wird immer zwischen den korrekten Stellen vorgenommen, eine vollständige Rekombination erlaubt die Integration der für die Expression benötigten Fragmente in einen Expressionsvektor, und daraus resultiert letztlich nur ein mögliches und vollständiges Plasmid.

Aus diesem System entstehen die Plasmide für den BiFC. Jeweils ein Plasmid mit der C- und ein Plasmid mit der N-terminalen GFP Hälfte, mit 35S Promotor für die Proteine BAK1, PGL2/1, BON1/3 und BAP1/2 werden hergestellt.

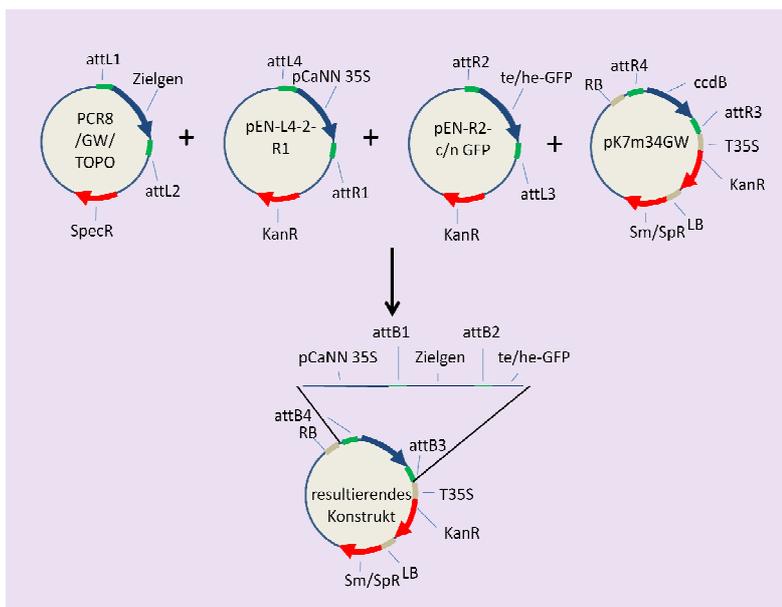


Abbildung 22 Multisitegateway System erlaubt die Herstellung der zur Durchführung des BiFC benötigten Plasmide. Die hier dargestellten Entryvektoren erlauben die Herstellung der für die Expression der zwei benötigten Proteinfusionen, te-GFP und he-GFP. Die Vektoren verfügen hierbei über die Bausteine Promotor, Zielgen und Expressionstag. Sie werden in den Expressionsvektor pk7m34GW eingebracht.

3.3.2. BiFC

Die in Abbildung 23 dargestellten BiFC Versuche zeigen gegenüber der BAK1-GFP Kontrolle zumindest in einem Punkt das Funktionieren des Systems an. Während bekannte Interaktionen wie BAK1- BIP89 und BAK1-BIL3 teils

strittige Ergebnisse zeigen, liegt bei BIP89-BIL3 eine eindeutig membranlokalisierte Fluoreszenz vor. Das Bild Negative zeigt die durchschnittliche Erscheinung von Null, Leer und nichtinteragierenden Systemen an. Die hier dargestellte mit zwei Leervektoren infiltrierte Nullkontrolle wird als Abgleich benutzt. Das Erscheinungsbild ist aber für nicht dargestellte Kombinationen gleich. Plasmidkombinationen entsprechen, jeweils jedes mit jedem, Kein Insert N- und C-terminales GFP, BAK1, BIP89, PGL1 und PGL2, MEKK1 und MEKK1 Mutanten. Es scheint sich, in Bezug auf die Signalintensität durchaus um spezifisches Signal handeln zu können, da keine andere Kombination Membranlokalisierte GFP Signale hervorgebracht hat. Es bleibt aber dennoch strittig ob es sich hierbei nicht um Autofluoreszenz handelt. Die Kontrollen und Einstellungen entsprechen hierbei einer Versuchsserie. Die Signalintensitäten liegen bei den drei dargestellten über der Leervektorkontrolle.

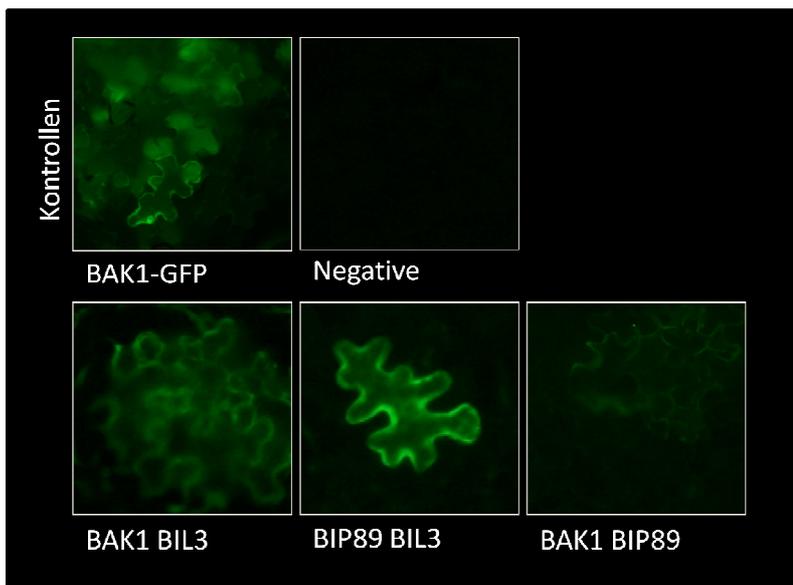


Abbildung 23 Zur Kontrolle der membranlokalisierten Fluoreszenz wird eine BAK1 GFP Kontrolle hergestellt. Der Abgleich mit den BAK1 BIL3, BIP89 BIL3 und BAK1 BIP89 Konstrukten, die teilweise im Rahmen dieses Projekts oder zusätzlich zu diesem Projekt hergestellt werden, zeigt, dass im Falle von BIP89 BIL3 Interaktion stattfindet. Dieses Ergebnis ist prinzipiell nicht Teil dieser Arbeit, wurde aber zur Unterstützung anderer Projekte hergestellt und zeigt den Erfolg des BiFC an. Die Negativkontrolle entspricht hierbei einer durchschnittlichen Leervektorkontrolle.

3.4. Vergleichsstudien zwischen Kandidatenmutanten zur Analyse der Beeinflussung der Expression des TIR-NB-LRR- SNC1 und der PR1 Expression

3.4.1. SNC1 und PR1 Expression in verschiedenen potentiellen BAK1-Signalweg-relevanten Mutanten

3.4.1.1. Die Expression von SNC1 im Vergleich zwischen bon1-1, bak1-3 und bak1-3/bkk1-1 Mutanten

Abbildung 24 zeigt eine q-PCR Serie mit cDNA aus Blattmaterial 5 Wochen alter Pflanzen aus jeweiligen Temperaturen. Die y-Achse zeigt erst gegen EF1 α , dann gegen Col-0 22°C normalisierte Werte. Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen aus den sechs Meßpunkten.

Die SNC1 Expression in *bon1-1* Mutanten liegt mit einer 3 fachen Induktion gegenüber Col-0 in 22°C auf *bak1-3* Niveau. Die höhere Expression in *bak1-3/bkk1-1* bei 8 facher Expression gegen Col-0 bei 22°C liegt gegenüber *bon1-1* 2fach höher. Im Allgemeinen liegen die 22°C Werte über denen der 28°C Werte.

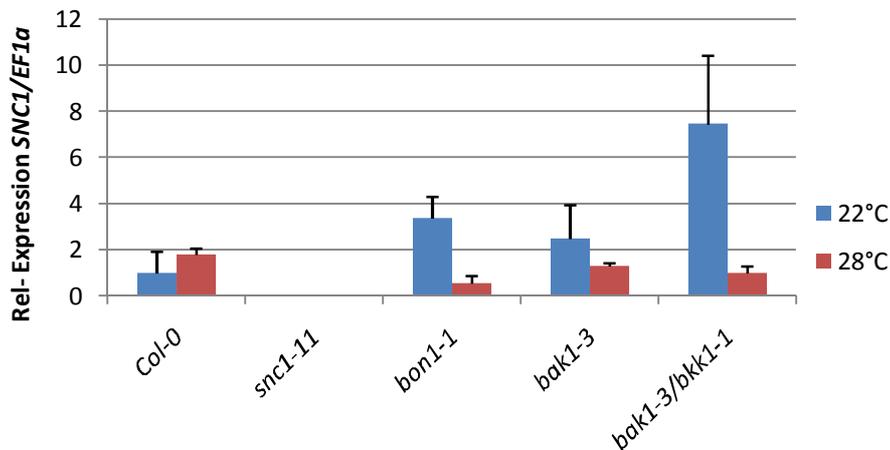


Abbildung 24 *bak1-3* zeigt eine geringfügige Erhöhung der SNC1 Expression, die durch die Doppelmutante *bak1-3/bkk1-1* verstärkt wird. Die hier und in weiterer Folge dargestellten Fehlerwerte entsprechen den Standardabweichungen. Die hier dargestellte Abbildung bezieht sich auf einen Einzelversuch aus einer Serie von 3 Einzelexperimenten. Jeweils RNAs von drei Einzelpflanzen werden isoliert Zu Analyse Zwecken werden jeweils zwei technische Replikate gemessen. Die Standardabweichung dieser technischen Replikate liegt im Mittel bei 0,05 C_t Werten. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen aus allen sechs Messpunkten dar.

3.4.1.2.Expression von PR1 in *bon1-1*, *bak1-3* und *bak1-3/bkk1-1* Mutanten

Analog zu Abbildung 24 zeigt Abbildung 25 die relativen PR1 Expressionslevels derselben Versuchspflanzen.

SNC1 wurde erstmalig als autoaktiverendes Allele identifiziert das PR1 konstitutiv exprimiert (Zhang et al., 2003)

Hierbei ist die y-Achse zu beachten, deren Werte nun höher sind als oben. Das PR1 Expressionsverhalten von *bon1-1*-(22°C) Mutanten liegt, mit 200facher Induktion, hier nun deutlich zwischen jenem *bak1-3*, mit 16,7 facher Induktion gegenüber Col-0 (22°C) und *bak1-3/bkk1-1*, mit einer knapp 1000fachen Induktion gegenüber Col-0 (22°C). Die Mutaten in 28°C scheinen mit Ausnahme von *bak1-3/bkk1-1* nicht betroffen.

Eine direkte numerische Korrelation zwischen PR1 und SNC1 Expression lässt sich nicht nachweisen. Wohl aber sieht man tendenzielle Ähnlichkeiten. Die Literatur spricht jedoch von einem indirekten Zusammenhang, zwischen PR1 Expression, der Aktivierung von R-Genen und Salicylatsynthese, bzw. Signalen (siehe Einführung, Phytohormone/SA).

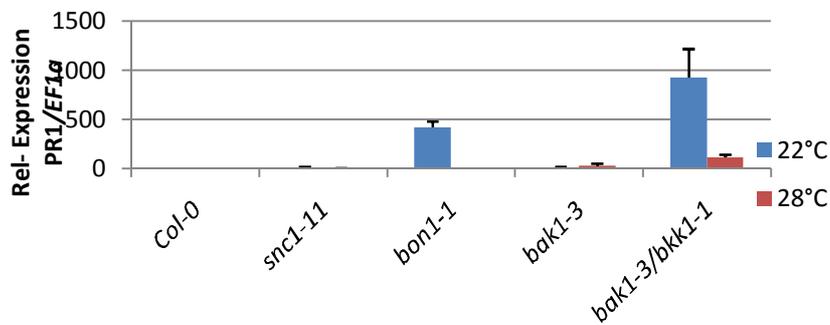


Abbildung 25 *bak1-3* Mutanten zeigen eine minimale Erhöhung der PR1 Expression an. Das hier abgebildete Experiment entspricht dem SNC1 q-PCR Experiment. Es wurde auf dieselben RNS Proben zurückgegriffen.

3.4.1.3. Das SNC1 Level im Vergleich zwischen *bon1-1* und *bip89-3*

Die in Abbildung 26 dargestellten Werte zeigen die relative SNC1 Expression in *bip89-3* Mutanten im Vergleich zu der Versuchsmutante *bon1-1*. Während die Niveaus der relativen SNC1 Expression für *bon1-1* (22°C) wie oben dargelegt, mit knapp 3,5facher Induktion gegenüber Col-0 deutlich erhöht sind, liegt dieser Wert für *bip89-3* mit 2facher Expression darunter. Beachtenswert ist, dass die Expression in 28°C gewachsenen *bip89-3* Mutanten mit 2,5facher Induktion höher ist. SNC1 ist autoregulierend, und sollte bei 28°C eigentlich an der Membran liegen. Eine Erhöhung der SNC1 Menge in 28°C bei *bip89-3* wirft viele Fragen auf, auf die es hier keine Antworten gibt.

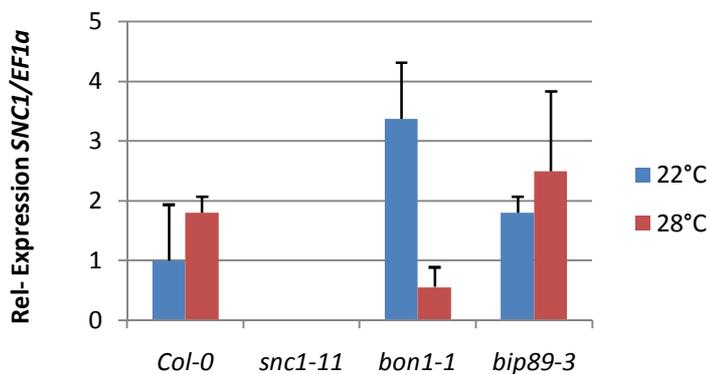


Abbildung 26 *bip89-3* zeigt eine Erhöhung der SNC1 Expression in 22°C, und eine stärkere Erhöhung in 28°C.

3.4.2. PR1 Expression

3.4.2.1. Das PR1 Level im Vergleich zwischen *bon1-1* und *bip89-3*

Abbildung 27 zeigt, dass PR1 überdurchschnittlich hoch exprimiert wird in *bip89-3* (28°C). Dieser Wert stimmt mit den Werten mit der Tendenz von *bip89-3* Mutanten bezüglich deren Expression von SNC1 überein. PR1 wird nach Pathogenerkennung spät exprimiert. Diese Expression deutet auf Veränderungen in der Chromatinstruktur, und auf die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren hin. Insofern ist bei Erhöhung der PR1 Expression darauf zu schließen dass gerade eine Abwehrreaktion im gange ist. Insofern ist, da keine Induktion dieses Systems vorgenommen wurde,

schlusszufolgern, dass Immunreaktionen konstitutiv ablaufen. Somit erscheint die *bip89-3* bei 28°C eine konstitutive Aktivierung des Immunsystems aufzuweisen.

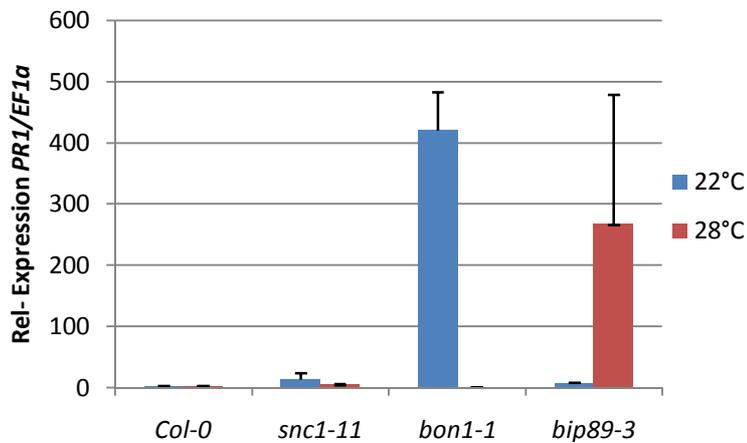


Abbildung 27 *bip89-3* Mutanten exprimieren PR1 in 28°C stark

3.4.3. Durch Rückgriff auf einen weiteren Primer werden die SNC1 q-PCR Ergebnisse validiert

Abbildung 28 zeigt einen weiteren q-PCR Versuch zur Ermittlung der relativen SNC1 Expression in den Mutanten der zu testenden Proteine. Um die oben dargelegten Informationen, bzgl. der *SNC1* Expressionen, mit einem weiteren Primerpaar zu validieren, wurde auf bereits von Li publizierte Primer zurückgegriffen (Li *et al.*, 2007). Unterschiede in der Amplifikationseffizienz (98%/95%) sind gering, die Primer binden Intronüberlappend jeweils entweder um das 3' Intron oder drittletzte 3' Intron. *SNC1* 288q und *SNC1* published by Li weisen keine stabilen Sekundärstrukturen in den entsprechenden Amplikons auf. Weiters wurden Selbstamplifizierende Strukturen und Primerdimere bei beiden Paaren ausgeschlossen. In Summe wurden aber drei Primerpaare getestet. Primerpaar „*SNC1* published by Bartels *et al.*, 2009“ führte als erstes getestetes Primerpaar zu Dimeren, zu diffusen Ergebnissen, und unreinen Schmelzkurven. Es blieb deshalb, da nicht vorausgesetzt wurde, dass der Bartels Primer tatsächlich ungeeignet ist, trotz dem Erreichen von Theoriewerten in Schmelztemperaturen beim zweiten Primer, 288q, unklar ob die Effekte, des Bartels *et al.*, 2009 Primers, nur aufgrund von Verunreinigung oder technischen Problemen auftraten, oder ob es andere Effekte gab, sodass eine von 288q unabhängige Serie durchgeführt werden musste. Dieses erlaubt nun die unterschiedlichen Aussagen miteinander zu vergleichen. Es finden sich keine Relevanten Unterschiede zwischen den beiden Messserien, die aus jeweils drei Einzelmessungen bestanden. Insofern können die hier gezeigten Werte als repräsentativ angesehen werden.

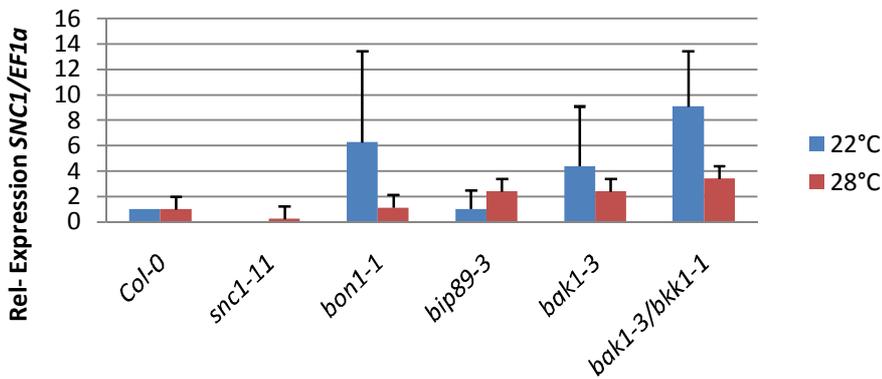


Abbildung 28 q-PCR-SNC1 mittels „SNC1 Published by Li „ Ein zweites Primerpaar validiert die oben genannten Ergebnisse.

3.4.4 Vergleichende Untersuchung des Wachstums von *Alternaria Brassicicola* auf Kandidatenmutanten

Die Infektion mit *Alternaria brassicicola* erfolgt nach 5 Wochen Wachstum, gleichzeitig mit der Ernte der für die q-PCR benötigten Versuchspflanzen. Die y-Achse zeigt den Erkrankungszustand der Versuchs- und Kontrollmutanten. Hierbei werden Pflanzen mit 1 bewertet wenn keine, mit 2 bei leichten, mit drei mit ausbreitenden Anzeichen einer Pilzinfektion, mit vier bei Bildung von Nekrosen, mit fünf bei Anzeichen einer Mazerierung und mit sechs bei eindeutiger Sporulation bewertet. Insofern zeigt sich einerseits nach 13 Tagen Inkubationsdauer, dass im Mittel die Pflanzen, die in 22°C inkubiert und angezogen wurden, einen schwereren Erkrankungsgrad entwickeln als jene in 28°C. Andererseits sind die Niveaus von *bon1-1* und *bak1-3* vergleichbar. Beide zeigen nach 13 Tagen Nekrosen in 22°C, und beide weisen dasselbe 28°C Niveau auf. Bereits gezeigt wurde eine Anfälligkeit für *bak1* und *bak1/bkk1* bei 22°C gegen den Pilz, es wurde weiters gezeigt, dass diese Abhängigkeit BR-unabhängig ist (Kemmerling *et al.*, 2007). Was *bip89-3* betrifft, so zeigt sich wie bereits in den oben dargestellten q-PCR Ergebnissen, dass die in 28°C angezogenen Pflanzen für Zelltodereignisse anfälliger sind als jene aus 22°C. Die Doppelmutanten *bak1-3/bkk1-1* letztlich sind in besonderem Maße betroffen. Es stellt sich aber zusätzlich zum Krankheitsverlauf auch spontaner Zelltod ein, wodurch dieses Ergebnis, nicht gesondert betrachtet werden sollte. Das heißt zusammenfassend, dass Zelltodereignisse durch eine scheinbar bereits aktivierte Immunantwort in *bon1-1*, *bak1-3* und *bak1-3/bkk1-1* Mutanten beschleunigt, bzw. verstärkt auftreten. Die *bip89-3* Mutante zeigt ebenfalls stark beschleunigten Verlauf der Erkrankung an, aber die Beschleunigung des Krankheitsverlaufs in 28°C gegenüber des Verlaufs in 22°C ist anders als in den anderen Mutanten. Es erscheint also als gegeben, dass bei allen gerade gelisteten Mutanten eine konstitutive Aktivierung des Immunsystems der Aktivierung durch *Alternaria brassicicola* vorrausgeht.

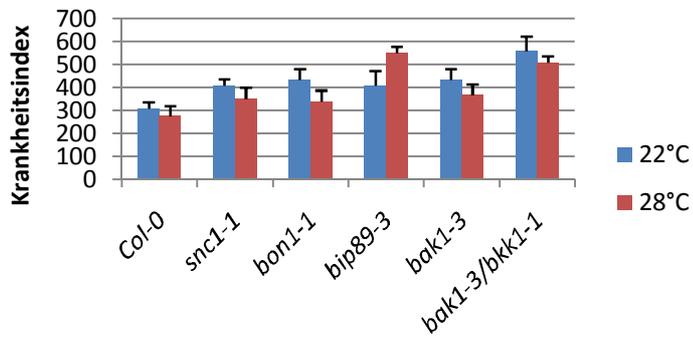


Abbildung 29 *Alternaria brassicicola* Infektionsversuch 13 Tage nach Infektion. Hierbei entspricht *bon1-1* in etwa *bak1-3*. Die Doppelmutante *bak1-3/bkk1-1* ist wie *bip89-3* stärker betroffen. Die y- Achse entspricht hierbei der Symptomatik über 24 Einzelpflanzen, aus 4 verschiedenen Ansätzen. 600 entspricht hierbei dem Stadium Sporulation, 500 Mazerierung, 400 Nekrose, 300 ausdehnender Erkrankung, 200 lokalisierter Erkrankung, und 100 nicht betroffen.

4. Diskussion

BAK1 und BKK1 sind enge Homologe deren Funktionen überlappen. BAK1 interagiert mit BRI1, welches der Rezeptor der Brassinosteroide ist (Li *et al.*, 2002; Nam *et al.* 2002). Nach der Bindung seines Liganden verändert BRI1 seine Affinitäten. Sein Inhibitor BKI1 wird entlassen, BAK1 gebunden. Infolgedessen werden Komponenten durch Phosphorylierung aktiviert (Vert *et al.*, 2005; Aker & de Vries, 2008). Der BAK1-BRI1-Komplex wird internalisiert, sodass er neben der Membran auch in Endosomen anzutreffen ist (Rusinova *et al.*, 2004). BAK1 interagiert ebenfalls mit FLS2. Es bildet sich analog zu BRI1 ein aktiver Komplex nach Perzeption von Flg22 aus. Im Unterschied zu BRI1 ist die Internalisierung ausschließlich nach Bindung von Flg22 zu beobachten (Robatzek *et al.*, 2006).

Der *bak1* Phänotyp, der sich hier in den Resultaten niederschlägt, ist aber ein anderer. Eine Abhängigkeit von BR-Signaltransduktion ist ihm fremd. Der Zelltod, der sich in dieser Arbeit findet ist von SA-abhängiger Natur. Hypersensitive Reaktionen prägen das Bild, dass im Hintergrund Aktivierung der Immunabwehr zeigt. Werden diese Phänotypen aber unabhängig von den anderen oder nur durch diese geprägt? Die Vielzahl von Funktionen BAK1s zu schützen erscheint in gewisserweise in die bekannte Funktion von R-Proteinen zu passen. Dass heißt, ohne eine müßige Diskussion um evolutionäre Logik führen zu müssen, aus menschlicher Sicht erscheint es sinnvoll, einen Dampfkessel mit einem Überdruckventil auszurüsten. Diese Kessel überlebten und wurden weitermodifiziert. Eine Pflanzenzelle ohne BR Signalling und ohne PTI Signal-Selbstmordfunktion erscheint evolutionär so sinnvoll wie ein Kessel ohne Überdruckventil, weil ein evolutionär konservierter biologischer Knoten, so wie der Druck im Kessel ebenfalls eine konservierte Eigenschaft eines Dampfkessels ist, eine Schwachstelle im System ist und sich Varianten fortpflanzen werden, die diese Schwachstelle ausgleichen. Sprich eine Überfunktion des Kessels wird in irgendeiner Art und Weise zu Fehlfunktion führen, dem Explodieren und eine Unterfunktion entfernt die konservierte Funktion, den Druck. Der Kessel hatte eine Zeitspanne von knappen 250 Jahren, sich so zu konzipieren, *Arabidopsis thaliana* eine entscheidend länger. Er erklärt auf einfache Weise, welchen Sinn es macht, den Phänotypen des Zelltods im Zusammenhang mit allen anderen Phänotypen zu sehen und nicht gesondert und isoliert zu betrachten. In gewisser Weise ist dieser Absatz sogar so zu verstehen, dass es sich hierbei durchaus um ein BR-„related“-es Phänomen handelt, weil das Sicherungssystem ein Sicherungssystem für etwas sein muss.

BON1s Funktion könnte im Aufrechterhalten der Spezifität des Ca^{2+} Signalings liegen. Seine Funktion lässt sich, aus den Funktionen anderer Copinen, und anderen zwei C2-Domänen im Vesikelverkehr vorhersagen. Seine vWA Domäne dient dem Aufbau von Komplexen. Diese Prozesse sind kalziumabhängig, so dass eine ausreichende Spezifizierung des Ca^{2+} Signals gewährleistet ist (Lee *et al.*, 2008). Unter diesen Signalen sind jene für Wurzelwachstum und Gravitropismus (Ma *et al.*, 2006), Pollenschlauchwachstum (Fritsch *et al.* 2007), Schwermetalltoleranz (Arazi *et al.*, 1999; Sunkar *et al.*, 2000) und Salzstresstoleranz (Gobert *et al.*, 2006). Ebenfalls wird Blattseneszenz durch Calziumsignale reguliert, hierbei sind Kanäle wie AtCNGC2 wichtig, die über zyklische Nukleotide reguliert werden (Köhler *et al.*, 2001). Ca^{2+} -Flüsse, die aus niedrigen Temperaturen oder niedriger

Feuchtigkeit herrühren, könnten so von jenen unterschieden werden, die aus Pathogenerkennung stammen (Lee *et al.*, 2008).

Auffällig ist eine Ähnlichkeit zwischen den Nullmutanten von *BON1*, *BAP1*, *BAP2* und *BAK1*. So ist ihnen ein Wachstumsdefizit gemein, gleichzeitig aber eine konstitutive Expression von *defense related genes*, und eine *Missregulation der SA-Levels*. Die Wachstumsdefizite können in *bon1* und *bap1* Mutanten nicht durch BR Signaldefekte erklärt werden. Die *bak1* Wachstumsphänotypen rühren aber aus diesen her, nicht aber ist der Zelltod durch BR Gabe einzuschränken. Das heißt, dass sich dieser Phänotyp eigentlich in zwei Mechanismen aufteilen lässt. Der Zelltod der *bak1* Mutanten ist schwach, jedoch gibt es für *bak1* Funktionen Backup-Systeme in der SERK Familie, sodass sich dieser Phänotyp in Doppelmutanten verstärkt. So wird in *BAK1/BKK1* Nullmutanten eine Woche nach Keimung das Wachstum der Endtriebmeristeme eingestellt, am Tag zehn werden die Kotyledonen seneszent. Es gibt keine embryonalen Defekte (He *et al.*, 2007).

Es gilt also nachzuweisen, dass BAK1 und ein RLK mit BON1, BON3, BAP1 und/oder BAP2 interagieren. Es ist ferner zu zeigen, dass diese Interaktionen *in vivo* vorkommen können und sich die Expressionsmuster ähnlich verhalten. Der Verdacht, der daraus resultieren wird, ist durch die Funktion dieser Interaktion zu erhärten. Es sollte sich zeigen, dass Mutationen in den Wechselwirkungskandidaten ähnliche Phänotypen aufweisen, insbesondere in der Beschaffenheit ihrer konstitutiven Abwehraktivierung und ihrer Eigenschaften bezüglich der SNC1 Expression. So sollte die Wechselwirkung nahegelegt, eventuell sogar bewiesen werden.

4.1. Expressionsmuster implizieren eine gemeinsame Funktion

Die Möglichkeit der *in vivo* Wechselwirkung zwischen den RLK und den Copinen, bzw. Copin-ähnlichen Proteinen setzt die Expression der hypothetischen Interaktoren im jeweiligen Gewebe voraus. Die Microarraydaten erlauben eine Aussage, ob die jeweiligen Partner in bestimmten Geweben koexprimiert sind und damit überhaupt die Möglichkeit haben zu interagieren.

Einerseits bestünde die Möglichkeit einer Interaktion zwischen BAK1 und BON3 in reifen Pollen, da BON3 nur am Beginn der Entwicklung exprimiert wird, und am stärksten eben in reifen Pollen. Ebenfalls möglich, wenn auch unwahrscheinlicher aufgrund der niedrigeren Expressionsniveaus, erscheinen Interaktionen zwischen BON3 und BIR1 in reifen Pollen, in Embryonen, in denen beide stark exprimiert vorliegen wäre diese möglich, da beide in frühen Stadien exprimiert werden. In reifen Pollen ist ebenfalls eine Interaktion zwischen BON3 und BIP89 möglich. BON1, das genauso wie BAP1 und BAK1 in jedem Gewebe exprimiert wird, erscheint als möglicher Interaktionspartner aller drei Kandidaten, einerseits BAK1, mit BIP89 und mit BIR1. Somit kommen, *in vivo*, die Paare BAK1-BON1/BON3/BAP1/ BAP2, BIR1-BON1/BON3/ BAP1/ BAP2 und BIP89-BON1/ BAP1/ BAP2 für eine Interaktion in Frage. BON1 wird in Apikalmeristemen in der Kotyledonphase stark exprimiert (Yadav *et al.*, 2009).

Im Gegensatz zu *BAP1* erfährt *BON1* eine Senkung des Transkriptniveaus während der ersten Stunden der Kältebehandlung. Diese wird im Laufe der ersten sechs Stunden aber überwunden und es erfolgt eine Überexpression. *BON3* zeigt keine wesentliche Reaktion auf abiotischen Stress, aber eine leichte Erhöhung nach *Pseudomonas* Behandlung. *SNC1* reagiert analog zu *BAP1* mit Hochregulation der Expression bei Kälte, *Pseudomonas Typ III Sekretions System defizienten* und *non-Wirt Pseudomonas syringae* Behandlung, ist gleichzeitig aber einer Senkung des Expressionslevels bei Wärme unterlegen. Dies rührt aus Autoaktivierung und Lokalisation.

BAK1 und assoziierte Proteine zeigen eine Übereinstimmungen in der Regulation der Transkription mit *SNC1* und *SNC1* regulierenden Proteinen. Die *BAK1* und assoziierten Proteine werden in den

Tabelle 8-12 gezeigt. *BAK1* selbst reagiert ähnlich zu *BAP1* mit der Erhöhung der Transkription bei *Pseudomonas* Infiltration und Kälte. Eine Senkung des *BAK1* Transkripts ist unter der Behandlung mit HrpZ und NPP1 zu beobachten.

BIP89 und *BIR1* reagieren auf Behandlungen langfristig. Beide zeigen eine fortsetzende Erhöhung der Expression nach Behandlung mit Elizitoren und *Pseudomonas syringae* über mehreren Stunden. *BIR1*, im Gegensatz zu *BIP89*, zeigt eine Verringerung der Transkription durch Kälteeinflüsse in den ersten Stunden.

Insbesondere die Reaktionen auf die Behandlung mit NPP1 HrpZ sind hervorzuheben. Es wird nach Gabe von HrpZ HR ausgelöst, NPP1 führt zur Erhöhung von Nekrose, verbunden mit einem starken Anstieg des PR1 Gens (Alfano *et al.*, 1996; Fellbrich *et al.*, 2002) Erstaunlich sind insofern die Erhöhung von *BAK1* und die gleichzeitig erfolgende Überexpression von *BAP1*, selbst gegenüber der stärker exprimierten *BON* Gene. Es stellt sich infolge der Behandlungen ein Gleichgewicht ein.

BON1 ist im, für den Phänotypen von *bak1/bkk1* Nullmutanten, verantwortlichen Apikalmeristem stark exprimiert. Gleichzeitig ist eine stufenweise Hochregulation von *BON1* zu bemerken. So ist die Expression von *BON1* in Keimlingen und Samen schwach. *BON3* im Gegensatz dazu ist gerade in sehr jungen Geweben stark exprimiert (<http://www.bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

Die Expression von *SNC1* und *SNC1*-regulierenden Proteinen ist, wie in den Tabelle 5-8 dargestellt, durch Umwelteinflüsse veränderbar. Zusammenfassend lassen sich folgende Tendenzen beobachten. Einerseits werden *BAP1* und *BON1* durch die Behandlung mit Effektoren und *Pseudomonas syringae pv tomato avrRpm1* erhöht. Andererseits reagieren sie auf Temperaturveränderungen. Insbesondere ist die *BAP1* Kältereulation hervorzuheben. Die Koregulation zwischen den Testkandidaten könnte eine gemeinsame Funktion implizieren. Es erscheint hier nicht notwendig, konkrete Beispiele anzugeben, sondern nur darauf hinzuweisen, dass bei chemischen Reaktionen stochastische Verhältnisse der Reaktionspartner das Ergebnis verändern können. Es ist somit auch in einer wie auch immer gearteten Reaktion zwischen Makromolekülen zu erwarten, dass das System in der Lage ist, einen Überschuss eines Edukts durch Erhöhung des anderen auszugleichen, bzw. das Produkt zu verändern. Sprich die Koregulation könnte darauf hindeuten, dass das Produkt konstant sein muss, um biologisch effektiv zu sein, dies würde auf Wechselwirkung hindeuten. Es erscheint als in sich konsistentes Argument, aber wenn sich das Verhältnis zwischen *BAK1* und *BON1* im konkreten Falle verändert, so würde sich die Frage stellen warum kein Zelltod eintritt, wenn Menge an *BAK1* kleiner, die von *BON1* größer wird, würde die *bak1* Situation eintreten. So würde eine Missregulation einen Zustand herbeiführen, der der Mutante entspricht, es würde Zelltod bei Abhängigkeit der *BON1* Aktivität von *BAK1* auftreten. Zwei Gene koregulieren würde also im Fall gegenseitiger Abhängigkeit der

Proteine notwendig sein um stabile Situationen zu schaffen. Im speziellen Fall vorausgesetzt, es ist tatsächlich eine direkte Abhängigkeit der beiden voneinander gegeben, könnte dies zur Annahme verleiten dass BAK1 BON1 unterdrückt. Die Koregulation, die für verschiedene Gewebe gezeigt wurde, ist ferner auch in den Expressionsmustern nach abiotischen und biotischen Stressbedingungen gegeben. Die ähnliche Regulation der Expression könnte also als Argument für Interaktion dienen. Jedoch ist bekannt, ob die Translationsregulation ebenfalls ähnlich ist, sodass unklar bleibt, ob es sich tatsächlich so verhält, dass ähnliche Proteinniveaus konstant beibehalten werden.

4.2. Interaktionsstudien deuten einen Zusammenhang zwischen RLK und Copinen an

In silico Analysen führen zu der Vermutung das die BAK1 und BON1 Interaktion durch den Einbezug anderer Proteine funktioniert. Diese Analysen sind zu 45% vertrauenswürdig. PLD- α und PLD- β sind beide Ca^{2+} -abhängige Enzyme, unterscheiden sich aber durch die Notwendigkeit von Polyphosphoinositolen für die Aktivität von β (Dyer *et al.*, 1995; Pappan *et al.*, 1997). PLD- γ wurde als Dämpfer für H_2O_2 ausgelöste Zelltodreaktionen beobachtet. PLD- γ selbst wird durch Ölsäure stimuliert, bei deren Fehlen entwickeln sich verletzungs-imitierende Phänotypen (Wang & Wang, 2001; Kachroo *et al.*, 2003). Diese Vorhersagen würden auf Lipasen und Kinasen als Koaktoren hindeuten. BAK1, über Lipasen, könnte eine Freisetzung der BON1/BAP1 verursachen und dadurch die Lokalisation und die Aktivität verändern. Die Kinasen, die mit BIP89 und BIR1 laut *in silico* Analysen mit BON1 interagieren, könnten die Aktivität BON1s durch Phosphorylierungen verändern. Lipasen könnten die Ziele der Copine verändern, und so die Funktion verändern. Es bleibt aber spekulativ.

Y2H Versuche basieren auf Interaktionen von Fusionsproteinen. Eine nicht-expression von Fusionproteinen bringt uns in den Zustand von Leervektorkontrollen. Die Unterschiede zwischen -HALT und -LT sind in den Kontrollen gegeben. Die Negativkontrollen bleiben negativ. Es ist daher festzustellen, dass es sich bei den angewachsenen Hefen auf Selektivmedium um Hefen mit Wachstum aufgrund von Interaktion zwischen den eingebrachten Proteinen handelt. Inwiefern aber die Interaktion spezifisch ist, darüber ist keine Aussage abzuleiten, denn die Verwendung von 35S Promotoren führt zu Überexpression und könnte die Situation verändern. Somit ist die nächste Aussage in Hinblick auf die Situation während des Y2H zwar gerechtfertigt, für sich stehend aber zu wenig. Ferner ist eine Aussage über die Spezifität der Interaktion auch im Hinblick auf die Verwendung der zytoplasmatischen Domänen der RLKs fraglich, die *in vivo* Situation ist eine andere.

Aus Abbildung 19, Abbildung 20 und Abbildung 21 ableitbare Daten legen eine Interaktion zwischen BAK1-BON1, BAK1 BAP1, BIP89 BON3, BIP89 BAP1, BIP89 BAP2, BIR1 BON1, BIR1 BON3 und BIR1 BAP1 nahe. Diese Werte, wenn mit den Expressiondaten abgeglichen, deuten darauf hin, dass einzig das Paar BIP89 BON3 als *in vivo* interagierend ausgeschlossen werden muss. BON3 ist nur in reifen Pollen stark exprimiert und spielt in der Entwicklung eine vorübergehende Rolle, bis es durch BON1 ersetzt wird. Alle anderen Paare sind aufgrund der Expressionsdaten in

vivo wahrscheinlicher, da sie im selben Gewebe exprimiert und koreguliert werden. Der Phänotyp von *bir1-1* entwickelt sich früher als jener der *bak1/bkk1* Doppelmutante und setzt sich fort (Gao *et al.*, 2009). Die zytoplasmatische Domäne BIR1s zeigt Interaktion sowohl mit BON1, BON3 als auch mit BAP1, im Y2H Versuch.

4.3. Ähnlichkeiten der Expression implizieren einen gemeinsamen Pathway

Verschiedene Primer zeigen Ähnlichkeiten zwischen *bon1-1* und RLK Mutanten bzgl. deren *SNC1* Expression. Die Primer „EF1- α (100)“, „SNC1-288-q“ und „SNC1 published by Li“ sind relativ ähnlich bezüglich deren Effizienzen und amplifizieren Amplikons mit ähnlicher Größe. Das PR1-Primerpaar weist ebenfalls eine ähnliche Effizienz wie die drei anderen Primerpaare auf. Das Amplikon ist ähnlich dem des EF1- α Primers. Somit ist durch Vorexperimente gesichert, dass es sich bei diesen Primerpaaren um valide Analysematerialien handelt. Die Temperatursensitivität SNC1s basiert auf darauf, dass SNC1 im Kern lokalisiert sein muss, um Downstreamsignale zu senden, bei 28°C ist aber keine Lokalisation im Kern mehr gegeben. Im Kern selbst würde aktiviertes SNC1 zur Erhöhung der *SNC1* Expression führen-durch unterschiedliche Mechanismen, aber letztlich würde sich eine Feedbackregulation ergeben. Probleme, die sich aus der Methode ergeben können, sind wie folgt minimiert worden: Die Annahme, unterschiedliche Effizienzen bei Aufreinigung oder cDNA Synthese sind durch die gleichzeitige Ernte der Pflanzen und gleichzeitige Aufreinigung unwahrscheinlich, da das geerntete Material bezüglich ihrer Genotypen bei Aussaat randomisiert am Rag angeordnet worden ist, sodass sich keine zeitlichen Unterschiede bei der Ernte ergaben. Pflanzen wurden, um Phänomene zu unterdrücken, die aus Temperaturveränderung resultiert hätten, direkt geerntet und gefroren. Das Material wurde danach in zufälliger Reihenfolge verarbeitet. Zur Kontrolle der q-PCR Experimente wurden Schmelzkurven angefertigt und mit den theoretischen Werten der Schmelztemperaturen verglichen.

Die q-PCR lässt sich unter zwei Gesichtspunkten betrachten. Einerseits lässt sich durch die 22°C-Experimente eine Aussage über die *SNC1* Aktivität ableiten, andererseits zeigen die 28°C-Experimente den durch Mutationen bedingten Grundwert der *SNC1* Expression ohne Autoinduktion an. Die Temperaturunterschiede führen nicht zum Abschalten der *SNC1* Expression, sondern ausschließlich zur Veränderung der Lokalisation des SNC1 Proteins. Dadurch lassen sich Effekte, hervorgerufen durch andere Transkriptionsfaktoren von jenen durch SNC1-Hervorgerufenen trennen. Das heißt also, es liegt ein Grundlevel an SNC1 Molekülen bei 28°C vor, wobei deren Aktivität an der Membran eingeschränkt wird. Bei 22°C kommt es zur Umverteilung der Moleküle, ein Teil ist nun kernlokalisiert.

SNC1 wurde in seiner inaktiven Form, das heißt nach Kim, im Komplex mit SRFR1, nachweislich an der Membran beobachtet. SNC1 selbst interagiert nicht mit seinen Regulatoren. Weder für BON1 noch für BAP1 wurde eine direkte Interaktion nachgewiesen. BAP1 besteht aus 191 Aminosäuren, deren 53 zu SNC1 homolog sind (Hua *et al.*, 2001).

Der Nachweis einer Interaktion zwischen BAP1 und SRFR1 würde nun erlauben, die Membranrezeptoren, die laut Y2H, q-PCR, in silico Analyse, und phänotypischer Ähnlichkeiten direkt mit kernlokalisiertem SNC1, d.h. aktivem SNC1 zu verknüpfen. Insofern ist dieses Modell interessant, als das BAP1 hierbei die aktive Rolle der Regulation übernimmt. Es deutet insofern darauf hin, dass BAP1, wenn freigesetzt, eine Aktivierung SNC1s übernimmt. Eine Membranlokalisierung BAP1s ist für seine Funktion als Inhibitor notwendig und die Phänotypen *bon1's*, *hap1's* und *srfr1's* gleichen sich (Li *et al.*, 2010). Eine Erhöhung des SNC1-Gehalts in *bip89-3* könnte durch Autoregulation von SNC1 verursacht werden, sofern eine Kernlokalisierung möglich ist, d.h. z.B. eine Deaktivierung des SRFR1-Mechanismus vorliegt. Die 22°C-Variante liegt auf dem Grundniveau von Col-0 (Abbildung 28) Eine andere Erklärung für dieses Phänomen wäre, dass das SNC1-Grundniveau in der Zelle erhöht ist und eine Störung im SA-Signaltransduktionsweg bzw. eine Akkumulation der SA vorliegt, die die SNC1 Expression erhöht (<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>).

SNC1 wurde erstmalig als autoaktivierendes Allel *snc1-1* identifiziert, das PR1 konstitutiv exprimiert (Zhang *et al.*, 2003). Die in Abbildung 24 ersichtliche eindeutige Erhöhung in der relativen SNC1 Expression in *bak1-3* (22°C), die numerisch jener von *bon1-1* (22°C) ähnelt, legt nahe, dass es sich hierbei um ähnliche, wenn nicht gleiche Mechanismen handelt, die letztlich zur Erhöhung der Expression führen. Wesentlich ist hierbei, dass diese Erhöhung relativ zur Doppelmutante *bak1-3/bkk1-1* niedrig ist. Dies lässt sich mit Zusatzfunktionen von BAK1 erklären, bei deren Wegfall eventuell auch andere Signaltransduktionswege betroffen sind und dadurch eine gegenüber den *bon1-1* Mutanten erhöhte Neigung zum Auslösen eines Zelltods verursacht wird. Bei Betrachtung der Abbildung 26 wird klar, dass die Erhöhung des SNC1 Levels in *bak1-3* Mutanten gegenüber jenen *bon1-1* Mutanten bei 28°C durch BIP89 verursacht wird.

PR1 wird wie andere PR Gene im Rahmen von Immunprozessen exprimiert. Dies geschieht NPR1 abhängig in ETI *responses* und wird erst durch die Aktivität von vier TGA Faktoren zusammen mit NPR1 und SA exprimiert. Der Zusammenhang zwischen ETI und PR1 liegt in der SA-Abhängigkeit der PR1- Expression. Insofern ist kein 1:1 Zusammenhang zwischen PR1 und SNC1 gegeben und man könnte die PR1 q-PCR Studie nur dann unter dem Gesichtspunkt betrachten, dass PR1 hier eine Aussage über die Aktivität von SNC1 zulässt, wenn die 28°C das Grundniveau, (nicht SNC1-induziertes PR1) und die Differenz zwischen 22°C und 28°C jene durch R-Proteinaktivität verursachte Expression darstellt. In Abbildung 25 ist zu sehen, dass PR1-Expression in *bak1-3*-Mutanten um das 16fache gegenüber dem Col-0 Grundniveau erhöht ist. *bon1-1* zeigt in 22°C Erhöhung um das 400fache gegenüber Col-0. Das Niveau der *bak1-3/bkk1-1* Doppelmutante liegt bei 1000facher Erhöhung. Die Werte der 28°C Versuche sind wiederum so zu sehen, dass *bon1-1* keine Erhöhung der PR1-Expression zeigt, *bak1-3* eine leichte Erhöhung gegenüber seiner 22°C PR1-Werte, und die Doppelmutante zirka 100fach über dem Col-0 Level liegt. Diese SNC1-, und PR1-Expressionswerte lassen sich tendenziell korrelieren. Abbildung 27 zeigt die PR1 Expression in *bip89-3* Mutanten. Diese ist in 28°C auf demselben Niveau wie *bon1-1* in 22°C, zeigt aber keine Induktion in 22°C an. Es ist

jedoch ersichtlich, dass es eine zweite Quelle der PR-Genexpression in *bak1* Mutanten geben muss. Das 28°C Niveau ist in *bak1* gegenüber *bon1* erhöht. Das heißt das SNC1 unter Umständen einen Einfluss auf die *PR1* Expression in *bak1* hat, aber dass es noch einen zweiten Mechanismus geben muss, der hier aktiviert wird.

Eine Ähnlichkeit zwischen den Expressionsdaten impliziert nicht zwangsläufig einen gemeinsamen Pathway, Mechanismus oder Interaktion. Es kann sich hierbei durchaus um ein zufälliges Auftreten der überlappenden Daten handeln, oder aber es werden zwei unterschiedliche Pathways zB. über MAPK, oder SA Downstream vereint und führen dadurch zu ähnlichen Resultaten. Das sind vorstellbare Szenarien, sodass wie auch immer geartete Zusammenhänge zwischen BAK1 und *SNC1*-Expression vorliegen.

4.4. Infektionsversuche deuten auf einen gleichen, oder ähnlichen Mechanismus hin

Eine wesentliche Frage wurde aber durch die q-PCR Analysen nicht beantwortet. Wie verhalten sich die Mutanten im Vergleich nach Infektionen. Diese Frage ist von entscheidender Notwendigkeit, inwiefern sich die Mutanten in Bezug auf die Reaktion gegenüber dieses Pilzes ähneln. Sollte es sich wirklich um einen gemeinsamen Mechanismus handeln, der für den Zelltod-Phänotypen in den Kandidaten verantwortlich ist, ist anzunehmen, dass sich die Reaktionen ähneln. Es muss aber hier festgestellt werden, dass dieser Infektionsversuch zwar seine Berechtigung hat, wenn es darum geht, inwiefern sich die Ausgangssituationen gleichen. Aber es erscheint nicht möglich, dass hohe SA-Mengen von epigenetischen Merkmalen unterschieden werden können. Beides würde zu Zelltod führen können, aber eine Histonmodifikation an Loci verantwortlich für SAR würde á priori keine SA benötigen, sondern könnte ebenso durch andere Signale entstanden sein. Somit ist nur eine Aussage über die Ähnlichkeiten in der Entwicklung zu treffen. Isoliert betrachtet erschiene das aussagelos, zusammen mit den Resultaten der q-PCR ergibt sich aber ein interpretierbares Bild. Man könnte also schlicht feststellen, der Alternariaassay zeigt nur die Konsequenzen dessen, was der PR-Genexpression zugrunde liegt, es ist aber ebenfalls nicht zu unterscheiden ob der Mechanismus der Abwehr blockiert ist, zB. durch die Veränderung in Sekretion der PR-Gene. Die Unterschiede zwischen verschiedenen genetischen Hintergründen von Arabidopsis sind in Bezug auf Alternaria brassicicola dadurch gegeben, dass einzelne Hintergründe kompatible, andere nicht kompatible Interaktionen aufweisen. Der grundlegende Unterschied ist in den Expressionsmustern, die im Anschluss daran entstehen, zu finden. Das heißt eine kompatible Interaktion, die im genetischen Hintergrund *Dijon G* (DiG) auftritt, führt zur verstärkten Expression von *PR1* und anderen Genen, eine inkompatible Interaktion, die in Col-0 auftritt, erhöht die Expression von spezifischen Lipasen und Monooxygenasen. Die Abhängigkeit der Alternariainfektionen von Camalexinprodukt ist bekannt. Interessanterweise sind es die *pad3* Mutanten im Col-0 Hintergrund, die DiG am ähnlichsten sind. Das müsste aber genauso implizieren, dass alles *upstream* von *pad3* Probleme mit der Resistenz gegenüber Alternaria haben müsste. BAK1 liegt *upstream* von der Regulation von *PAD3* (*phytoalexin deficient3*), durch Verbindungen über MAPK und PTI. Es ist daher wenig überraschend das *bak1* Mutanten von Alternaria betroffen sind. Aber nicht nur die Camalexinsynthese ist ausschlaggebend für die Resistenz gegenüber diesem nekrotrophen Pilz, *pad3*-Mutanten sind

sensitiv, aber die Expressionsmuster unterscheiden sich nicht vom genetischen Hintergrund, vielmehr ist eine inkompatible Interaktion nach wie vor gewährleistet, aber die letztendliche Antwort ist blockiert. Die inkompatible Interaktion ist SA-abhängig, die Expression zeigt für SA typische Muster, ROS, und Veränderung des Redoxsystems, gefolgt von HR. Die kompatible Reaktion exprimiert in gewisser Weise die gegenteilige Variante, Enzyme zum Abbau von SA und Reaktionen über JA (Mukherjee *et al.*, 2009). Es ist daher verständlich, wenn hier extreme Abstriche der Aussagekraft dieses Experiments gemacht werden müssen. Einerseits ist nicht klar, inwiefern sich der *bak1* Alternaria Phänotyp unabhängig von der Funktion BAK1s im PTI erstreckt, es gibt jedoch eindeutige Verbindungen zwischen dem Auslösen des PTI, BAK1, MAPK und PAD3. Andererseits kann nicht verifiziert werden, wodurch sich die Resistenz in *bon1* Mutanten von der im Col-0 wt unterscheidet. Es ist á priori nicht klar, ob hier konstitutiv aktive Immunantworten eine Missregulation verursachen, oder ob Synthesewege durch MAPK verändert werden, und nichts die Anfälligkeit gegenüber dem Pilz aus dem Fehlen der letzten Reaktion, der „Immunantwort“ selbst stammt. Die Aussage wird daher nur gemeinsam mit den q-PCRs, und Temperaturveränderungen etwas Aussagekraft erhalten.

Insbesondere nach Erhöhung der PR-Genexpression ist eine Resistenz gegenüber diesem Pilz zu beobachten.(van Wees *et al.*, 2003) eine Missregulation in SA, JA und ABA Hormonsignalen ist für Unterschiede in der Reaktion auf diesen Pilz verantwortlich (Flors *et al.*, 2008)

Die Infektion mit *Alternaria brassicicola* Sporen zeigt, dass die beiden wesentlichen Vergleichspflanzenlinien, namentlich *bon1-1* und *bak1-3*, unter den gewählten Versuchsbedingungen ähnlich reagieren. Einerseits erscheint der von SNC1-unabhängige Anteil in den 28°C Pflanzen gleich zu sein, andererseits ist der Signalüberschuss in den 22°C Pflanzen gleich. *bon1-1* weist dieselbe Neigung zur Entwicklung von Krankheitssymptomen auf wie bereits für *bak1* Mutanten gezeigt (Kemmerling *et al.*, 2007). Somit scheint hier eine tendenzielle Ähnlichkeit zwischen den beiden Mutantenlinien vorzuliegen. Die Rolle von *bip89-3* ist differenzierter zu betrachten. Einerseits weisen Pflanzen in 28°C eine schnellere und ernstere Symptomatik auf als jene in 22°C, allerdings lässt sich die Verhältnismäßigkeit, die bei Aktivierung von SNC1, von der ausgegangen wird, dass die SA Konzentration höher ist als bei 28°C und deshalb eine schnelle Entwicklung von Zelltodprozessen, der SNC1-bedingten Entwicklung bezüglich der Temperaturen nicht anwenden. Während sowohl Mutanten für die Gene *bon1-1* und *bak1-3/bkk1-1* 28°C keine erhöhten Signale für die Zelltodmarker *PR1* oder für das R-Gen *SNC1* gegenüber 22°C aufweisen, liegt die Situation entgegen der Literaturdaten in Bezug auf SNC1 für *bip89-3* anders. Somit lässt sich, sehr vorsichtig, spekulieren, dass der Alternariaassay sowohl tendenziell mit jenen von *bon1-1* und *bak1-3* überstimmt, insofern, als dass es sich hierbei ebenfalls um einen durch SNC1 ausgelösten Effekt handeln könnte. Die Annahme eines SNC1 abhängigen Effekts ist durch die Wahl der Temperaturen möglich, müsste aber durch Lokalisierungsstudien nachgewiesen werden. Die Idee ist, dass BIP89 in irgendeiner Form für die Membranlokalisierung von SNC1 mitverantwortlich ist und bei Fehlen von BIP89 die Membranständigkeit nicht mehr gegeben ist. Dies würde drastischere Konsequenzen in

28°C als in 22°C haben, da das Verhältnis von membran-/kernlokalisiertem-SNC1 zwischen den Temperaturen unterschiedlich hoch ist. Gerade die Ähnlichkeit zwischen *bak1* und *bon1* und deren erhöhte Werte passen in das erwartete Bild. *Bon1-1* Mutanten zeigen eine erhöhte Neigung zu Zelltodreaktionen und sind im Gegensatz zu *bak1* resistent gegenüber vielen biotrophen Pathogenen, wobei sich hier die Frage stellt, welchen Anteil die Funktion von BAK1 in der Interaktion mit PAMP bindenden Immunrezeptoren hat und wie hoch der Anteil des Zelltod-Phänotypen ist.

4.5. Schlussfolgerungen

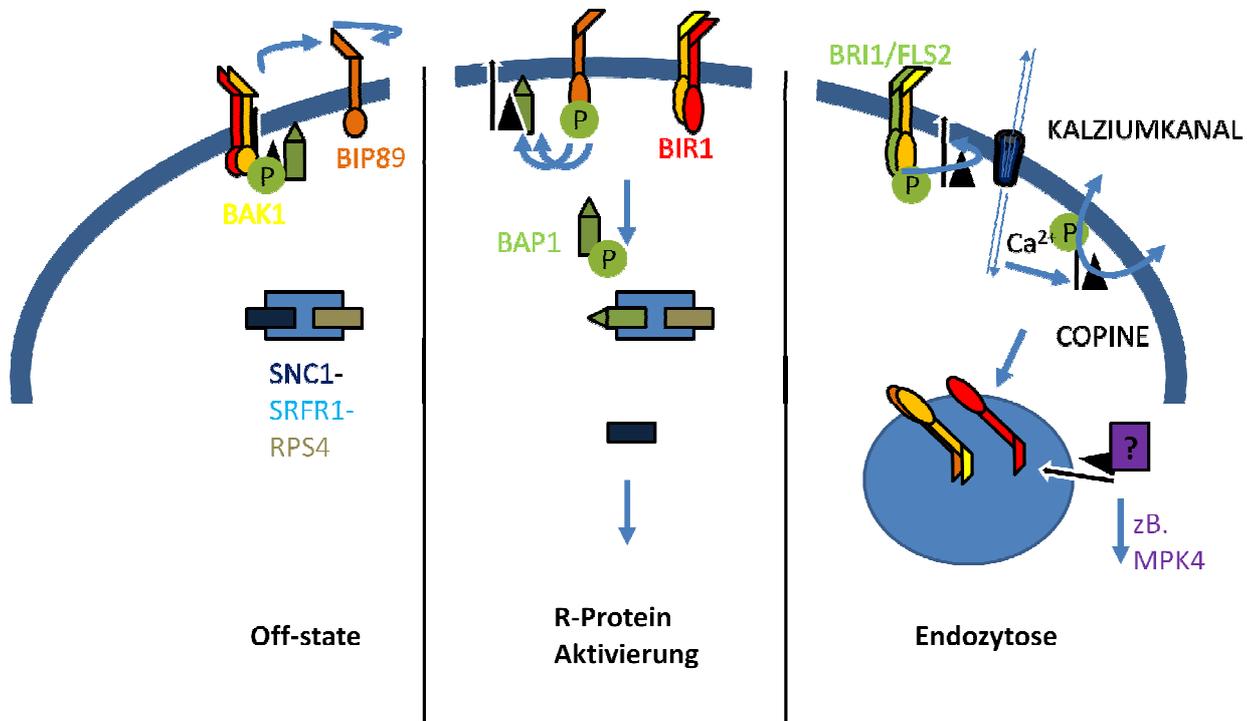
Eine Synthese der hier vorliegenden Daten erlaubt nun folgende Schlussfolgerung. Es ist nicht völlig klar ob eine Interaktion zwischen stattfindet. Einerseits implizieren die Y2H Resultate und die *in Silico* Analyse dies zwischen BAK1 und BON1, bzw. BAK1 und BAP1 hin. Auf der anderen Seite bleibt unklar ob es sich bei den Y2H Resultaten um spezifische Interaktionen handelt. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass BAK1 und BON1 in den q-PCR Experimenten sehr ähnliche SNC1 Expressionsmuster aufwiesen und über ähnliche Alternariaphänotypen verfügten, was den Schluss zulässt, dass BAK1 und BON1 in ein und dem selben Mechanismus funktionieren. Es ist aber auch hier nicht klar ob es sich um einen Mechanismus handelt, weil hier direkte Interaktion vorliegt oder weil verantwortliche Downstreamkomponenten gleich sind. Insofern gibt es aber einen Hinweis auf die voraktivierte Immunantwort. Es erscheint insbesondere in *bak1-3/bkk1-1* als gerechtfertigt anzunehmen dass eine Aktivierung der PR-Gene stattfand. Diese Annahme stützt sich auf die PR1 q-PCR. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte durch die SNC1 q-PCR Resultate erklärt werden. Die Feedbackregulation SNC1s, das bei 28°C abgeschaltet ist, würde erlauben die eine Aussage bezüglich der Aktivität in den 22°C Doppelmutanten zu treffen, so dass es wahrscheinlich ist dass SNC1 in den Doppelmutanten aktiviert wurde, bzw. durch den Wegfall der Inhibitoren aktiv ist. Es ist hieraus nicht ersichtlich ob eine Deaktivierung der Inhibitoren einsetzte oder schlichtweg ein indirekter Bezug vorliegt. Die Interaktion zwischen BON1 und BAK1, die zwar nicht vollständig bestätigt werden konnte, könnte dazu führen dass Phosphorylierungen an BON1 dessen Eigenschaften modifizieren. Hier gebe es zwei Möglichkeiten, einerseits könnte eine Veränderung der Lipid/Kalziumbindenden Eigenschaften der C2 Domäne vorliegen, andererseits ist es möglich dass die Phosphorylierung die vWA in Bezug auf die Fähigkeit der Komplexierung anderer Proteine verändert. Die erste Möglichkeit könnte dazu führen dass BAK1 die Endozytose von BAK1 Komplexen steuert, und dadurch würde BON1 eine Funktion in PTI, und BR spielen. Es wurde aber nie ein Zusammenhang gesehen und bleibt spekulativ, wenn auch interessant. Die zweite Möglichkeit würde aufgrund von Homologie zu anderen vWA Domänen beinhaltenden Proteinen ebenfalls zu einer erklärbaren Funktion führen. Hierbei würden Phänotypische Ähnlichkeiten zwischen *bon1* und *mpk4*, bzw. *MPK-Phosphatase* Mutanten als Argument dienen. Dieses Modell würde eine Funktion BON1s in PTI als Adapter nahelegen. Diese Funktion bleibt ebenfalls spekulativ. Die Interaktion zwischen BAK1 und BAP1 auf der anderen Seite sollte im Rahmen der Signaltransduktion betrachtet werden. BAP1 zeigt regulatorische Eigenschaften. Die Funktion von BON1 ist abhängig von der Fähigkeit, BAP1 an der Membran zu lokalisieren. Interagiert nun BAK1 mit BON1 und BAK1 mit BAP1, so liegt der Schluss nahe, dass BAK1 Veränderungen zu Effekten führen, die letztlich die BAP1-Lokalisation manipulieren und zu einer Veränderung in der Expression

führen. Diese Effekte, sofern sie auftreten wären nun Effekte durch R-Proteine, da es zu erwarten ist das BAP1 nicht aber BON1 diese R-Proteine in den aktiven Zustand versetzt. Wiederum bleibt dies eine Spekulation, wäre aber mit der Homologie der Phänotypen *bap1* und *snc1-1*, der konstitutiv aktiven Variante von *SNC1*, und der Homologie zwischen *BAP1* und *SNC1* naheliegend.

BIR1 ist, als Interaktor von sowohl BON1, BON3 und BAP1 im Y2H sichtbar gewesen. Sowohl die *in silico* Analyse als auch die Expressionsdaten legen dies nahe. BIR1 ist als Interaktor von BAK1 bekannt und ist gleichzeitig ein Inhibitor des Pflanzentods. Die Mutante *bir1-1* zeigt einen von TIR- bzw. CC-NB-LRR Proteinen so wie temperaturabhängigen Phänotyp (Goa *et al.*, 2009). Durch die Interaktion mit *SNC1*-regulierenden Proteinen könnte dieser Phänotyp erklärt werden, dies bedarf aber weiterer Absicherungen. BAP2 interagiert nicht mit den BIR1, BIP89 oder BAK1, scheint aber auch nicht am Zelltodsignalweg teilzunehmen.

Bei der Betrachtung der Hochregulation der *PR*-Gene gleichen sich die RLK Mutanten und *bon1-1* ebenfalls. Erhöhte SA-Werten sind bei den beiden Linien ebenfalls zu beobachten (He *et al.*, 2007; Hua *et al.*, 2007). Eine Interaktion ist durch die Expressionsdaten als wahrscheinlich erschienen. Die Zeitpunkte der Expression und die Zeitpunkte der Phänotypen liegen gleich. Es erscheint also als höchst wahrscheinlich, dass der BR-unabhängige Zelltodevent in BAK1 Mutanten aus Interaktionen mit *SNC1* regulierenden Proteinen, und damit letztlich aus *SNC1* selbst herrührt.

Somit bleiben auch hier viele Fragen offen, da eine explizite *in vivo* Antwort auf die gestellten Fragen nicht gegeben wurde, was aber erreicht wurde ist den Verdacht weiter zu erhärten.



Differentielle Regulation durch Phosphorylierung und Kalzium

Abbildung 30 Modell der BAK1-BIR1 Interaktion

4.6. Perspektiven

Während diese Zeilen (um)-geschrieben worden sind, wurden die Interaktionen die hier hätten bewiesen werden können, an anderer Stelle bewiesen, und publiziert (Wang, 2011). Diese Interaktion führt zu Phosphorylierungen. Wie oben einführend vermutet und begründet. Eine entscheidende Frage für die Aufklärung der Interaktion zwischen BAK1, bzw. RLKs mit BONZAI Proteinen, und deren Interaktoren bleibt aber bestehen. Wie wird der Zelltod ausgelöst. Dieses Protein, SRFR1 (Supressor of rps4RLD) ist ein Interaktor von SNC1 und RPS4, und ein negativer Regulator von AvrRPS4 induzierter Immunität in RPS6 Mutanten (Gassmann *et al.*, 1999; Aarts *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2009). Mutationen in *SRFR1* führen neben anderen Effekten zur Expression der CNL R-Gene *RPS2* und *RPM1* (Kim *et al.*, 2010).

Literaturverzeichnis

Aarts N., Metz M., Holub E., Staskawicz B. J., Daniels M. J., Jane E. Parker

Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 ;**95**(17):10306-11.

Abe H., Urao T., Ito T., Seki M., Shinozaki K. and Yamaguchi-Shinozaki K.

Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell.* 2003; **15**:63–78.

Abramovitch, R. B., Anderson J. C. and Martin G. B.

Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 ;**7**(8):601-11.

Aderem A. and Ulevitch R. J.

Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000 ;**406**(6797):782-7.

AGI

Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature.* 2000; **408**: 796–815.

Aker J. and de Vries S. C.

Plasma membrane receptor complexes. *Plant Physiol.* 2008; **147**(4):1560-4.

Akira S., Uematsu S. and Takeuchi O.

Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006; **124**(4):783-801.

Albrecht C., Russinova E., Hecht V., Baaijens E. and de Vries S. C.

The Arabidopsis thaliana SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *Plant Cell.* 2005; **17**(12):3337-49. Epub 2005 Nov 11.

Alfano J. R. and Collmer A.

Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol.* 2004; **42**:385-414.

Alfano J. R., Bauer D. W., Milos T. M. and Collmer A.

Analysis of the role of the Pseudomonas syringae pv. syringae HrpZ harpin in elicitation of the hypersensitive response in tobacco using functionally non-polar hrpZ deletion mutations, truncated HrpZ fragments, and hrmA mutations *Mol Microbiol.* 1996 ;**19**(4):715-28.

Altenbach D. and Robatzek S.

Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007; **20**(9):1031-9.

Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishikawa, A., Dixon, R. A. and Lamb, C.

Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell.* 1998; **92**(6):773-84.

Amano Y., Tsubouchi H., Shinohara H., Ogawa M. and Matsubayashi Y.

Tyrosine-sulfated glycopeptide involved in cellular proliferation and expansion in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; **104**(46):18333-8. Epub 2007 Nov 7.

Ananieva E. A., Christov K. N. and Popova L. P.

Exogenous treatment with salicylic acid leads to increased antioxidant capacity in leaves of barley plants exposed to paraquat. *J Plant Physiol.* 2004; **161**:319–328

Arazi T., Sunkar R., Kaplan B. and Fromm H.

A tobacco plasma membrane calmodulinbinding transporter confers Ni²⁺ tolerance and Pb²⁺ hypersensitivity in transgenic plants. *Plant J.* 1999; **20**:171-82.

Argaves W. S., Greene L. M., Cooley M. A., and Gallagher W. M.

Fibulins: physiological and disease perspectives. *EMBO Rep.* 2003; **4**(12):1127-31.

Assaad F. F., Qiu J. L., Youngs H., Ehrhardt D., Zimmerli L., Kalde M., Wanner G., Peck S. C., Edwards H., Ramonell K., Somerville C. R. and Thordal-Christensen H.

The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell.* 2004; **15**(11):5118-29.

Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., and Parker, J.E.

Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* 2002; **295**, 2077–2080

Aviv D. H., Rusterucci C., Holt B. F., Dietrich R. A., Parker J. E., and Dangl J. L.

Runaway cell death, but not basal disease resistance, in *Isd1* is SA- and NIM1/NPR1-dependent. *Plant J.* 2002; **29**(3):381-9

Axtell M. J. and Staskawicz B. J.

Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell.* 2003; **112**: 369–377

Azevedo C., Betsuyaku S., Peart J., Takahashi A., Noel L., Sadanandom A., Casais C., Parker J. and Shirasu K.

Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *EMBO J.* 2006; **25**: 2007–2016

Azevedo C., Sadanandom A., Kitagawa K., Freialdenhoven A., Shirasu K. and Schulze-Lefert, P.

The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science.* 2002; **295**: 2073–2076.

Bai J., Pennill L.A., Ning J., Lee S.W., Ramalingam J., Webb C. A., Zhao B., Sun Q., Nelson J. C., Leach J. E. and Hulbert S. H.

Diversity in nucleotide binding site leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Res.* 2002; **12**: 1871–1884

Bartsch M., Gobbato E., Bednarek P., Debey S., Schultze J. L., Bautor J. and Parker J. E.

Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in *Arabidopsis* immunity and Cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the nudix hydrolase NUDT7. *Plant Cell.* 2006; **18**: 1038–105

Beckers G. J. M., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W. R., He S. Y., Zhang S. and Conrath U

Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* 2009; **21**: 944–953

Bednarek P., Pislewska-Bednarek M., Svatos A., Schneider B., Doubsky J., Mansurova M., Humphry M., Consonni C., Panstruga R., Sanchez-Vallet A., Molina A. and Schulze-Lefert P.

A glucosinolate metabolism pathway in living Plant Cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science.* 2009; **323**: 101–106

Belkhadir Y., Subramaniam R. and Dangl J. L.

Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol.* 2004; **7**: 391–399

Bell A. A.

Biochemical Mechanisms of Disease Resistance *Annual Review of Plant Physiology* 1981; **32**: 21-81

Bent A. F., Kunkel B. N., Dahlbeck D., Brown K. L., Schmidt R., Giraudat J.

RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.* 199; **265**(5180):1856-60.

Bernoux M., Timmers T., Jauneau A., Brière C., de Wit P. J., Marco Y. and Deslandes L.

RD19, an *Arabidopsis* cysteine protease required for RRS1-R-mediated resistance, is relocalized to the nucleus by the *Ralstonia solanacearum* PopP2 effector. *Plant Cell.* 2008; **20**(8):2252-64.

Bieri S., Mauch S., Shen Q.-H., Peart J., Devoto A., Casais C., Ceron F., Schulze S., Steinbiss H.-H Shirasu K. and Schulze-Lefert P.
RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell* 2004, **16**:3480–3495

Blanco F., Garretón V., Frey N., Dominguez C., Pérez-Acle T., Van der Straeten D., Jordana X. and Holuigue L.
Identification of NPR1- dependent and independent genes early induced by salicylic acid treatment in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 2005; **59** :927–44

Blanco F., Salinas P., Cecchini N. M., Jordana X., Van Hummelen P., Alvarez M. E. and Holuigue L.
Early genomic responses to salicylic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 2009; **70**(1-2):79-102.

Blatt M.R., Grabov A., Brearley J., Hammond-Kosack K. and Jones J.D.
K⁺ channels of Cf-9 transgenic tobacco guard cells as targets for *Cladosporium fulvum* Avr9 elicitor-dependent signal transduction *Plant J.* 1999; **19**(4):453-62.

Blixt O., Head S., Mondala T., Scanlan C., Huflejt M. E., Alvarez R., Bryan M. C., Fazio F., Calarese D., Stevens J., Razi N., Stevens D. J., Skehel J. J., van Die I., Burton D. R., Wilson I. A., Cummings R., Bovin N., Wong C. H., Paulson J. C.
Printed covalent glycan array for ligand profiling of diverse glycan binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; **101**(49):17033-8.

Block A., Guo M., Li G., Elowsky C., Clemente T. E. and Alfano J. R.
The *Pseudomonas syringae* type III effector HopG1 targets mitochondria, alters plant development and suppresses plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 2010; **12**:318-30.

Boller T.
Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 2005; **46**, 189-214

Bolton M. D., Van Esse H. P., Vossen J. H., De Jonge R., Stergiopoulos I., Stulemeijer I. J. E., Van Den Berg G. C. M, Borrás-Hidalgo O., Dekker H. L., De Koster H. G., De Wit P. J. G. M., Joosten M. H. A. J. and Thomma B. P. H. J.
The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol.* 2008; **69**(1):119-36. Epub 2008 Apr 28.

Bonas U. and Van den Ackerveken G.
Gene-for-gene interactions: bacterial avirulence proteins specify plant disease resistance. *Curr Opin Microbiol.* 1999; **2**(1):94-8.

Boudsocq M., Willmann M. R., Bush J., Cheng S. H. and Sheen J.
Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases *Nature.* 2010;**464**(7287):418-22

Boudsocq M. and Sheen J.
Stress Signaling II: Calcium Sensing and Signaling; Abiotic Stress Adaptation in Plants Springer 2010, 1, 75-90, 4

Brunner F., Rosahl S., Lee J., Rudd J.J., Geiler C., Kauppinen S., Rasmussen G., Scheel D. and Nürnberger T.
Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *EMBO J.* 2002; **21**(24):6681-8.

Buist G., Steen A., Kok J., and Kuipers O. P.
LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol.* 2008; **68**(4):838-47.

Burch-Smith T. M., Schiff M., Caplan J. L., Tsao J., Czymmek K., Dinesh- Kumar S. P.
A novel role for the TIR domain in association with pathogen-derived elicitors. *PLoS Bio.* 2007; **5**: 501–514

Butterbrodt T., Thurow C. and Gatz C.
Chromatin immunoprecipitation analysis of the tobacco PR-1a- and the truncated CaMV 35S promoter reveals differences in salicylic acid-dependent TGA factor binding and histone acetylation. *Plant Mol Biol.* 2006; **61**(4-5):665-74.

Caldo R. A., Nettleton D. and Wise R. P.

Interaction-dependent gene expression in Mla-specified response to barley powdery mildew. *Plant Cell* 2004; **16**: 2514–2528

Catinot J., Buchala A., Abou-Mansour E. and Métraux J. P.

Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. *FEBS Lett.* 2008; **582**:473–78

Century K. S.

NDR1, a locus of *Arabidopsis thaliana* that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; **92**(14):6597-601.

Chang C. and Shockey J.A.

The ethylene-response pathway: signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol.* 1999; **2**(5):352-8.

Chen Z., Silva H. and Klessig D.F.

Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 1993, **262**:1883–86

Chen Z. Y., Agnew J. L., Cohen J. D., He P., Shan L.B., Sheen J. and Kunkel B. N.

Pseudomonas syringae type III effector AvrRpt2 alters *Arabidopsis thaliana* auxin physiology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; **104**:20131-6.

Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J. D. G., Felix G. and Boller T.

A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature.* 2007; **448**(7152):497-500.

Chini A., Fonseca S., Fernandez G., Adie B., Chico J.M., Lorenzo O., Garcia-Casado G., Lopez-Vidriero I., Lozano F.M., Ponce M.R.,

The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature.* 2007; **448**:666–671.

Chinnusamy V., Ohta M., Kanrar S., Lee B. H., Hong X., Agarwal M. and Zhu J. K.

ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2003; **17**(8):1043-54. Epub 2003 Apr 2.

Chisholm S. T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B. J.

Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell.* 2006; **124**: 803–81

Chung H. S., Koo A. J. K., Gao X., Jayany S., Thines B., Jones A. D. and Howe G. A.

Regulation and function of *Arabidopsis* JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Physiol.* 2008; **146**:952–964.

Colcombet J., Boisson-Dernier A., Ros-Palau R., Vera C. E. and Schroeder J. I.

Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *Plant Cell.* 2005; **17**(12):3350-61.

Collins N. C., Thordal-Christensen H., Lipka V., Bau S., Kombrink E., Qiu J. L., Hükelhoven R., Stein M., Freialdenhoven A., Somerville S. C. and Schulze-Lefert P.

SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature.* 2003; **425**(6961):973-7.

Coppinger P., Repetti P. P., Day B., Dahlbeck D., Mehlert A and Staskawicz B. J.

Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2004; **40**: 225–237

Cooney T. and Nonhebel H.

Biosynthesis of indole-3-acetic acid in tomato shoots: measurement, mass-spectral identification and incorporation of ²H from ²H₂O into indole-3-acetic acid, d- and l-tryptophan, indole-3-pyruvate and tryptamine. *Planta* 1991; **184**: 368–376

Creelman R. A.

Jasmonate perception: characterization of COI1 mutants provides the first clues. *Trends Plant Sci.* 1998; **3**:367–368.

Creutz C. E., Tomsig J. L., Snyder S. L., Gautier M., Skouri F. and Beisson J.

The copines, a novel class of C2 domain-containing, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins conserved from Paramecium to humans. *J Biol Chem.* 1998; **273**(3):1393-402.

Damer C. K., Bayeva M., Hahn E. S., Rivera J. and Socec C. I.

Copine A, a calcium-dependent membrane-binding protein, transiently localizes to the plasma membrane and intracellular vacuoles in Dictyostelium. *BMC Cell Biol.* 2005; **6**:46.

Dangl J.L. and Jones J.D.

Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature.* 2001; **411**(6839):826-33.

Danon A. and Gallois P.

UV-C radiation induces apoptotic-like changes in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* 1998; **437**(1-2):131-6

Dardick C. and Ronald P.

Plant and animal pathogen recognition receptors signal through non-RD kinases. *PLoS Pathog.* 2006; **2**(1):e2.

Day B., Dahlbeck D. and Staskawicz B. J.

NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006; **18**: 2782–2791

Dean J.V. and Mills J.D.

Uptake of salicylic acid 2-O-β-D-glucose into soybean tonoplast vesicles by an ATP-binding cassette transporter-type mechanism. *Physiol Plant.* 2004; **120**:603–12

Dean J. V., Mohammed L. A. and Fitzpatrick T.

The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugates in tobacco *Cell* suspension cultures. *Planta* 2005; **221**:287–96

Dean J. V., Shah R. P. and Mohammed L. A.

Formation and vacuolar localization of salicylic acid glucose conjugates in soybean *Cell* suspension cultures. *Physiol Plant.* 2003; **118**:328–36

de Jonge R. and Thomma B. P. H. J.

Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends Microbiol.* 2009; **17**(4):151-7. Epub 2009 Mar 18.

de Jonge R., van Esse H. P., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., Bours R., van der Krol S., Shibuya N., Joosten M. H. A. J. and Thomma B. P. H. J.

Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants. *Science.* 2010; **329**(5994):953-5

De Smet I. and Jurgens G.

Patterning the axis in plants—Auxin in control. *Curr Opin Genet Dev* 2007; **17**:337–343.

Delaney T. P., Uknes S., Vernooij B., Friedrich L., Weymann K., Negrotto D., Gaffney T., Gut-Rella M., Kessmann H. and Ward, E. et al

A central role of salicylic Acid in plant disease resistance. *Science.* 1994; **266**(5188):1247-50.

Deslandes L., Olivier J., Peeters N., Feng D. X., Khounlotham M., Boucher C., Somssich L., Genin S. and Marco Y.

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.* 2003; **100**: 8024–8029

Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K. D., Carrington J. C. and Voinnet O.

Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science*. 2006; **313**(5783):68-71.

de Torres-Zabala M., Truman W., Bennett M. H., Lafforgue G., Mansfield J. W., Egea P. R., Bögre L. and Grant M.

Pseudomonas syringae pv. tomato hijacks the Arabidopsis abscisic acid signalling pathway. *EMBO J*. 2007; **26**:1434-43.

de Torres M., Mansfield J. W., Grabov N., Brown I. R., Ammouneh H., Tsiamis G., Forsyth A., Robatzek S., Grant M. and Boch J.

Pseudomonas syringae effector AvrPtoB suppresses basal defence in Arabidopsis. *Plant J*. 2006; **47**:368-82.

Devoto A., Nieto-Rostro M., Xie D., Ellis C., Harmston R., Patrick E, Davis J., Sherratt L., Coleman M. and Turner J. G.

COI1 links jasmonate signalling and fertility to the SCF ubiquitin-ligase complex in Arabidopsis. *Plant J*. 2002; **32**:457-466.

DeYoung B. J. and Innes R. W.

The rules of engagement. The XIII International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, Sorrento, Italy, July 2007
New Phytol. 2007; **176**(3):506-10.

Dietrich R. A., Delaney T. P., Uknes S. J., Ward E. R., Ryals J. A., and Dangl J. L.

Arabidopsis mutants simulating disease resistance response. *Cell*. 1994; **77**(4):565-77.

Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., and Hirt H.

Trojan horse strategy in Agrobacterium transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science*. 2007; **318**: 453-456.

Dodds P. N., Lawrence, G. J., Catanzariti A.-M., The T., Wang C.-I. A., Ayliffe M. A., Kobe B. and Ellis J. G.

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*. 2006; **103**: 8888-889

Dombrecht B., Xue G. P., Sprague S. J., Kirkegaard J. A., Ross J. J. , Reid J. B., Fitt G. P., Sewelam N., Schenk P. M., Manners J. M., Kazan K.

MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in Arabidopsis. *Plant Cell* . 2007; **19**:2225-2245.

Dong C., Muriel G. V., Ramirez S., Hutter H., Hedgecock E. M., Breydo L., Baskakov I. V., and Vogel B. E.

Hemicentin assembly in the extracellular matrix is mediated by distinct structural modules. *J Biol Chem*. 2006; **281**(33):23606-10.

Dong X., Mindrinos M., Davis K. R. and Ausubel F. M.

Induction of Arabidopsis defense genes by virulent and avirulent *Pseudomonas syringae* strains and by a cloned avirulence gene. *Plant Cell*. 1991; **3**: 61-72.

Dong X. N.

NPR1, all things considered. *Curr Opin Plant Biol*. 2004; **7**: 547-552.

Dow M., Newman M.A. and von Roepenack E.

THE INDUCTION AND MODULATION OF PLANT DEFENSE RESPONSES BY BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDES. *Annu Rev Phytopathol*. 2000; **38**:241-261.

Dunning F. M., Sun W., Jansen K. L., Helft L. and Bent A. F.

Identification and mutational analysis of Arabidopsis FLS2 leucine-rich repeat domain residues that contribute to flagellin perception. *Plant Cell*. 2007;**19**(10):3297-313.

Duval I., Brochu V., Simard M., Beaulieu C. and Beaudoin N.

Thaxtomin A induces programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells. *Planta*. 2005; **222**(5):820-31. Epub 2005 Jul 15.

Dyer J. H., Zheng L., and Wang X.

Purification and immunological analysis of phospholipase D from castor bean endosperm. *Arch Biochem Biophys*. 1993; **306**(2):486-94.

Ellis C., Karafyllidis I., Wasternack C., and Turner J. G.

The *Arabidopsis* mutant *cev1* links cell wall signaling to jasmonate and ethylene responses. *Plant Cell*. 2002; **14**(7):1557-66.

English D.

Phosphatidic acid: a lipid messenger involved in intracellular and extracellular signalling. *Cell Signal*. 1996; **8**(5):341-7

Ellis J. and Dodds P.

Plant pathology: monitoring a pathogen-targeted host protein. *Curr Biol*. 2003; **13**: R400–R402

Eulgem T.

Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci*. 2005; **10**:71–78

Falk A., Feys B., Frost L. N., Jones J. D. G., Daniels M. J. and Parker J. E.

EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad. Sci. U S A*. 1999; **96**: 3292–3297.

Fan W. and Dong X.

In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 2002; **14**, 1377–1389

Felix G. and Boller T.

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*. 2003; **278**(8):6201-8.

Felix G., Duran J. D. Volko, S. and Boller T.

Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*. 1999; **18**(3):265-76.

Fellbrich G., Romanski A., Varet A., Blume B., Brunner F., Felix G., Kemmerling B., Krzymowska M. and Nürnberger T.

NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J*. 2002; **32**(3):375-90.

Feys B. J., Moisan L. J., Newman M. A. and Parker J. E.

Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J* 2001; **20**: 5400–5411

Feys B. J., Wiermer M., Bhat R. A., Moisan, Medina-Escobar N., Neu, Cabral A. and Parker J. E.

Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*. 2005; **17**(9):2601-13.

Flor H. H.

Host-parasite interactions in flax rust - its genetics and other implications. *Phytopathology*, 1955

Flors V., Ton J., van Doorn R., Jakab G., García-Agustín P. and Mauch-Mani B.

Interplay between JA, SA and ABA signalling during basal and induced resistance against *Pseudomonas syringae* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J*. 2008; **54**(1):81-92.

Franchi L., Warner N., Viani K. and Nunez G.

Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*. 2009; **227**: 106–128

Friml J.

Auxin transport—shaping the plant. *Curr Opin Plant Biol* 2003; **6**:7–12.

Frietsch S., Wang Y. F., Sladek C., Poulsen L. R., Romanowsky S.M., Schroeder J. I. and Harper J. F.

A cyclic nucleotide-gated channel is essential for polarized tip growth of pollen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; **104**: 14531-6

Gampala S. S., Kim T. W., He J. X., Tang W., Deng Z., Bai M. Y., Guan S., Lalonde S., Sun Y., Gendron J. M., Chen H., Shibagaki N., Ferl R. J., Ehrhardt D., Chong K., Burlingame A. L. and Wang Z. Y.

An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in Arabidopsis. *Dev Cell.* 2007; **13**:177–189.

Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., and Zhang Y.

MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Res.* 2008; **18**: 1190–1198.

Gao M., Wang X., Wang D., Xu F., Ding X., Zhang Z., Bi D., Cheng Y. T., Chen S., Li X., and Yuelin Zhang

Regulation of cell death and innate immunity by two receptor-like kinases in Arabidopsis. *Cell Host Microbe.* 2009; **6**(1):34-44.

Garbarino J. E. and Gibbons I. R.

Expression and genomic analysis of midasin, a novel and highly conserved AAA protein distantly related to dynein. *BMC Gen.* 2002, **3**:18

Garcia A.V. and Parker J.E.

Heaven's Gate: nuclear accessibility and activities of plant immune regulators. *Trends Plant Sci.* 2009; **14**: 479–487

Garcion C., Lohmann A., Lamodièrè E., Catinot J., Buchala A., Doermann P. and Métraux J. P.

Characterization and biological function of the ISOCHORISMATE SYNTHASE2 gene of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 2008; **147**, 1279–1287

Garcion C. and Métraux J. P.

Salicylic acid. *Plant Hormone Signaling*, 2006; **24**:229–255.

Gassmann W., Hirsch M. E. and Staskawicz B. J.

The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J.* 1999; **20**(3):265-77.

Geldner N. and Robatzek S.

Plant Receptors Go Endosomal: A Moving View on Signal Transduction. *Plant Phys.* 2008; **147**:1565-1574

Girardin S.E., Sansonetti P.J. and Philpott D.J.

Intracellular vs extracellular recognition of pathogens—common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 2002 ;**10**(4):193-9.

Glazebrook J.

Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis: 2001 status. *Curr Opin Plant Biol.* 2001; **4**, 301–308.

Glazebrook J.

Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol.* 2005; **43**:205-27.

Glazebrook J., Rogers E. E. and Ausubel F. M.

Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics.* 1996; **143**(2):973-82.

Gobert A., Park G., Amtmann A., Sanders D. and Maathuis F. J.

Arabidopsis thaliana cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport. *J Exp Bot.* 2006; **57**:791-800

Goda H., Shimada Y., Asami T., Fujioka S. and Yoshida S.

Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2002; **130**:1319–1334.

Goda H., Sawa S., Asami T., Fujioka S., Shimada Y. and Yoshida S.

Comprehensive comparison of auxin-regulated and brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2004; **134**:1555–1573.

Godfrey S. A. C., Mansfield J. W., Corry D. S., Lovell H. C., Jackson R. W., and Arnold D. L.

Confocal imaging of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola colony development in bean reveals reduced multiplication of strains containing the genomic island PPHGI-1. *Mol Plant Microbe Interact.* 2010; **23**(10):1294-302.

Goel A. K., Lundberg D., Torres M. A., Matthews R., Akimoto-Tomiya C., Farmer L., Dangl J. L. and Grant S. R.

The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008; **21**:361-70

Gomez-Gomez L. and Boller T.

FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell.* 2000; **5**(6):1003-11.

Grant M. R., Godiard L., Straube E., Ashfield T., Lewald J., Sattler A., Innes R. W. and Dangl J. L.

Structure of the *Arabidopsis* RPM1 gene enabling dual specificity disease resistance. *Science.* 1995; **269**(5225):843-6.

Greenberg J. T.

Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; **93**(22):12094-7.

Greenberg J. T. and Yao N.

The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol.* 2004; **6**(3):201-11.

Guilfoyle T. J. and Hagen G.

Auxin response factors. *Curr Opin Plant Biol* 2007; **10**:453– 460.

Guo M., Tian F., Wamboldt Y. and Alfano J. R.

The majority of the type III effector inventory of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 can suppress plant immunity. *Mol Plant Microbe Interact.* 2009; **22**:1069-80.

Gust A. A., Biswas R., Lenz H. D., Rauhut T., Ranf S., Kemmerling B., Gotz, F., Glawischnig E., Lee J., Felix G. and Nürnberger T.

Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. *J Biol Chem.* 2007; **282**(44):32338-48.

Hahlbrock K. and Scheel, D.

Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1989; **40**: 347-369

Halliday K. J.

Plant hormones: The interplay of brassinosteroids and auxin. *Curr Biol* 2004; **14**:R1008–R1010.

Hammond-Kosack K. E. and Jones J. D. G.

Plant disease resistance genes. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1997. **48**:575–607

Hann D. R. and Rathjen J. P.

Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 2007; **49**(4):607-18.

Harper J. F. and Harmon A.

Plants, symbiosis and parasites: a calcium signalling connection. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005; **6**(7):555-66

He J. X., Gendron J. M., Yang Y., Li J., Wang Z. Y.

The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; **99**:10185–10190.

He J. X., Gendron J. M., Sun Y., Gampala S. S., Gendron N., Sun C. Q. and Wang Z. Y.

BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 2005; **307**:1634–1638.

He S. Y., Nomura K. and Whittam T. S.

Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta*. 2004; **1694**(1-3):181-206.

He Z., Wang Z. Y., Li J., Zhu Q., Lamb C., Ronald P., and Chory J.

Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science*. 2000; **288**(5475):2360-3.

Heath M. C.

Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*. 2000; **44**(3):321-34.

Hecht V., Velle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D. L., Boutilier K., Grossniklaus U. and de Vries S. C.

The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*. 2001; **127**(3):803-16.

Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M. E., He K., Li J., Schröder J. I., Peck S. C. and Rathjen J. P.

The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**(29):12217-22.

Holt B.F., Boyes D. C., Ellerström M., Siefers N., Wiig A., Kauffman S., Grant M. R. and Dangl J. L.

An evolutionarily conserved mediator of plant disease resistance gene function is required for normal Arabidopsis development. *Dev Cell*. 2002; **2**: 807–81

Holt B. F., Belkhadir Y. and Dangl J. L.

Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*. 2005; **309**: 929–932

Horvath D. M., Huang D. J., Chua N. H.

Four classes of Salicylate-induced tobacco genes. *Mol. Plant-Microbe Interact*. 1998; **11**:895–905

Hua J.

From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 2009 ;**12**(5):568-73.

Hua J., Grisafi P., Cheng S., and Fink G. R.

Plant growth homeostasis is controlled by the Arabidopsis BON1 and BAP1 genes. *Genes Dev*. 2001; **15**(17):2263-72.

Huang X., Li J., Bao F., Zhang X. and Yang S.

A gain-of-function mutation in the Arabidopsis disease resistance gene RPP4 confers sensitivity to low temperature. *Plant Physiol*. 2010; **154**(2):796-809.

Hubert D. A., Tornero P., Belkhadir Y., Krishna P., Takahashi A., Shirasu K. and Dangl J. L.

Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. *EMBO J*. 2003; **22**: 5679–5689

Huh G. H., Damsz B., Matsumoto T. K., Reddy M. P., Rus A. M., Ibeas J. I., Narasimhan M. L., Bressan R. A. and Hasegawa P. M.

Salt causes ion disequilibrium-induced programmed cell death in yeast and plants. *Plant J*. 2002;**29**(5):649-59.

Ichimura K., Casais C., Peck S.C., Shinozaki K., and Shirasu K.

MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *J Biol Chem*. 2006; **281**(48):36969-76.

Iizasa E., Mitsutomi M. and Nagano Y.

Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. *J Biol Chem.* 2010; **285**(5):2996-3004.

Innes R. W., Bent A. F., Kunkel B. N., Bisgrove S. R. and Staskawicz B.

Molecular analysis of avirulence gene avrRpt2 and identification of a putative regulatory sequence common to all known *Pseudomonas syringae* avirulence genes. *J Bacteriol.* 1993; **175**(15):4859-69.

Jabs T., Tschope M., Colling C., Hahlbrock K. and Scheel D.

Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;**94**(9):4800-5.

Jambunathan N., Siani J. M. and McNellis T.W.

A humidity-sensitive *Arabidopsis* copine mutant exhibits precocious cell death and increased disease resistance. *Plant Cell.* 2001; **13**(10):2225-40.

Jambunathan N. and McNellis T. W.

Regulation of *Arabidopsis* COPINE 1 gene expression in response to pathogens and abiotic stimuli. *Plant Physiol.* 2003; **132**(3):1370-81.

Jeong S., Trotochaud A. E., and Clark S. E.

The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell.* 1999; **11**(10):1925-34.

Jia Y., McAdams S. A., Bryan G. T., Hershey H. P. and Valent B.

Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* 2000; **19**: 4004–4014.

Jimenez J. L., Smith G. R., Contreras-Moreira B., Sgouros J. G., Meunier F. A., Bates P. A. and Schiavo G.

Functional recycling of C2 domains throughout evolution: a comparative study of synaptotagmin, protein kinase C and phospholipase C by sequence, structural and modelling approaches. *J Mol Biol.* 2003; **333**(3):621-39.

Jirage D., Tootle T.L., Reuber T.L., Frost L.N., Feys, B.J., Parker J.E., Ausubel F.M. and Glazebrook, J.

Arabidopsis thaliana PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 1999; **96**: 13583–13588.

Jones J. D. G. and Dangl J. L.

The plant immune system. *Nature.* 2006; **444**, 323-329

Johnson C., Mhatre A. and Arias J.

NPR1 preferentially binds to the DNA-inactive form of *Arabidopsis* TGA2. *Biochim Biophys Acta.* 2008; **1779**(10):583-9.

Kajava A. V.

Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *J Mol Biol.* 1998; **277**(3):519-27.

Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiyama C., Dohmae N., Minami K. T. and Shibuya N.

Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103**(29):11086-91. Epub 2006 Jul 7.

Kalde M., Nuhse T. S., Findlay K. and Peck S. C.

The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* 2007; **104**: 11850–11855

Kanaoka M. M., Pillitteri L. J., Fujii H., Yoshida Y., Bogenschutz N. L., Takabayashi J., Zhu J. K., Torii K. U.

SCREAM/ICE1 and SCREAM2 specify three cell-state transitional steps leading to *Arabidopsis* stomatal differentiation. *Plant Cell.* 2008; **20**(7):1775-85. Epub 2008 Jul 18.

Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, de Vries S.

The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINO STEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell*. 2006; **18**(3):626-38. Epub 2006 Feb 10.

Katsir L., Chung H. S., Koo A. J. K. and Howe G. A.

Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol*. 2008; **11**(4): 428–435.

Katsir L., Schillmiller A.L., Staswick P.E., He S.Y., Howe G.A.

COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008b;**105**:7100–7105.

Kemmerling B., Schwedt A., Rodriguez P., Mazzotta S., Frank M., Qamar S. A., Mengiste T., Betsuyaku S., Parker J. E., Müssig K., Thomma B., Albrecht C., de Vries S., Hirt H., and Nürnberger T.

The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol*. 2007; **17**(13):1116-22.

Kesarwani M., Yoo J. and Dong X.

Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 2007; **144**:336–46

Kim M. G., da Cunha L., McFall A. J., Belkhadir Y., DebRoy S., Dangl J. L. and Makey D.

Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*. 2005; **121**:749-59.

Kim SH, Gao F, Bhattacharjee S, Adiasor JA, Nam JC, and Gassmann W.

The Arabidopsis resistance-like gene SNC1 is activated by mutations in SRFR1 and contributes to resistance to the bacterial effector AvrRps4. *PLoS Pathog*. 2010; **6**(11):e1001172.

Kim S. H., Kwon S. I., Saha D., Anyanwu N. C. and Gassmann W.

Resistance to the *Pseudomonas syringae* effector HopA1 is governed by the TIR-NBS-LRR protein RPS6 and is enhanced by mutations in SRFR1. *Plant Physiol*. 2009; **150**(4):1723-32. Epub 2009 Jun 12.

Kinoshita T., Cano-Delgado A., Seto H., Hiranuma S., Fujioka S., Yoshida S. and Chory J.

Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*. 2005; **433**(7022):167-71.

Knepper C., Savory E. A. and Day B.

Arabidopsis NDR1 Is an Integrin-Like Protein with a Role in Fluid Loss and Plasma Membrane-Cell Wall Adhesion. *Plant Physiol*. 2011; **156**(1):286-300.

Köhler C., Merkle T., Roby D. and Neuhaus G.

Developmentally regulated expression of a cyclic nucleotide-gated channel from *Arabidopsis* indicates its involvement in programmed Cell death. *Planta* 2001; **213**:327-32.

Koga J.

Structure and function of indolepyruvate decarboxylase, a key enzyme in indole-3-acetic acid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta*. 1995, **1249**: 1–13

Koizumi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Tsuji, H. and Shinozaki K.

Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible Cysteine proteinases in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 1993; **129**: 175–182.

Koornneef A., Rindermann K., Gatz C. and Pieterse C. M.

Histone modifications do not play a major role in salicylate-mediated suppression of jasmonate-induced PDF1.2 gene expression. *Commun Integr Biol.* 2008; **1**(2):143-5.

Ktistakis N. T., Brown H. A., Waters M. G., Sternweis P. C., and Roth M. G.

Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol.* 1996; **134**(2):295-306.

Kunkel B. N., Bent A. F., Dahlbeck D., Innes R. W. and Staskawicz B. J.

RPS2, an Arabidopsis disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell.* 1993; **5**(8):865-75.

Kunkel, B. N. and Brooks, D. M.

Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol.* 2002; **5**(4):325-31.

Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T. and Felix G.

The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell.* 2004; **16**(12):3496-507.

Kwon S. I., Kim S. H., Bhattacharjee S., Noh J. J. and Gassmann W.

SRFR1, a suppressor of effector-triggered immunity, encodes a conserved tetratricopeptide repeat protein with similarity to transcriptional repressors. *Plant J.* 2009; **57**(1):109-19.

Kwon S. I., Koczan J. M. and Gassmann W.

Two Arabidopsis *srfr* (suppressor of *rps4*-RLD) mutants exhibit *avrRps4*-specific disease resistance independent of RPS4. *Plant J.* 2004; **40**(3):366-75.

Lam E.

Controlled cell death, plant survival and development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004; **5**(4):305-15.

Laurie-Berry N., Joardar V., Street I. H. and Kunkel B. N.

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.* 2006; **19**(7):789-800

Lebel E., Heifetz P., Thorne L., Uknes S., Ryals J. and Ward E.

Functional analysis of regulatory sequences controlling *PR-1* gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J.* 1998; **16**:223-33

Lecourieux D., Ranjeva R. and Pugin A.

Calcium in plant defence-signalling pathways. *New Phytol.* 2006; **171**(2):249-69

Lee T. F. and McNellis T. W.

Evidence that the BONZAI1/COPINE1 protein is a calcium- and pathogen-responsive defense suppressor *Plant Mol Biol.* 2009; **69**(1-2):155-66.

Lee H. I. and Raskin I.

Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi-nc. *Phytopathology* 1998; **88**:692-97

Lee H. I. and Raskin I.

Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**:36637-42

Li J., Wen J., Lease K. A., Doke J. T., Tax F. E., and Walker J. C.

BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell.* 2002; **110**(2):213-22.

Li J., Nam K. H., Vafeados D. and Chory J.

BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis. *Plant Physiol* 2001, **127**:14-22

Li X., Clarke J. D., Zhang Y. and Dong X.

Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001; **14**(10):1131-9.

Li Y., Gou M., Sun Q. and Hua J.

Requirement of calcium binding, myristoylation, and protein-protein interaction for the Copine BON1 function in Arabidopsis. *J Biol Chem.* 2010; **285**(39):29884-91.

Li Y., Tessaro M. J., Li X., and Zhang Y.

Regulation of the expression of plant resistance gene SNC1 by a protein with a conserved BAT2 domain. *Plant Physiol.* 2010 Jul; **153**(3):1425-34.

Li Y., Yang S., Yang H. and Hua J.

The TIR-NB-LRR gene SNC1 is regulated at the transcript level by multiple factors. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007; **20**(11):1449-56.

Lipka V., Dittgen J., Bednarek P. Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S. and Schulze-Lefert P.

Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in Arabidopsis. *Science.* 2005; **310**: 1180–1183.

Liu Y. L., Burch-Smith T., Schiff M., Feng S. H. and Dinesh-Kumar S. P.

Molecular chaperone Hsp90 associates with resistance protein N and its signaling proteins SGT1 and Rar1 to modulate an innate immune response in Plants. *J Biol Chem.* 2004; **279**: 2101–2108

Loake G. and Grant M.

Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *Curr Opin Plant Biol.* 2007; **10**:466–472

Lorenzo O., Chico J. M., Sanchez-Serrano J. J. and Solano R.

JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2004; **16**:1938–1950.

Lorenzo O. and Solano R.

Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr Opin Plant Biol.* 2005; **8**:532–540.

Lu D., Wu S., Gao X., Zhang Y., Shan L. and He P.

A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; **107**:496-501.

Lu R., Malcuit I., Moffett P., Ruiz M.T., Peart J., Wu A.J., Rathjen J. P., Bendahmane A, Day L. and Baulcombe D .C.

High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* 2003, **22**: 5690–5699

Luan S.

The CBL-CIPK network in plant calcium signaling. *Trends Plant Sci.* 2009; **14**(1):37-42.

Lyst M. J. and Stancheva I.

A role for SUMO modification in transcriptional repression and activation. *Biochem. Soc. Trans.* 2007; **35**:1389–1392

Ma W., Ali R. and Berkowitz G.A.

Characterization of plant phenotypes associated with loss of-function of AtCNGC1, a plant cyclic nucleotide gated cation channel. *Plant Physiol Biochem.* 2006; **44**: 494-505.

Ma W. and Berkowitz G. A.

The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell Microbiol.* 2007; **9**(11):2571-85.

Ma W., Smigel A., Tsai Y. C., Braam J. and Berkowitz G. A.

Innate immunity signaling: cytosolic Ca²⁺ elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein *Plant Physiol.* 2008; **148**(2):818-28.

Mackey D., Belkhadir Y., Alonso J. M., Ecker J. R. and Dangl J. L.

Arabidopsis RIN4 is the target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2 mediated resistance. *Cell.* 2003; **112**: 379–389

Mackey D., Holt B. F., Wiig A. and Dangl J. L.

RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell.* 2002; **108**: 743–754

Mackey D., Belkhadir Y., Alonso J. M., Ecker J. R. and Dangl J. L.

Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell.* 2003; **112**, 379–389.

Mateo A., Funck D., Mühlenbock P., Kular B., Mullineaux P. M. and Karpinski S.

Controlled levels of salicylic acid are required for optimal photosynthesis and redox homeostasis. *J Exp Bot* 2006; **57**:1795–1807

Matsubayashi Y., Ogawa M., Morita A. and Sakagami Y.

An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phyto-sulfokine. *Science.* 2002; **296**(5572):1470-2.

Matsubayashi Y. and Sakagami Y.

Phyto-sulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; **93**(15):7623-7.

Matsubayashi Y., Ogawa M., Kihara H., Niwa M. and Sakagami Y.

Disruption and overexpression of Arabidopsis phyto-sulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol.* 2006; **142**(1):45-53.

McDowell, J.M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J.L., and Holub, E.B. Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in Arabidopsis vary in functional requirements for *NDR1*, *EDS1*, *NPR1* and salicylic acid accumulation. *Plant J.* 2000; **22**, 523–529

Medzhitov R.

Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature.* 2007; **449**(7164):819-26.

Mészáros T., Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardóczy V, Teige M, Koncz C, Peck S, Bögre L.

The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant J.* 2006; **48**: 485–498.

Mindrinos M., Katagiri F., Yu G. L. and Ausubel F. M.

The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell.* 1994; **78**(6):1089-99.

Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu, K. Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H. and Shibuya N.

CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; **104**(49):19613-8.

Mizel S. B., West A. P., and Hantgan R. R.

Identification of a sequence in human toll-like receptor 5 required for the binding of Gram-negative flagellin. *J Biol Chem.* 2003; **278**(26):23624-9.

Monosi B., Wisser R. J., Pennill L. and Hulbert S. H.

Full-genome analysis of resistance gene homologues in rice. *Theor. Appl. Genet.* 2004, **109**: 1434–1447.

Mora-Garcia S., Vert G., Yin Y., Caño-Delgado A., Cheong H. and Chory J.

Nuclear protein phosphatases with Kelch-repeat domains modulate the response to brassinosteroids in Arabidopsis. *Genes Dev.* 2004; **18**:448 – 460.

Mosher R. A., Durrant W. E., Wang D., Song J. and Dong X.

A comprehensive structure-function analysis of Arabidopsis SNI1 defines essential regions and transcriptional repressor activity. *Plant Cell.* 2006; **18**(7):1750-65.

Mou Z. L., Fan W. H. and Dong X.

Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell.* 2003; **113**:935–944

Mukherjee A. K., Lev S., Gepstein S. and Horwitz B. A.

A compatible interaction of *Alternaria brassicicola* with Arabidopsis thaliana ecotype DiG: evidence for a specific transcriptional signature. *BMC Plant Biol.* 2009; **9**:31.

Mussig C., Fischer S. and Altmann T.

Brassinosteroid-regulated gene expression. *Plant Physiol.* 2002; **129**:1241–1251.

Nakamura A., Higuchi K., Goda H., Fujiwara M. T., Sawa S., Koshiba T., Shimada Y. and Yoshida S.

Brassinolide induces IAA5, IAA19, and DR5, a synthetic auxin response element in Arabidopsis, implying a cross talk point of brassinosteroid and auxin signaling. *Plant Physiol.* 2003; **133**:1843–1853.

Nakayama T., Yaoi T. and Kuwajima G.

Localization and subcellular distribution of N-copine in mouse brain. *J Neurochem.* 1999; **72**(1):373-9.

Nalefski E. A. and Falke J. J.

The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci.* 1996; **5**(12):2375-90.

Nam K. H. and Li J.

BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell.* 2002; **110**(2):203-12.

Navarro L., Jay F., Nomura K., He S. Y. and Voinnet O.

Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science.* 2008; **321**:964-7.

Navarro L., Zipfel C., Rowland O., Keller I., Robatzek S., Boller T. and Jones J. D.

The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol.* 2004; **135**: 1113–1128

Nemhauser J. L., Hong F. and Chory J.

Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell.* 2006; **126**:467–475

Nemhauser J. L., Mockler T. C. and Chory J.

Interdependency of brassinosteroid and auxin signaling in Arabidopsis. *PLoS Biol* 2004; **2**:E258.

Nishimura M. T. and Dangl J.L.

Arabidopsis and the plant immune system *The Plant Journal.* 2010; **61**: 1053–1066

Nishimura M. T., Stein M., Hou B. H., Vogel J. P., Edwards H. and Somerville S. C.

Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science.* 2003; **301**: 969–972.

Noutoshi Y, Ito T, Seki M, Nakashita H, Yoshida S, Marco Y, Shirasu K, Shinozaki K.

A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1 (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant J.* 2005; **43**(6):873-88.

Nozue K. and Maloof J. N.

Diurnal regulation of plant growth. *Plant Cell Environ.* 2006; **29**:396–408

Nürnberg T., Brunner F., Kemmerling B. and Piater L.

Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev.* 2004; **198**:249-66.

Ogasawara Y., Kaya H., Hiraoka G., Yumoto F., Kimura S., Kadota Y., Hishinuma H., Senzaki E., Yamagoe S., Nagata K., Nara M., Suzuki K., Tanokura M. and Kuchitsu K.

Synergistic activation of the Arabidopsis NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J Biol Chem.* 2008; **283**:8885-8892.

Oldroyd G. E. and Staskawicz B. J.

Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**(17):10300-5.

Palma K., Zhang Y. L. and Li X.

An importin alpha homolog, MOS6, plays an important role in plant innate immunity. *Curr Biol.* 2005; **15**: 1129–1135

Pan Q, Wendel J and Fluhr R.

Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol.* 2000;**50**(3):203-13.

Pandey S.P. and Somssich I.E.

The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant Physiol.* 2009; **150**: 1648–1655

Parker J. E., Holub E. B., Frost L. N., Falk A., Gunn N. D. and Daniels M. J.

Characterization of eds1, a mutation in Arabidopsis suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell.* 1996; **8**(11):2033-46.

Patten C. L. and Glick B.R.

Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid *Can J Microbiol.* 1996; **42**: 207–220

Pavli O. I., Kelaidi G. I., Tampakaki A. P. and Skaracis G. N.

The hrpZ gene of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola enhances resistance to rhizomania disease in transgenic *Nicotiana benthamiana* and sugar beet. *PLoS One.* 2011; **6**(3):e17306.

Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S and Van Wees SC.

Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol.* 2009; **5**(5):308-16.

Pitzschke A., Schikora A., and Hirt H.

MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol.* 2009a; **12**: 421–426.

Pitzschke A., Djamei A., Bitton F. and Hirt H.

A major role of the MEKK1 -MKK1/2 -MPK4 pathway in ROS signalling. *Mol Plant.* 2009b; **2**: 120–137.

Pennell R. I. and Lamb C.

Programmed cell death in plants. *Plant Cell.* 1997; **9**(7):1157-1168.

Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M. and Dinesh-Kumar S.P.

MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev.* 2009; **23**: 80–92.

Popova L. P., Maslenkova L. T., Yordanova R. Y., Ivanova A. P., Krantev A. P., Szalai G. and Janda T.

Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Biochem* 2009; **47**:224–231

Prell, H. H. and Day, P. R.

Plant-fungal pathogen interaction: a classical and molecular view. *Springer* 2001

- Qiu J., Zhou L., Yun B., Nielsen H. B., Fiil B. K., Petersen K., MacKinlay J., Loake G. J., Mundy J. and Morris P.C.**
Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiol.* 2008; **148**: 212–222.
- Rao M. V. and Davis K. R.**
Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid. *Plant J.* 1999; **17**(6):603-14.
- Ren D., Yang K., Li G., Liu Y. and Zhang S.**
Activation of Ntf4, a tobacco mitogen-activated protein kinase, during plant defense response and its involvement in hypersensitive response-like Cell death. *Plant Physiol.* 2006; **141**: 1482–1493.
- Robatzek S., Chinchilla D. and Boller T.**
Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in Arabidopsis. *Genes Dev.* 2006; **20**(5):537-42.
- Rochon A., Boyle P., Wignes T., Fobert P. R. and Després C.**
The coactivator function of *Arabidopsis* NPR1 requires the core of its BTB/POZ domain and the oxidation of C-terminal cysteines. *Plant Cell* 2006; **18**:3670–8
- Ross, A. F.**
Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology.* 1961; **14**:329-39.
- Ross, A. F**
Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology.* 1961; **14**:340-58.
- Russinova E., Borst J. W., Kwaitaal M., Cano-Delgado A., Yin Y., Chory J., and de Vries S. C.**
Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell.* 2004; **16**(12):3216-29.
- Ryu H., Kim K., Cho H., Park J., Choe S. and Hwang I.**
Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell.* 2007; **19**:2749–2762.
- Sadler J. E.**
Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem.* 1998; **67**:395-424.
- Schaffer F. Q. and Buettner G. R.**
Redox environment of the Cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/ glutathione couple. *Free Rad Biol Med.* 2001; **30**:1191–1212
- Schlumbaum A., Mauch F., Vögeli U. and Boller T.**
Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 1986; **324**:365-367;
- Schmidt E. D., Guzzo F., Toonen M. A., and de Vries S. C.**
A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.* 1997; **124**(10):2049-62.
- Schneider, D. S.**
Plant immunity and film Noir: what gumshoe detectives can teach us about plant-pathogen interactions. *Cell.* 2002; **109**(5):537-40
- Schulze-Lefert P.**
Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol.* 2004. **14**: R22–R24.
- Segonzac C. and Zipfel C.**
Activation of plant pattern-recognition receptors by bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2011;**14**(1):54-61.

Serino G. and Deng X. W.

THE COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu Rev Plant Biol.* 2003; **54**: 165–182

Serrano M., Robatzek S., Torres M., Kombrink E., Somssich I. E., Robinson M. and Schulze-Lefert P

Chemical interference of pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses in Arabidopsis reveals a potential role for fatty-acid synthase type II complex-derived lipid signals. *J Biol Chem.* 2007; **282**: 6803–681

Shang Y. L., Li X. Y., Cui H. T., He P., Thilmony R., Chintamanani S., Zwiesler-Vollick J., Gopalan S., Tang X. and Zhou J. M.

RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; **103**:19200-5.

Sheldrake A.R.

The production of hormones in higher plants. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 1973; **48**: 509–559

Shen Q. H., Saijo Y., Mauch S., Biskup C., Bieri S., Keller B., Seki H., Ulker B., Somssich I. E. and Schulze-Lefert P.

Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease resistance responses. *Science.* 2007; **315**: 1098–1103

Shen Q. H. and Schulze-Lefert P.

Rumble in the nuclear jungle: compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors. *EMBO J.* 2007; **26**(20):4293-301.

Shen Q. H., Zhou F. S., Bieri S., Haizel T., Shirasu K. and Schulze-Lefert P.

Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley Mla disease resistance genes to the powdery mildew fungus. *Plant Cell.* 2003; **15**:732–744

Shirasu K., Lahaye T., Tan M. W., Zhou F., Azevedo C., and Schulze-Lefert P.

A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell.* 1999; **99**(4):355-66.

Shirasu K. and Schulze-Lefert P.

Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends Plant Sci.* 2003; **8**: 252–258

Shirasu K.

The HSP90-SGT1 chaperone complex for NLR immune sensors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; **60**: 139–164

Shiu S.H. and Bleecker A. B.

Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; **98**(19):10763-8.

Shiu S. H., Karlowski W. M., Pan R., Tzeng Y. H., Mayer K. F. and Li W. H.

Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *Plant Cell.* 2004; **16**(5):1220-34.

Smith K. D., Andersen-Nissen E., Hayashi, Barrett S. L., Cookson B. T. and Aderem A. F.

Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol.* 2003; **4**(12):1247-53.

Song J. T.

Induction of a salicylic acid glucosyltransferase, AtSGT1, is an early disease response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cells* 2006, **22**:233–38

Spaepen S., Vanderleyden J. and Remans R.

Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiol Rev.* 2007; **31**: 425–448

Spoel S.H., Johnson J.S. and Dong X.

Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; **104**(47):18842-7.

Staswick P. E., Yuen G. Y. and Lehman C. C.

Jasmonate signaling mutants of Arabidopsis are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. *Plant J.* 1998; **15**(6):747-54.

Stein M., Dittgen J., Sanchez-Rodriguez C., Hou B.H., Molina A., Schulze-Lefert P., Lipka V. and Somerville S.

Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell.* 2006; **18**: 731–746.

Stokes T. L., Kunkel B. N. and Richards E. J.

Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev.* 2002; **16**(2):171-82.

Strawn M. A., Marr S. K., Inoue K., Inada N., Zubieta C. and Wildermuth M. C.

Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *J Biol Chem.* 2007; **282**:5919–33

Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S. H., Jester P. J., Zhang S., Bent A. F. and Krysan P. J.

MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* 2007; **143**: 661–669.

Sunkar R., Kaplan B., Bouche N., Arazi T., Dolev D., Talke I. N., Maathuis F. J., Sanders D., Bouchez D. and Fromm H.

Expression of a truncated tobacco NtCBP4 channel in transgenic plants and disruption of the homologous Arabidopsis CNGC1 gene confer Pb²⁺ tolerance. *Plant J.* 2000; **24**:533-42

Sutton R.B., Davletov A., Berghuis A. M., Sudhof T. C. and Sprang S. R.

Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell.* 1995; **80**(6):929-38.

Sutton R. B., Ernst J. A. and Brunger A. T.

Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagminIII. Implications for Ca⁽⁺²⁾-independent snare complex interaction. *J Cell Biol.* 1999; **147**(3):589-98.

Swidzinski J. A., Sweetlove L. J. and Leaver C. J.

A custom microarray analysis of gene expression during programmed cell death in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 2002; **30**(4):431-46.

Tada Y., Spoel S. H., Pajerowska-Mukhtar K., Mou Z., Song J., Wang C., Zuo J. and Dong X.

Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 2008; **321**, 952–956

Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.

The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2007; **19**:805–818.

Takai R., Isogai A., Takayama S. and Che F. S.

Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Mol Plant Microbe Interact.* 2008; **21**(12):1635-42.

Tang X., Frederick R. D., Zhou J., Halterman D. A., Jia Y. and Martin G. B.

Initiation of plant disease resistance by physical interaction of Avr compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell.* 1996; **15**, 317–330

Thiele K., Wanner G., Kindzierski V., Jürgens G., Mayer U., Pachel F. and Assaad F. F.

The timely deposition of callose is essential for cytokinesis in Arabidopsis. *Plant J.* 2008; **58**(1): 13–26

Thines B., Katsir L., Melotto M., Niu Y., Mandaokar A., Liu G., Nomura K., He S.Y., Howe G.A., Browse J.
JAZ repressor proteins are targets of the SCF^{COI1} complex during jasmonate signalling. *Nature*. 2007; **448**:661–665.

Thomashow M. F.

PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1999 Jun; **50**:571-599.

Thomma B., Eggermont K., Penninckx I., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A. and Broekaert W. F.

Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J*. 1999; **19**(2):163-71.

Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., and Collinge D. B.

Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J, epubl.*, 2002, DOI: 10.1046/j.1365-313X.1997.11061187

Tian D., Traw M. B., Chen J. Q., Kreitman M. and Bergelson J.

Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 2003; **423**(6935):74-7.

Ting J. P., Kastner D. L. and Hoffman H. M.

CATERPILLERS, pyrin and hereditary immunological disorders. *Nat Rev Immunol*. 2006; **6**: 183–195.

Tomsig J. L. and Creutz C. E.

Biochemical characterization of copine: a ubiquitous Ca²⁺-dependent, phospholipid-binding protein. *Biochemistry*. 2000; **39**(51):16163-75.

Tomsig J. L., Snyder S. L. and Creutz C. E.

Identification of targets for calcium signaling through the copine family of proteins. Characterization of a coiled-coil copine-binding motif. *J Biol Chem*. 2003; **278**(12):10048-54.

Tomsig J. L., Sohma H. and Creutz C. E.

Calcium-dependent regulation of tumour necrosis factor- α receptor signalling by copine *Biochem J*. 2004; **378**(Pt 3):1089-94.

Tor M., Gordon P., Cuzick A., Eulgem T., Sinapidou E., Mert-Turk F., Can C., Dangl J.L., and Holub E.B. *Arabidopsis* SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* 2002; **14**, 993–1003

Tornero P., Merritt P., Sadanandom A., Shirasu K., Innes R.W. and Dangl J.L.

RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in *Arabidopsis*, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell*. 2002; **14**: 1005–1015

Trotochaud A. E., Hao T., Wu G., Yang Z. and Clark S. E.

The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell*. 1999; **11**(3):393-406.

Tsuda K., Sato M., Stoddard T., Glazebrook J. and Katagiri F.

Network properties of robust immunity in plants *PLoS Genet*. 2009; **5**(12):e1000772. Epub 2009 Dec 11.

Tsuda K., Sato M., Glazebrook J., Cohen J. D. and Katagiri F.

Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. *Plant J*. 2008; **53**: 763–775

Thurrow C., Schiermeyer A., Krawczyk S., Butterbrodt T., Nikolov K. and Gatz C.

Tobacco bZIP transcription factor TGA2.2 and related factor TGA2.1 have distinct roles in plant defense responses and plant development. *Plant J*. 2005; **44**:100–13

Underhill D. M.

Toll-like receptors: networking for success. *Eur J Immunol*. 2003; **33**(7):1767-75.

Underwood W. and Somerville S.C.

Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot.* 2008; **9**(59): 3501–3508.

Underwood W., Zhang S. and He S. Y.

The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 2007; **52**: 658-672.

Ulker B. and Somssich I. E.

WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Curr Opin Plant Biol.* 2004; **7**: 491–498

van den Burg H. A., Harrison S. J., Joosten M. H. A. J., Vervoort J. and de Wit P. J. G. M.

Cladosporium fulvum Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection. *Mol Plant Microbe Interact.* 2006; **19**(12):1420-30.

van den Burg H. A. and Takken F. L.

Does chromatin remodeling mark systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* 2009; **14**(5):286-94.

van der Biezen E. A., Freddie C. T., Kahn K., Parker J. E. and Jones J. D.

Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *Plant J.* 2002; **29**(4):439-51.

Van der Hoorn R. A., Wulff B. B., Rivas S., Durrant M. C., van der Ploeg A., De Wit P. J., and Jones J. D.

Structure-function analysis of cf-9, a receptor-like protein with extracytoplasmic leucine-rich repeats. *Plant Cell.* 2005; **17**(3):1000-15.

van Esse H. P., Bolton M. D., Stergiopoulos I., de Wit P. J. and Thomma B. P.

The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Microbe Interact.* 2007; **20**(9):1092-101.

Vanholme B., Grunewald W., Bateman A., Kohchi T, Gheysen G.

The tify family previously known as ZIM. *Trends Plant Sci.* 2007; **12**:239–244.

Van Loon L.C. and Van Kammen A.

Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus *Virology*, 1970; **40**: 199–211.

van Loon L.C., Bakker P.A. and Pieterse C.M.

Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol.* 1998; **36**:453-83.

van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.

Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol.* 2006; **44**:135-62

Vasu S. K. and Forbes D. J.

Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 2001; **13**: 363–375

Verberne M. C., Verpoorte R., Bol J. F., Mercado-Blanco J., Linthorst H. J. M.

Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance. *Nat. Biotech.* 2000; **18**:779–83

Vert G., Nemhauser J. L., Geldner N., Hong F. and Chory J.

Molecular mechanisms of steroid hormone signaling in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005; **21**:177-201.

Vert G. and Chory J.

Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 2006; **441**:96–100.

Vert G., Walcher C. L., Chory J. and Nemhauser J. L.

Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; **105**(28):9829–34.

Vijayan P., Shockey J., Levesque C. A., Cook R. J. and Browse J.

A role for jasmonate in pathogen defense of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; **95**(12):7209–14.

Vlot A. C., Dempsey D. A. and Klessig D.F.

Salicylic Acid, a Multifaceted Hormone to Combat Disease Annu. Rev. Phytopathol. 2009. **47**:177–206

Vlot A. C., Klessig D. F. and Park S. W.

Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). *Curr Opin Plant Biol.* 2008; **11**: 436–442

Vogel B. E. and Hedgecock E. M.

Hemicentin, a conserved extracellular member of the immunoglobulin superfamily, organizes epithelial and other cell attachments into oriented line-shaped junctions. *Development.* 2001; **128**(6):883–94.

Vongs A., Kakutani T., Martienssen R. A. and Richards E. J.

Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science.* 1993; **260**(5116):1926–8.

Walther T. C., Askjaer P., Gentzel M., Habermann A., Griffiths G., Wilm M., Mattaj I. W. and Hetzer M.

RanGTP mediates nuclear pore complex assembly. *Nature.* 2003; **424**: 689–694

Wan J., Zhang X. C., Neece D., Ramonell K. M., Clough S., Kim S. Y., Stacey M.G. and Stacey G.

A LysM receptor-like kinase plays a critical role in chitin signaling and fungal resistance in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2008; **20**(2):471–81.

Wang D., Weaver N. D., Kesarwani M. and Dong X. N.

Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science.* 2005; **308**: 1036–104

Wang D., Amornsiripanitch N. and Dong X.

A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants. *PLoS Pathogens.* 2006; **2**:1042–50

Wang L., Mitra R. M., Hasselmann K. D., Sato M., Lenarz-Wyatt L., Cohen J. D., Katagiri F. and Glazebrook J.

The genetic network controlling the Arabidopsis transcriptional response to Pseudomonas syringae pv. maculicola: roles of major regulators and the phytotoxin coronatine. *Mol. Plant Microbe Interact.* 2008; **21**, 1408–1420

Wang Z. Y., Nakano T., Gendron J., He J., Chen M., Vafeados D., Yang Y., Fujioka S., Yoshida S. and Asami T., Chory J.

Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell.* 2002; **2**:505–513

Wang Z. Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S. and Chory J.

BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature.* 2001; **410**(6826):380–3.

Wei Z.M., Laby R. J., Zumoff C.H., Bauer D. W., He S. Y., Collmer A. and Beer S. V.

Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science.* 1992; **257**(5066):85–8.

Whalen M. C., Innes R. W., Bent A. F. and Staskawicz B. J.

Identification of Pseudomonas syringae pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean. *Plant Cell.* 1991; **3**(1):49–59.

Wiermer M., Feys B. J., Parker J. E.

Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 383–389

Wiermer M., Germain H., Cheng Y. T., García A. V., Parker J. E. and Li X.

Nucleoporin MOS7/Nup88 contributes to plant immunity and nuclear accumulation of defense regulators. *Nucleus*. 2010; **1**(4):332-336.

Wildermuth M. C.

Variations on a theme: synthesis and modification of plant benzoic acids. *Curr Opin Plant Biol*. 2006; **9**:288–96

Wildermuth M. C., Dewdney J., Wu G. and Ausubel F. M.

Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* 2001; **414**:562–71

Wirthmueller L., Zhang Y., Jones J. D. G. and Parker J.

Nuclear signaling by the Arabidopsis immune receptor RPS4 requires EDS1. 2007; **17**(23): 2023-2029

Wittaker C. A. and Hynes R. O.

Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell*. 2002; **13**(10):3369-87.

Woodward A. W. and Bartel B.

Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot (Lond)* 2005; **95**: 707–735

Xiang T., Zong N., Zhang J., Chen J., Chen M. and Zhou J. M.

BAK1 is not a target of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto. *Mol Plant Microbe Interact*. 2011; **24**(1):100-7.

Xie D.X., Feys B.F., James S., Nieto-Rostro M. and Turner J.G.

COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*. 1998; **280**:1091–1094.

Xing D. and Chen Z.

Effects of mutations and constitutive overexpression of EDS1 and PAD4 on plant resistance to different types of microbial pathogens. *Plant Sci*. 2006; **171**, 251–262

Xu L., Liu F., Lechner E., Genschik P., Crosby W. L., Ma H., Peng W., Huang D. and Xie D.

The SCF^{COI1} ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2002; **14**:1919–1935.

Xu Q., Xu X., Zhao Y., Jiao K., Herbert S. J. and Hao L.

Salicylic acid, hydrogen peroxide and calcium-induced saline tolerance associated with endogenous hydrogen peroxide homeostasis in naked oat seedlings. *Plant Growth Regul*. 2008; **54**:249–259

Xu Q., Zhou B., Ma C., Xu X., Xu J., Jiang Y., Liu C., Li G., Herbert S. J. and Hao L

Salicylic acid-altering arabidopsis mutants response to NO(2) exposure. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2010; **84**(1):106-11.

Yadav R. K., Girke T., Pasala S., Xie M. and Reddy G. V.

Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; **106**(12):4941-6.

Yaeno T. and Iba K.

BAH1/NLA, a RING-type ubiquitin E3 ligase, regulates the accumulation of salicylic acid and immune responses to *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol*. 2008, **148**, 1032–1041

Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K.

Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annu Rev Plant Biol*. 2006; **57**:781-803

Yamasaki K., Kigawa T., Inoue M., Tateno M., Yamasaki T., Yabuki T., Aoki M., Seki I., Matsuda T., Tomo Y., Hayami N., Terada T., Shirouzu M., Tanaka A., Seki M., Shinozaki K. and Yokoyama S.

Solution structure of an Arabidopsis WRKY DNA binding domain. *Plant Cell*. 2005; **17**: 944–956

Yan Y., Stolz S., Chetelat A., Reymond P., Pagni M., Dubugnon L. and Farmer E.E.

A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *Plant Cell*. 2007; **19**:2470–2483.

Yang H., Matsubayashi Y., Nakamura K. and Sakagami Y.

Oryza sativa PSK gene encodes a precursor of phytosulfokine-alpha, a sulfated peptide growth factor found in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; **96** (23):13560-5.

Yang H., Li Y. and Hua J.

The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in Arabidopsis. *Plant J*. 2006; **48** (2):238-48.

Yang H., Yang S., Li Y. and Hua J.

The Arabidopsis BAP1 and BAP2 genes are general inhibitors of programmed cell death. *Plant Physiol*. 2007; **145** (1):135-46.

Yang S. and Hua J.

A haplotype-specific Resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in Arabidopsis. *Plant Cell*. 2004; **16** (4):1060-71.

Yang, Y., Shah, J. and Klessig, D. F.

Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev*. 1997; **11** (13):1621-39.

Yi H. and Richards E. J.

A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell*. 2007; **19** (9):2929-39.

Yi H. and Richards E. J.

Gene duplication and hypermutation of the pathogen Resistance gene SNC1 in the Arabidopsis bal variant. *Genetics*. 2009; **183** (4):1227-34.

Yin Y., Wu D., and Chory J.

Plant receptor kinases: systemin receptor identified. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99** (14):9090-2.

Yin Y., Mora-Garcia S., Li J., Yoshida S., Asami T. and Chory J.

BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. 2002; **109**:181–191.

Yin Y., Vafeados D., Tao Y., Yoshida S., Asami T. and Chory J.

A new class of transcription factors mediates brassinosteroid regulated gene expression in Arabidopsis. *Cell* 2005; **120**:249–259.

Yu D., Chen C. and Chen Z.

Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. *Plant Cell*. 2001;**13**(7):1527-40.

Yu G. L., Katagiri F. and Ausubel F. M.

Arabidopsis mutations at the RPS2 locus result in loss of resistance to Pseudomonas syringae strains expressing the avirulence gene avrRpt2. *Mol Plant Microbe Interact*. 1993; **6** (4):434-43.

Zhang J., Shao F., Cui H., Chen L. J., Li H. T., Zuo Y., Long C., Lan L., Chai J., Chen S., Tang X. and Zhou J. M.

A Pseudomonas syringae effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-Induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 2007; **1**:175-85.

Zhang J., Li W., Xiang T., Liu Z., Laluk K., Ding X., Zou Y., Gao M., Zhang X., Chen S., Mengiste T., Zhang Y. and Zhou J.M.
Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell Host Microbe*. 2010; **7**(4):290-301.

Zhang J. and Zhou J. M.

Plant immunity triggered by microbial molecular signatures. *Mol Plant*. 2010;**3**(5):783-93.

Zhang Y., Goritschnig S., Dong X. and Li X.

A gain-of-function mutation in a plant disease resistance gene leads to constitutive activation of downstream signal transduction pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell*. 2003; **15** (11):2636-46.

Zhang Y. and Li X.

A putative nucleoporin 96 Is required for both basal defense and constitutive resistance responses mediated by suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell*. 2005; **17** (4):1306-16.

Zhao J., Peng P., Schmitz R. J., Decker A. D., Tax F. E. and Li J.

Two putative BIN2 substrates are nuclear components of brassinosteroid signaling. *Plant Physiol*. 2002; **130**:1221–1229.

Zhu Y., Qian W. and Hua J.

Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins *PLoS Pathog*. 2010; **6** (4):e1000844.

Zhu Y., Yang H., Mang H. and Hua J.

Induction of BAP1 by a moderate decrease in temperature is mediated by ICE1 in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2011; **155** (1):580-8.

Webnachweise

www.arabidopsis.org

<http://bbc.botany.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb>

<http://www.cls.zju.edu.cn/pair/interaction>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd>

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Das Zick Zack Modell.....	9
Abbildung 2 Homologie der SERK Proteinfamilie.	11
Abbildung 3 Ca ²⁺ abhängige Signaltransduktion in Pflanzenimmunsystemen. Signaldiversifikation	13
Abbildung 4 Reaktion nach Aktivierung des FLS2 Rezeptors.....	15
Abbildung 5 SNC1.....	28
Abbildung 6 Copine.	31
Abbildung 7 BAP1; BAP2,	33
Abbildung 8 Pflanzen.	51
Abbildung 9 BAK1 Interaktionsvorhersage.....	53
Abbildung 10 BIP89 Interaktionsvorhersage.....	54
Abbildung 11 BIR1 Interaktionsvorhersage.....	55
Abbildung 12 SNC1 Expressionsdaten.	56
Abbildung 13 BON1 Expressionsdaten.....	58
Abbildung 14 BON3 Expressionsdaten.....	60
Abbildung 15 BAP1 Expressionsdaten	61
Abbildung 16 BAK1 Expressionsdaten	63
Abbildung 17 BIP89 Expressionsdaten.....	64
Abbildung 18 BIR1 Expressionsdaten.....	66
Abbildung 19 Hefe 2-hybridversuche: BAK1s eine entsprechende Dokumentation.....	69
Abbildung 20 Hefe 2-hybridversuche: BIP89s	70
Abbildung 21 Hefe 2-hybridversuche: BIR1s.	70
Abbildung 22 Multisitegateway System.....	71
Abbildung 23 BiFC.....	72
Abbildung 24 <i>bak1-3-SNC1</i> Expression.	73
Abbildung 25 <i>bak1-3</i> Mutanten -PR1 Expression.	74
Abbildung 26 <i>bip89-3 SNC1</i> Expression	74
Abbildung 27 <i>bip89-3 PR1</i> Expression	75
Abbildung 28 q-PCR-SNC1 mittels „SNC1 Published by Li“	76
Abbildung 29 <i>Alternaria brassicicola</i> Infektionsversuch.	77
Abbildung 30 Modell der BAK1-BIR1-BON1 Interaktion	89

Zusammenfassung

BAK1 ist ein Corezeptor für viele verschiedene Rezeptoren in *Arabidopsis thaliana*. Diese Rezeptoren binden an Brassinosteroide und bakterielle Effektoren. Die Kinasedomäne BAK1 ist im Anschluss für die Signaltransduktion verantwortlich. BKK1 ist ein konserviertes BAK1 Homolog und weist die selben Eigenschaften auf. Vorarbeiten identifizierten eine Serie weiterer Rezeptoren, darunter BIR1 und BIP89, die mit BAK1 interagieren. Die Mutanten *bir1* und *bak1* zeigen wie die Doppelmutante *bak1/bkk1* Zelltod. Dieser ist SA abhängig, und deutet auf die Aktivität eines R-Proteins hin. R-Proteine sind die zweite Klasse von Immunrezeptoren (neben den Oberflächenrezeptoren). Eines davon, SNC1, ist ein R-Protein ohne bekannten Liganden, seine Inhibitoren binden nicht direkt an, sind aber membranständig. Die Grundidee ist das diese Inhibitoren mit BAK1/BIR1/BKK1 interagieren, dort spezifisch phosphoryliert werden, und so SNC1 über einen unbekanntem Mechanismus inhibieren.

Vorhersage tools wie PAIR lassen darauf schließen das an der Membran ein komplexes Netzwerk aus Interaktionen verschiedenster Proteine vorliegt. In diesem Netzwerk, dass letztlich für die Veränderung der Genexpression vieler Gene verantwortlich sein wird spielen neben LRR-Membran Rezeptorkinasen, MAPK, Copinen und R-Proteinen auch mehrere Transkriptionsfaktoren eine entscheidende Rolle.

Die Durchführung von Y2H Experimenten zeigt eine Verbindung zwischen den Proteinen an der Membran. Es werden diverse Protein Protein Interaktionen in Hefe nachgewiesen. Weiters werden die Mutanten in Bezug auf PR1 Expression, SNC1 Expression und der Reaktion auf *Alternaria brassicicola* untersucht. Die Daten deuten auf eine Interaktion in vivo hin. Weiters werden mithilfe von Microarray Daten argumente für eine mögliche Interaktion in vivo gesammelt, so erscheinen die Interaktionskandidaten durchweg als koreguliert und in den selben Geweben exprimiert, was ebenfalls darauf hindeutet das hier eine Interaktion stattfindet.

Allgemeine Anmerkung.

Diese Arbeit wurde selbstständig und ohne Verwendung irregulärer Hilfsmittel erstellt. In diesem Sinne wurden die verwendeten Quellen nach bestem Wissen und Gewissen angegeben und sind in der bestmöglichen Form im Literaturverzeichnis zu finden. Sollte es dennoch zur unbewussten Übernahmen von Fremdquellen ohne Angabe der Selbigen gekommen sein, werden sie als Korrektur angefügt.

Danksagung

Dank an allen Kollegen und Betreuern für Geduld, Hilfe und freundliche Aufnahme. Dank an alle Tübinger Kollegen für viele schöne Stunden und Tage. Dank speziell an Birgit Kemmerling und Thierry Halter, für kritische Diskussion meiner Position, aber auch für viel Verständnis. Dank ebenfalls an meine Eltern, meine Familie und meine Schwester für die mir zuteil gewordene Unterstützung.