

Isolierung und Charakterisierung des *ERPI*-Gens aus *Arabidopsis thaliana*
im Rahmen von Untersuchungen zur Nichtwirtsresistenz gegenüber
Phytophthora infestans

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr.rer.nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biologin Michaela Kopischke
geboren am 14.04.1983 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Holger Deising (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Prof. Dr. Peter Dörmann (Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn)

Datum der Verteidigung: 15.10.2012

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die pflanzliche Immunantwort	1
1.2 Nichtwirtsresistenz	5
1.3 <i>Phytophthora infestans</i> – Erreger der Kraut- und Knollenfäule	11
1.4 Synthese und biologische Funktion von Phytosterolen und Sterolderivaten	13
1.4.1 Freie Sterole – Membrankomponenten, Signalmoleküle und Brassinosteroid-Vorläufer	14
1.4.2 Sterolester – Speicherform freier Sterole	16
1.4.3 Glycosylierte Sterole – Modulation von Membraneigenschaften	18
1.5 Zielstellung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material	21
2.1.1 Pflanzen	21
2.1.2 Pflanzenpathogene.....	22
2.1.3 Klonierungsvektoren	22
2.1.4 Bakterienstämme	23
2.1.5 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide.....	23
2.1.6 Medien, Puffer und Lösungen	24
2.1.7 Datenbanken und Internetressourcen.....	26
2.2 Methoden	26
2.2.1 Nukleinsäureanalytik.....	26
2.2.1.1 DNA-Extraktion.....	26
2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	27
2.2.1.3 Extraktion von Plasmid-DNA	27
2.2.1.4 Kolonie-PCR zur Identifizierung positiver Bakterien-Klone.....	27
2.2.1.5 Restriktionsverdau	28
2.2.1.6 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	28
2.2.1.7 RNA-Extraktion.....	28
2.2.1.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	28
2.2.1.9 Elution von Nukleinsäurefragmenten aus Agarose-Gelen	29
2.2.1.10 Herstellung radioaktiv-markierter Sonden.....	29
2.2.1.11 Southern-Blotting.....	29
2.2.1.12 Northern-Blotting.....	30
2.2.1.13 cDNA-Synthese und quantitative Reverse Transkriptase (qRT)-PCR.....	30
2.2.1.14 Microarray-Analysen	30
2.2.2 Arabidopsis-Kreuzungen	31
2.2.3 Genotypisierung mit molekularen Markern.....	31
2.2.4 Arabidopsis-Genom-Sequenzierung.....	32
2.2.5 Transformationen	32
2.2.5.1 <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.5.2 <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	32
2.2.5.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
2.2.5.4 Arabidopsis-Protoplasten.....	33
2.2.5.5 <i>Nicotiana benthamiana</i>	33
2.2.5.6 <i>Solanum tuberosum</i>	33
2.2.6 Proteinanalytik	34
2.2.6.1 Proteinexpression in <i>E. coli</i>	34
2.2.6.2 Proteinextraktion aus Pflanzenmaterial	34
2.2.6.3 SDS-Gelelektrophorese	34
2.2.6.4 Coomassie-Färbung	35
2.2.6.5 Western-Blot-Analyse	35
2.2.7 Pathogeninfektionen.....	35

2.2.7.1	<i>Phytophthora infestans</i>	35
2.2.7.2	<i>Pseudomonas syringae</i>	36
2.2.7.3	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> (Bgh).....	36
2.2.7.4	<i>Colletotrichum</i> sp.	36
2.2.7.5	<i>Golovinomyces</i> sp.	37
2.2.8	Behandlung mit flg22.....	37
2.2.9	Färbetechniken.....	37
2.2.9.1	Trypanblau.....	37
2.2.9.2	Anilinblau.....	38
2.2.9.3	kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung.....	38
2.2.9.4	Nilrot.....	38
2.2.10	Mikroskopische Analysen.....	38
2.2.10.1	Licht-und Fluoreszenzmikroskopie.....	38
2.2.10.2	Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	39
2.2.10.3	Elektronenmikroskopie.....	39
2.2.11	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	39
3	ERGEBNISSE.....	41
3.1	Charakterisierung der <i>pen2erp1</i>-Mutante.....	41
3.1.1	Morphologische Merkmale.....	41
3.1.2	Resistenzreaktionen gegen <i>P. infestans</i>	43
3.2	Kartierung und Identifizierung des <i>ERP1</i>-Gens.....	47
3.2.1	<i>ERP1</i> kodiert die Phospholipid:Sterol-Acyltransferase <i>AtPSAT1</i>	48
3.2.2	Isolierung und Charakterisierung weiterer <i>AtPSAT1/ERP1</i> -Allele.....	49
3.2.3	Komplementationsanalysen.....	51
3.3	Expression von <i>PSAT1/ERP1</i> in <i>erp1</i>-Mutanten.....	53
3.4	Veränderung der Sterolhomöostase durch Mutationen in <i>PSAT1/ERP1</i>.....	55
3.5	Lokalisation des konstitutiv exprimierten <i>PSAT1/ERP1</i>-GFP-Fusionsproteins.....	59
3.5.1	Lokalisationsstudien mit transgenen Arabidopsis-Linien.....	60
3.5.2	Kokolisationsstudien nach transienter Expression in Tabak.....	63
3.6	Untersuchung zusätzlicher Komponenten der Resistenz gegen <i>P. infestans</i>.....	63
3.6.1	<i>PATHOGENESIS RELATED (PR)</i> -Gene.....	64
3.6.2	<i>POWDERY MILDEW RESISTANCE 4 (PMR4)</i>	65
3.6.3	<i>Phytophthora</i> Elicitin INFESTIN 1 (INF1).....	68
3.7	Reaktion von <i>erp1</i>-Mutanten auf weitere Pathogene.....	69
3.7.1	Nicht-adaptierte pilzliche Pathogene.....	70
3.7.2	Adaptierte pilzliche Pathogene.....	71
3.7.3	Bakterielle Pathogene – <i>Pseudomonas syringae</i>	74
3.8	Reaktion von <i>erp1</i>-Mutanten auf den bakteriellen Elicitor flg22.....	76
3.9	Microarray-Analysen – Genexpressionsmuster von <i>erp1</i>-Mutanten.....	78
3.9.1	Konstitutiv differentiell exprimierte Gene.....	78
3.9.2	Nach Behandlung mit <i>P. infestans</i> differenziell exprimierte Gene.....	80
3.10	Bedeutung von Sterolestern in dem Wirtspathogen-System Kartoffel – <i>P. infestans</i>.....	85
3.10.1	Veränderungen im Sterolprofil von <i>S. tuberosum</i> durch <i>P. infestans</i>	85
3.10.2	Überexpression von <i>AtPSAT1/ERP1</i> in Kartoffel.....	87
3.10.3	RNAi-vermittelte Herabsetzung der <i>StPSAT</i> -Expression.....	88
4	DISKUSSION.....	91
4.1	Die Rolle von <i>PSAT1/ERP1</i> in der Nichtwirtsresistenz von <i>A. thaliana</i> gegen <i>P. infestans</i>.....	91
4.2	Ein möglicher Zusammenhang zwischen Blattseneszenz und Abwehrantwort.....	93
4.3	Die Bedeutung und Entstehung von Callose-Depositionen in der pflanzlichen Abwehrantwort.....	94
4.4	Analyse der globalen Genexpression in <i>erp1</i>-Mutanten.....	98
4.4.1	Veränderungen in der basalen Genexpression.....	98
4.4.2	<i>P. infestans</i> -induzierte Veränderungen der Genexpression.....	99

4.5	Funktion und Lokalisation von PSAT1/ERP1 in Arabidopsis.....	103
4.6	Mögliche Konsequenzen der veränderten Sterolhomöostase in <i>PSAT1/ERP1</i>-defizienten Pflanzen	106
4.6.1	Die Rolle von PSAT1/ERP1 während der Blattalterung	107
4.6.2	Einfluss freier und konjugierter Sterole auf Membraneigenschaften und Membran-assoziierte Reaktionen.....	108
4.6.3	Phytosterole und Sterolkonjugate in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	110
4.7	Modellvorstellung über die Entwicklung des spezifischen Nichtwirtsresistenz-Phänotyps <i>PSAT1/ERP1</i>-defizienter Pflanzen.....	113
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	119
6	LITERATURVERZEICHNIS	121
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	134
8	ANHANG	135
8.1	Auflistung der in der vorliegenden Studie verwendeten Primer	135
8.2	Sonden und Primer für qRT-PCR Analysen.....	136
8.3	Sequenzierung von <i>PSAT1/ERP1</i> -cDNA-Fragmenten aus <i>erp1-3</i> und <i>erp1-4</i>	136
8.4	Anti-PSAT1/ERP1 Peptid-Antikörper von Eurogentec	137
8.5	Sterolprofil <i>P. infestans</i> -behandelter und -unbehandelter Arabidopsis <i>erp1</i> -Mutanten und der entsprechenden Kontrollen	138
8.6	Sterolprofil transgener Kartoffel-Linien	139
8.7	Homologie des <i>S. tuberosum</i> EST TA31107_4113 zu <i>AtPSAT1/ERP1</i>	140
8.8	<i>StERP1</i> -Fragment für die Klonierung in Désirée-Pflanzen	140
8.9	Nilrot-Färbung zum Nachweis der Neutrallipid-Akkumulation in Lipidtröpfchen	141
8.10	Subzelluläre Lokalisation von PSAT1/ERP1- bzw. <i>erp1-3</i> -GFP-Fusionsproteinen in transienten Expressionsystemen	142
8.11	Konstitutiv differentiell exprimierte Gene.....	143
8.12	6 Stunden nach <i>P. infestans</i> -Behandlung differentiell exprimierte Gene.....	144
8.13	12 Stunden nach <i>P. infestans</i> -Behandlung differentiell exprimierte Gene.....	146
8.14	<i>P. infestans</i> -induzierte differentielle Genexpression im Vergleich	147

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μE	Mikro Einstein
μg	Mikrogramm
μM	Mikromolar
<i>A. thaliana</i>	lat. <i>Arabidopsis thaliana</i>
ABC	engl. ATP-binding cassette
ACAT	Acyl-CoA-Acyltransferasen
Are	engl. ACAT-related
ASAT	Acyl-CoA: Sterol-Acyltransferase
ASG	acylierte Sterolglycoside
Avr	Avirulenz
<i>B. cinerea</i>	lat. <i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bgh</i>	lat. <i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
<i>C. higginsianum</i>	lat. <i>Colletotrichum higginsianum</i>
<i>C. lagenarium</i>	lat. <i>Colletotrichum lagenarium</i>
ca.	circa
CAPS	engl. cleaved amplified polymorphic sequence
cDNA	engl. copy DNA
cfu	engl. colony forming units
Col	Columbia
DAMP	engl. damage associated molecular pattern
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	engl. desoxyribonucleic acid
dpi	engl. days post infection
<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
<i>E. pisi</i>	lat. <i>Erysiphe pisi</i>
EDS	engl. enhanced disease susceptibility
EFR	engl. elongationfactor receptor
EMS	Ethylmethansulfonat
engl.	Englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERP	engl. enhanced response to <i>Phytophthora</i>
ET	Ethylen
et al.	lat. et alteri
ETI	engl. effector triggered immunity
ETS	engl. effector triggered susceptibility
f. sp.	lat. forma specialis
FLS	engl. flagellin-sensitive
FS	freie Sterole
g	Gramm
<i>G. cichoracearum</i>	lat. <i>Golovinomyces cichoracearum</i>
<i>G. cruciferarum</i>	lat. <i>Golovinomyces cruciferarum</i>
<i>G. orontii</i>	lat. <i>Golovinomyces orontii</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gl	engl. glabrous
GSL	engl. glucan synthase-like
h	Stunde
hpi	engl. hours post infection
HR	engl. hypersensitive response
i.d.R.	in der Regel
INF	Infestin
IPB	Institut für Pflanzenbiochemie
JA	engl. jasmonic acid

lat.	Lateinisch
LCAT	Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase
<i>Ler</i>	Landsberg <i>erecta</i>
LRR	engl. leucine rich repeat
MAMP	engl. microbial associated molecular pattern
MAPK	engl. mitogen activated protein kinase
min.	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
<i>P. cichorii</i>	lat. <i>Pseudomonas cichorii</i>
<i>P. infestans</i>	lat. <i>Phytophthora infestans</i>
<i>P. parasitica</i>	lat. <i>Phytophthora parasitica</i>
<i>P. syringae</i>	lat. <i>Pseudomonas syringae</i>
PAD	engl. phytoalexin deficient
PAMP	engl. pathogen associated molecular pattern
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCD	engl. programmed cell death
PCR	engl. polymerase chain reaction
PDR	engl. pleiotropic drug resistance
PE	Phosphatidylethanolamin
PEN	engl. penetration
PMR	engl. powdery mildew resistant
<i>Pph</i>	lat. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
PR	engl. pathogenesis related
PRR	engl. pattern recognition receptor
PSAT	Phospholipid:Sterol-Acyltransferase
<i>Pst</i>	lat. <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTI	engl. PAMP triggered immunity
pv.	lat. pathovar
R	Resistenz
RLK	engl. receptor like kinase
ROS	engl. reactive oxygen species
s.	siehe
SA	engl. salicylic acid
SAG	engl. senescence-associated gene
SE	Sterolester
SG	Sterolglycoside
SGH	Sterolglycosidhydrolase
SGT	Sterolglycosyltransferase
SNARE	engl. N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor
SNP	Engl. single nucleotide polymorphism
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triacylglycerin
TAIR	engl. the Arabidopsis information resource
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TTSS	engl. type three secretion system
u.a.	unter anderem
ÜN	Übernacht
UV	Ultraviolett
v.a.	vor allem
v/v	engl. volume per volume
VIGS	engl. virus induced gene silencing
w/v	engl. weight per volume
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1 EINLEITUNG

1.1 DIE PFLANZLICHE IMMUNANTWORT

Obwohl Pflanzen in ihrer natürlichen Umwelt einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt sind, ist das Auftreten einer Krankheit ein relativ seltenes Ereignis.

Das Phänomen, dass alle Mitglieder einer Pflanzenspezies gegen alle Isolate einer bestimmten Pathogenspezies resistent sind, wird als Nichtwirtsresistenz bezeichnet und beruht auf vielschichtigen Abwehrmechanismen, die sowohl präformierte Barrieren als auch induzierbare Resistenzreaktionen umfassen (Nürnberger und Lipka 2005). Die Induktion dieser Resistenzreaktionen basiert auf der Erkennung spezifischer Pathogenstrukturen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) durch Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) in der Plasmamembran der Pflanzenzellen (s. Abbildung 1-1). PAMPs sind Moleküle, die unter Pathogenen und Mikroorganismen weit verbreitet sind, nicht aber in der Pflanze vorkommen (s. 1.2). Diese Moleküle, die zumeist an der Oberfläche des Pathogens vorhanden sind oder sekretiert werden, sind für das Pathogen essentiell und deshalb evolutionär relativ stabil (Bent und Mackey 2007). Aufgrund des Beitrags der PAMP-Erkennung zur Resistenzausprägung wird hierfür auch der Begriff *PAMP-triggered immunity* (PTI) verwendet (Chisholm et al. 2006, Jones und Dangl 2006). Die Komponenten und Mechanismen der Nichtwirtsresistenz und PTI werden in Abschnitt 1.2 näher erläutert.

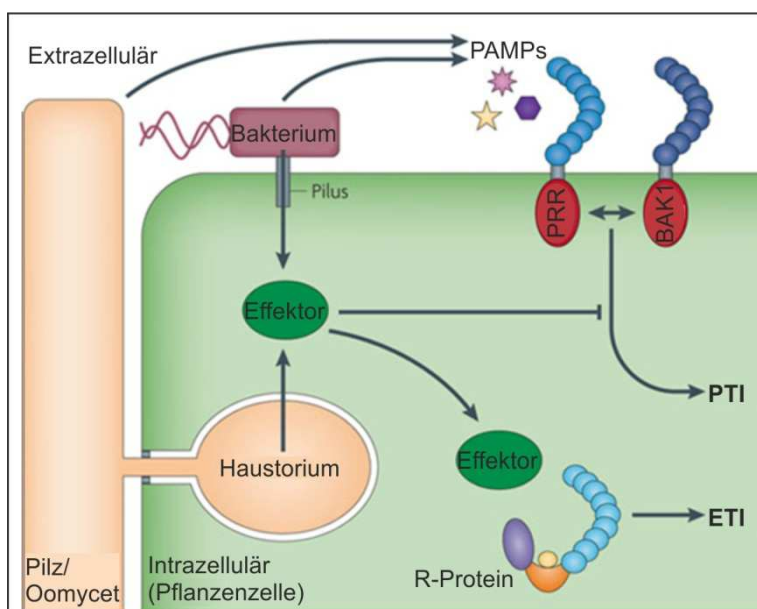


Abbildung 1-1. Modell pflanzlicher Resistenzmechanismen.

Die Erkennung Pathogen-spezifischer Moleküle (PAMPs) durch membranständige Rezeptoren (PRRs) führt zur Induktion der *PAMP-triggered immunity* (PTI), wobei häufig eine Liganden-abhängige Rezeptor-Komplexbildung mit BAK1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED KINASE 1) von Bedeutung ist. Phytopathogene Bakterien, Pilze und Oomyceten sekretieren Effektoren, um die PTI zu unterdrücken und so die Erschließung des Wirts zu ermöglichen. Koevolutiv entstandene pflanzliche Resistenz (R)-Proteine erkennen Effektoren bzw. nehmen deren Aktivität wahr, was zur Induktion der *effector-triggered immunity* (ETI) führt. Abbildung verändert nach Dodds und Rathjen (2010).

Im Laufe der Evolution entwickelten Pathogene die Fähigkeit PTI-vermittelte pflanzliche Abwehrreaktionen zu umgehen oder zu unterdrücken und somit bestimmte Pflanzen erfolgreich zu kolonisieren und eine Krankheit auszulösen (Chisholm et al. 2006; s. Abbildung 1-1). Solche Strategien umfassen z.B. die Veränderung oder Maskierung der perzipierten PAMPs (Sun et al. 2006) (van Esse et al. 2007) und die gezielte Manipulation bestimmter Komponenten der pflanzlichen

Abwehrantwort in der Wirtszelle, vermittelt durch die Sekretion von Effektor-Molekülen (Jones und Dangl 2006; s. Abbildung 1-1). Die ersten Effektoren wurden aufgrund ihrer Avirulenzfunktion in resistenten Wirtspflanzen entdeckt, weshalb die kodierenden Gene als *Avirulenz* (*Avr*)-Gene bezeichnet wurden. Im Gegensatz zu PAMPs sind Effektoren stark variabel, deren Funktion z.T. redundant und für das Pathogen entbehrlich (Bent und Mackey 2007). Die meisten Effektoren sind innerhalb der Wirtszelle aktiv und werden über verschiedene Transportmechanismen vom Pathogen in die Pflanzenzelle eingebracht. In Gram-negativen pathogenen Bakterien erfolgt die Effektorsekretion meist mit Hilfe eines Typ-Drei-Sekretions-Systems (*type three secretion system*, TTSS). Dieses Transportsystem enthält eine Nadel-ähnliche Struktur, durch welche strukturell diverse Effektoren über die beiden bakteriellen Membranen in die Wirtszellen sekretiert werden. Dabei überwinden phytopathogene Bakterien mit dem TTSS nicht nur die Plasmamembran der eukaryotischen Wirtszelle sondern auch die pflanzliche Zellwand (Tampakaki et al. 2004). Im Vergleich zum Sekretionssystem von Bakterien ist über den Effektor-Transport bei Pilzen und Oomyceten nicht viel bekannt. Ein TTSS wurde in diesen Organismen nicht nachgewiesen, hier scheinen die im endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildeten Effektoren in Golgi-Vesikeln über den sekretorischen Weg transportiert zu werden. Die entsprechenden N-terminalen Sekretionssignale wurden bei vielen Effektoren identifiziert (Panstruga und Dodds 2009 und darin enthaltene Referenzen).

Viele filamentöse Pathogene bilden sogenannte Haustorien aus, welche der Nährstoffaufnahme aus der Wirtszelle sowie der Bildung und Sekretion von Effektoren in die extrazelluläre Matrix (s. Abbildung 1-2) bzw. in die Wirtszelle dienen (Panstruga und Dodds 2009). Der Transportweg der Effektormoleküle über die extrahaustorielle Membran, welche pflanzlichen Ursprungs ist und das Haustorium von dem Wirtszytosol separiert, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Sequenzvergleiche haustorieller sekretierter Proteine führten zur Entdeckung N-terminaler konservierter Aminosäuremotive, die für den Proteintransport in die Pflanzenzelle von Bedeutung sind. In Oomyceten können zwei Effektor-Klassen unterschieden werden: Die eine Klasse kennzeichnet sich durch ein RxLR-(dEER)-Motiv (RxLR-Effektoren; Whisson et al. 2007) und Effektoren der zweiten Klasse haben ein LXLFLAK-Motiv gemeinsam (Crinkler-Effektoren; Haas et al. 2009). Wie diese Motive den Transport über die pflanzliche Zellmembran vermitteln ist bisher unklar, es wurde jedoch gezeigt, dass die Motive für den Transport essentiell sind (Whisson et al. 2007, Dou et al. 2008, Schornack et al. 2010). In einer bisher kontrovers diskutierten Publikation wurde eine mögliche Bedeutung von Phosphatidylinositol-3-Phosphat, das über das RxLR-Motiv an Effektorproteine binden kann, für die Vesikel-vermittelte Endozytose in die Wirtszelle aufgezeigt (Kale et al. 2010). Gan et al. (2010) konnten jedoch keine spezifische Phospholipidbindung durch den RxLR-Effektor AvrL567 nachweisen.

Für sekretierte Effektorproteine phytopathogener Pilze wurde ein aus 3 Aminosäuren (Y/F/WxC) bestehendes N-terminales Sequenzmotiv identifiziert (Godfrey et al. 2010).

In der Wirtszelle interagieren die Effektoren mit Komponenten der pflanzlichen Immunantwort. Als Beispiele seien die Manipulation des proteolytischen Abbaus (Gohre et al. 2008, Bos et al. 2010), die direkte Modifikation oder Spaltung pflanzlicher Proteine (Mackey et al. 2002, H. S. Kim et al. 2005) und die Störung Phytohormon-abhängiger Reaktionswege (Uppalapati et al. 2005, Uppalapati et al. 2007) genannt. Außerdem sind manche bakteriellen Effektoren in der Lage, die Expression bestimmter Gene der Wirtspflanze zu induzieren, was zur Symptomausprägung beiträgt (TAL-Effektoren; Kay et al. 2007).

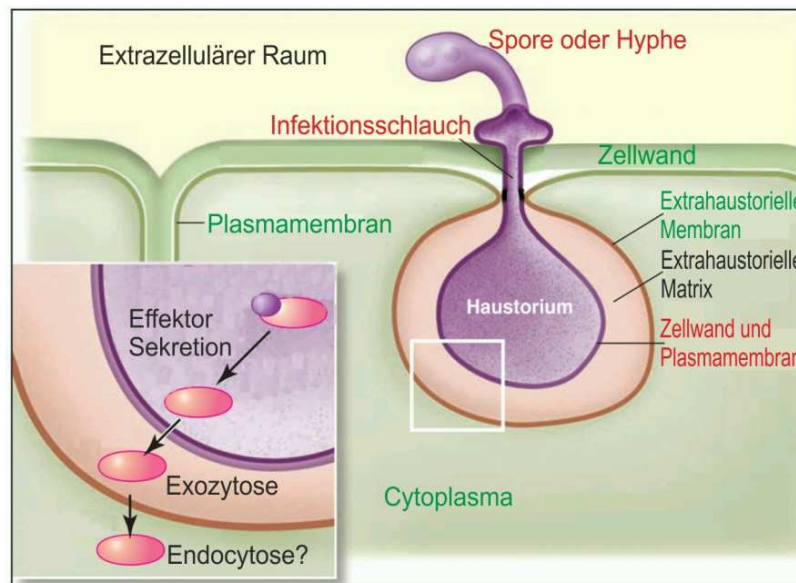


Abbildung 1-2. Haustorien filamentöser Pathogene – Nährstoffaufnahme und Effektorsekretion.

Haustorien werden von extrazellulären Infektionsstrukturen gebildet, welche die Zellwand überwinden und die Plasmemembran der Wirtszelle einstülpen. Vom Zytoplasma des Wirts sind sie durch eine extrahaustorielle Membran getrennt. Effektoren werden im Haustorium gebildet und über den sekretorischen Weg durch Exozytose in die extrahaustorielle Matrix sekretiert. Von dort werden sie vermutlich endozytotisch über wirtseigene Aufnahmemechanismen in die Pflanzenzelle transportiert. Abbildung verändert nach Panstruga und Dodds (2009). grüne Schrift, pflanzliche Zellstrukturen; rote Schrift, Pathogenstrukturen

Die Interaktion zwischen einem adaptierten Pathogen und einer suszeptiblen Wirtspflanze wird als kompatibel bezeichnet, das Pathogen ist auf der Wirtspflanze virulent. Diese Art der Anfälligkeit wird auch als *effector-triggered susceptibility* (ETS) bezeichnet (Jones und Dangl 2006). Auch in suszeptiblen Pflanzen werden durch die Perzeption von PAMPs des Wirtspathogens Abwehrantworten induziert (basale Resistenz), die jedoch aufgrund der Funktion spezifischer Effektorproteine des Wirtspathogens nicht zur Aufrechterhaltung der Resistenz ausreichen. Jones und Dangl (2006) verdeutlichten diesen Zusammenhang mit folgender Gleichung: Basale Resistenz = PTI – ETS. Die Bedeutung der basalen Resistenz wird am Beispiel von Arabidopsis-Mutanten mit defekter PAMP-Perzeption deutlich, die im Vergleich zum Wildtyp eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber virulenten Bakterien aufweisen (Zipfel et al. 2004).

Der selektive Druck auf die Wirtspflanze führte zur Koevolution von Resistenzgenen (R-Gene), deren Produkte die Effektoren bzw. deren Wirkung erkennen und so wieder Resistenz ermöglichen (s. Abbildung 1-1). Da die zugrunde liegenden Mechanismen durch die Interaktion zwischen R-Gen-

Produkt und Effektor induziert werden, bezeichnet man diese Resistenz als *effector-triggered immunity* (ETI) (Chisholm et al. 2006, Jones und Dangl 2006). Die Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze wird als inkompatibel bezeichnet, das Pathogen ist avirulent. Die Resistenzreaktion der ETI ist quantitativ stärker als die der PTI und geht mit lokalem Zelltod einher, was als *hypersensitive response* (HR) bezeichnet wird (Bent und Mackey 2007). Während die PTI hauptsächlich gegenüber nicht-adaptierten Pathogenen effektiv ist, ermöglichen die Reaktionen der ETI die Abwehr adaptierter Pathogene. Die Genprodukte von R-Genen werden als Resistenzproteine (R-Proteine) bezeichnet und stellen häufig zytoplasmatische Rezeptor-ähnliche Proteine dar. Die größte Klasse von R-Proteinen sind die NB-LRRs, welche durch eine Nukleotidbindedomäne (NB) und Leucin-reiche Domänen (*leucine rich repeats*, LRR) charakterisiert sind (Dangl und Jones 2001). Es gibt verschiedene Modelle für die Möglichkeiten der Interaktion zwischen Effektor und R-Protein: (1) Eine direkte Interaktion zwischen R-Protein und Effektor, wie z.B. für AvrPita (*Magnaporthe grisea*) und Pi-ta (*Oryza sativa*) gezeigt (Jia et al. 2000). (2) Das *Guard*-Modell, bei dem das R-Gen Pathogen-induzierte Modifikationen an einem bestimmten pflanzlichen Protein detektiert. Ein typisches Beispiel ist die Phosphorylierung von RPM1-INTERACTING PROTEIN 4 (RIN4), einem zentralen Regulator der basalen Abwehr in *Arabidopsis*, durch die bakteriellen Effektoren AvrRPM1 und AvrB (*P. syringae*) dar, was durch das R-Protein RESISTANCE TO P. SYRINGAE PV MACULICOLA 1 (RPM1) detektiert wird (Mackey et al. 2002). (3) Das *bait-and-switch*-Modell beschreibt einen zweistufigen Prozess, wobei ein NB-LRR mit einem Zielprotein eines bestimmten Effektors assoziiert ist. Die Interaktion zwischen Effektor und Zielprotein führt zur Signalweiterleitung und Abwehrantwort (Collier und Moffett 2009).

Aufgrund natürlicher Selektion entwickelten Pathogene wiederum neue oder veränderte Effektoren, um der Erkennung durch Komponenten der ETI zu entgehen. So wurde z.B. in *P. syringae* der Effektor AvrRpt2 identifiziert, der durch proteolytische Spaltung von RIN4 die Aktivierung von RPM1 verhindert (H. S. Kim et al. 2005). Allerdings führt die Spaltung von RIN4 in resistenten Pflanzen über die Aktivierung eines weiteren R-Proteins, RESISTANCE TO P. SYRINGAE 2 (RPS2) zur Abwehrantwort. Als Folge der Koevolution von Pflanze und Pathogen kommt es zu einer Art „Wettrüsten“, bei dem sich Resistenzen und entsprechende Mechanismen zu ihrer Unterdrückung entwickeln (Boller und He 2009).

Die durch PAMP- oder Effektor-Perzeption induzierten Signalmechanismen und Abwehrreaktionen sind sehr ähnlich, unterscheiden sich allerdings in Stärke und Zeitverlauf. Generell werden PAMP-vermittelte Abwehrreaktionen sehr schnell induziert und verlaufen transient, während Signale der ETI stärker sind und länger anhalten (Tsuda und Katagiri 2010). Typische Reaktionen umfassen den Anstieg des zytosolischen Calcium-Gehalts und die Synthese und Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), von Phytoalexinen (sekundäre Pflanzenstoffe mit antimikrobieller Wirkung) und von *pathogenesis-related* (PR)-Genprodukten. Außerdem spielen für PTI und ETI die Weiterleitung des Signals über Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) und Phytohormon-abhängige Reaktionswege eine große Rolle. Dabei tragen in *Arabidopsis* Salicylsäure

(SA)-abhängige Reaktionen v.a. zur Abwehr von biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen bei, während Jasmonsäure (JA)- und Ethylen (ET)-abhängige Signalwege eher in der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene eine Rolle spielen (Glazebrook 2005). Ausnahmen der allgemein angenommenen antagonistischen Wirkung von SA und JA/ET-vermittelten Abwehrreaktionen, sowie ein Beitrag weiterer Phytohormone zur pflanzlichen Immunantwort sind jedoch ebenfalls bekannt (Robert-Seilantz et al. 2007). Häufig beobachtete Abwehrreaktionen an der Infektionsstelle sind Zellwandverfestigungen und Callose-haltige Papillen.

Die strikte Trennung zwischen PTI und ETI basiert hauptsächlich auf Modellvorstellungen, in denen zwei verschiedene Perzeptionssysteme beschrieben werden. Generell ist für die Pflanze nicht von Bedeutung, welches Pathogen-Molekül durch welche Art von Rezeptor erkannt wird, so lange der zu Grunde liegende Mechanismus der Aufrechterhaltung der Resistenz dient (Thomma et al. 2011).

1.2 NICHTWIRTSRESISTENZ

Die Nichtwirtsresistenz ist die am weitesten verbreitete und dauerhafteste Form der Krankheitsresistenz von Pflanzen. Sie beruht auf verschiedenen Faktoren, durch die eine Infektion von Pflanzen durch nicht-adaptierte pathogene Mikroorganismen verhindert wird. Zum einen können die Nichtwirtspflanzen den Ansprüchen bestimmter Pathogene nicht entsprechen. So wird z.B. die Expression von Pathogenitäts-Genen oder die Ausbildung von Infektionsstrukturen häufig erst dann induziert, wenn die befallene Pflanze bestimmte physikalische oder chemische Eigenschaften erfüllt (Podila et al. 1993). Zum anderen können präformierte Eigenschaften der Pflanzenoberfläche ein Hindernis für Pathogene darstellen. Dazu zählen u.a. die wachshaltige Kutikula der Blattoberfläche, die starre Zellwand pflanzlicher Zellen, bestimmte antimikrobielle Peptide (z.B. Defensine, Carvalho Ade und Gomes 2011) und sekundäre Pflanzenstoffe (z.B. Saponine, Osbourn et al. 2011). Auch das Zytoskelett ist für die Bildung physikalischer Barrieren gegen Pathogene von Bedeutung. Pflanzen reagieren auf versuchte Penetration mit einem schnellen Abbau und darauf folgendem Wiederaufbau der Aktinfilamente an der Penetrationsstelle (Kobayashi et al. 1997). In Untersuchungen der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *Colletotrichum*-Spezies und *Blumeria graminis f. sp. tritici* wurde durch Experimente mit Cytochalasin E (unterbindet Polymerisation des Aktins) gezeigt, dass für Callose-Ablagerung und Papillenbildung die Aktinfilament-Funktion gebraucht wird (Yun et al. 2003, Shimada et al. 2006).

Neben den präformierten Abwehrmechanismen tragen induzierbare Abwehrreaktionen zur Nichtwirtsresistenz bei. Diese Induktion von Reaktionen erfordert eine Perzeption der Pathogene, welche die konstitutiven Abwehrbarrieren überwinden konnten. Dabei erkennen membranständige Rezeptoren (PRRs) der Pflanzenzelle stark konservierte Pathogen-Moleküle (PAMPs, s. 1.1). Beispiele für bakterielle PAMPs sind Flagellin, Lipopolysaccharide und der Elongationsfaktor EF-Tu (Kunze et al. 2004, Zipfel et al. 2004, Silipo et al. 2005). Pilze können z.B. aufgrund des Chitins in ihrer Zellwand erkannt werden (Kaku et al. 2006) und typische Elicitoren phytopathogener

Oomyceten sind Elicitorine (s. 1.3), Cellulose-bindende Domänen von CELLULOSE-BINDING ELICITOR LECTINS (CBELs) oder sekretierte Transglutaminasen (Mikes et al. 1998, Brunner et al. 2002, Gaulin et al. 2006). Neben diesen Pathogen-spezifischen Strukturen können Pflanzen auch endogene Moleküle erkennen, die erst durch Pathogenbefall oder Verwundung gebildet und als *damage associated molecular patterns* (DAMPs) bezeichnet werden. So werden zum Beispiel das bei Verwundung gebildete Peptid AtPep1 und durch die Aktivität hydrolytischer Pathogen-Enzyme freigesetzte Zellwandfragmente als Elicitoren perzipiert (D'Ovidio et al. 2004, Huffaker et al. 2006).

Für viele der genannten Elicitoren sind die entsprechenden PRRs bekannt: Flagellin (aktives Epitop flg22) und EF-Tu (aktive Epitope elf13, elf18 und elf26) werden durch die Rezeptorkinasen FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2) bzw. EF-TU RECEPTOR (EFR) perzipiert (Chinchilla et al. 2006, Zipfel et al. 2006), die sich durch eine extrazelluläre Leucin-reiche Domäne (LRR) und eine intrazelluläre Serin/Threonin-Proteinkinase auszeichnen. Chitin wird in Arabidopsis durch die CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) und in Reis durch das CHITIN ELICITOR-BINDING PROTEIN (CEBiP1) erkannt. Diese gehören zur Klasse der Rezeptor-ähnlichen Kinasen und weisen, neben der intrazellulären Kinasedomäne, extrazelluläre Lysin-Motiv (LysM)-Domänen auf, die der Glycan-Bindung dienen. (Kaku et al. 2006, Wan et al. 2008). Kürzlich wurde gezeigt, dass CERK1 und zwei weitere LysM-Domänen-Proteine auch der Perzeption von bakteriellem Peptidoglycan dienen (Willmann et al. 2011). Die Perzeption von AtPep1 erfolgt durch die redundanten LRR-Rezeptorkinasen PEP REZEPTOR1 (PEPR1) und PEPR2 (Krol et al. 2010).

Nach Ligandenbindung bilden die PRRs FLS2, EFR und PEPR1/2 mit den membranständigen Rezeptor-ähnlichen Kinasen BRI1 ASSOCIATED KINASE1 (BAK1) und BAK1-LIKE1 (BKK1) einen Rezeptorkomplex (Schulze et al. 2010, Roux et al. 2011), der das an der Plasmamembran empfangene Signal an intrazelluläre Komponenten weiterleitet (s. Abbildung 1-1). BAK1 spielt außerdem in der basalen Resistenz von *Nicotiana benthamiana* gegen *Phytophthora infestans* eine Rolle, vermutlich bei der Erkennung des als PAMP beschriebenen Elicitins INFESTIN1 (INF1) (Chaparro-Garcia et al. 2011). Die durch CERK1 vermittelte Signaltransduktion nach Chitinbindung ist unabhängig von BAK1 (Gimenez-Ibanez et al. 2009).

Eine der ersten zellulären Reaktionen nach PAMP-Perzeption sind veränderte Ionenströme, wobei v.a. der Anstieg des intrazellulären Calcium (Ca^{2+})-Gehalts und die damit einhergehende Depolarisation des Membranpotentials für die Signalweiterleitung von Bedeutung ist (Jeworutzki et al. 2010). Diese Ionenströme sind Voraussetzung für viele Folgereaktionen, wie z.B. die Akkumulation von ROS (z.B. Superoxid-Anionen und Wasserstoffperoxid) und die Signalweiterleitung durch Phosphorylierungsprozesse, wodurch schließlich die Expression PAMP-responsiver Gene reguliert wird (Torres et al. 2002, Jeworutzki et al. 2010). ROS können zum einen direkt als antimikrobielle Substanzen im Apoplasten wirksam werden und tragen zum anderen zur Verfestigung der Zellwand und zur Schließung der Stomata bei, wodurch das Eindringen phytopathogener Mikroorganismen verhindert werden soll (Torres 2010). Außerdem wurde gezeigt, dass H_2O_2 die Aktivität der

OXIDATIVE BURST INDUCED KINASE 1 (OXI1) induziert, die wiederum für die vollständige Aktivierung der MAPKs MPK3 und MPK6 von Bedeutung ist (Rentel et al. 2004).

Sukzessive Phosphorylierungsschritte durch MAPK-Kaskaden, die aus mindestens drei Kinase-Modulen bestehen, spielen in der Signalweiterleitung nach PAMP-Erkennung eine große Rolle. MAPK-Kinase-Kinasen (MAPKKK) phosphorylieren dabei MAPK-Kinasen (MAPKK), die wiederum MAPKs phosphorylieren und aktivieren (Pitzschke et al. 2009). MAPKs können z.B. Transkriptionsfaktoren aktivieren und somit zur Umprogrammierung der Genexpression nach PAMP-Perzeption beitragen (Abbildung 1-3). Als Beispiel sei die Aktivierung des Transkriptionsfaktors WRKY33 durch MPK3, 6 und 4 genannt, wodurch die Expression des Gens *PHYTOALEXIN DEFICIENT 3* (*PAD3*) induziert wird, dessen Genprodukt in der Synthese des Phytoalexins Camalexin von Bedeutung ist (Qiu et al. 2008, Mao et al. 2011). *PAD3* trägt zur Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *Alternaria brassicicola* bei (Thomma et al. 1999). Durch *virus induced gene silencing* (VIGS) von MAPK-Genen in *N. benthamiana*, die ortholog zu AtMPK3/6 sind, konnte gezeigt werden, dass diese MAPKs an der Ausbildung der Nichtwirtsresistenz gegen das Bakterium *Pseudomonas cichorii* beteiligt sind (Sharma et al. 2003). Bisher ist nicht bekannt, ob durch PRRs an der Plasmamembran empfangene Signale direkt auf eine der 80 in Arabidopsis bekannten MAPKKKs übertragen werden, oder ob deren Aktivierung durch noch unbekannte Kinasen vermittelt wird. Eine mögliche Verbindung zwischen Liganden-Bindung und Signalweiterleitung von der Plasmamembran ins Zytoplasma stellt die zytoplasmatische Rezeptor-ähnliche Kinase BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 (BIK1) dar, die durch BAK1 phosphoryliert wird und daraufhin wiederum BAK1 und FLS2 phosphoryliert, vermutlich um das flg22-vermittelte Signal zu vermehren (Lu et al. 2010). Die Aktivierung von MAPKs wurde auch bei kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen beobachtet (Jones und Dangl 2006). Die MAMP-Erkennung, die darauf folgende Signalweiterleitung und Genexpression stellen Komponenten der basalen Resistenz dar, die aber nur bei Nichtwirtspflanzen zur Ausprägung einer vollständigen Resistenz ausreichen.

Zu den ersten zellulären Vorgängen nach Pathogenangriff gehören Umlagerungen des Zytoskeletts, die damit verbundene Aggregation des Zytoplasmas, der gerichtete Transport des Zellkerns und anderer Organellen zur Interaktionsstelle und die Bildung von Papillen im Bereich der Penetrationsstelle (Schmelzer 2002, Lipka und Panstruga 2005; s. Abbildung 1-3). Papillen sind Zellwandauflagerungen, die größtenteils aus Callose (β -1,3-Glucan), Zellwandbestandteilen wie Cellulose, Pectin sowie Suberin und phenolischen Substanzen bestehen (Schmelzer 2002). Die Pathogen-induzierte Callosesynthese ist abhängig von der Aktivität der Callosesynthase GLUCAN SYNTHASE LIKE 5 (*GSL5*), die auch als POWDERY MILDEW RESISTANT 4 (*PMR4*) bezeichnet wird, da eine Mutation in *GSL5* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber adaptierten Mehltau-Spezies führt (Jacobs et al. 2003).

Die beschriebenen zellulären Abwehrmechanismen tragen zur Penetrationsresistenz bei, durch welche nicht-adaptierte Pathogene, die in der Lage waren, die präformierten Barrieren zu überwinden, effektiv

am Eindringen in die pflanzliche Zelle gehindert werden. Einen Beitrag zur Aufklärung molekularer Mechanismen und Komponenten dieser Penetrationsresistenz lieferten Arabidopsis-Mutanten, die eine im Vergleich zum Wildtyp vermehrte Penetration von *Blumeria graminis f. sp. hordei* (*Bgh*) oder *Erysiphe pisi* erlauben, häufig verbunden mit Zelltod der penetrierten Zellen. Auf diese Weise wurden PENETRATION 1 (PEN1), PEN2 und PEN3 identifiziert, die vermutlich in Sekretion, Synthese und Transport Abwehr-relevanter Moleküle an die Penetrationsstelle involviert sind, wobei PEN1 Vorgänge der Exozytose vermittelt, während PEN3 in einem parallelen Transportweg zur Nichtwirtsresistenz beiträgt (Collins et al. 2003, Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006, Kwon et al. 2008b; s. Abbildung 1-3).

PEN1 (auch als SYP121 bezeichnet) ist ein plasmamembranständiges pflanzliches Syntaxin mit einer SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)-Domäne (Collins et al. 2003). SNARE-Proteine vermitteln in Eukaryoten die Fusion intrazellulärer Vesikel mit bestimmten Zielmembranen im Rahmen endo- und exozytotischer Transportprozesse zwischen den Kompartimenten des Endomembransystems. Entsprechend ihrer Lokalisation werden SNARE-Proteine in Vesikel-assoziierte Membranproteine (VAMPs oder v-SNAREs) und Zielmembran-assoziierte Proteine (*target (t)*-SNAREs), zu denen PEN1 gehört, unterteilt (Lipka et al. 2007). PEN1 interagiert mit dem Adaptor-SNARE-Protein SNAP33 sowie den Vesikel-assoziierten VAMP721 und VAMP722 (Kwon et al. 2008b). Durch die Interaktion dieser Proteine entsteht ein ternärer SNARE-Komplex, in dem durch Konformationsänderungen die Fusion des Vesikels mit der Plasmamembran und somit die Sekretion des Vesikel-Inhalts in den apoplastischen Raum ermöglicht wird. Lokalisationsstudien nach *Bgh*-Infektion zeigten, dass PEN1-GFP fokal unterhalb gebildeter Appressorien in Plasmamembran-Mikrodomänen und außerdem innerhalb der im Apoplasten gebildeten Papillen akkumuliert (Assaad et al. 2004). Auch SNAP33- und VAMP721/722-GFP-Fusionsproteine werden nach Infektion mit *Bgh* aktiv zur Penetrationsstelle transportiert (Kwon et al. 2008b). Da *pen1*-Mutanten und *VAMP721/722*-stillgelegte transgene Pflanzen nicht nur eine erhöhte Penetration durch *Bgh* zulassen, sondern auch eine verzögerte Papillenbildung aufweisen, scheint dieser SNARE-Komplex den Transport von Zellwandvorstufen und Enzymen der Zellwandbiosynthese im Rahmen der Papillenbildung an der Penetrationsstelle zu vermitteln. Interessanterweise beeinträchtigt die Mutation in *PEN1* spezifisch die Nichtwirtsresistenz gegenüber Mehltau-Pilzen, während *VAMP721/722* zur basalen Resistenz gegenüber einem breiteren Pathogenspektrum beitragen (Kwon et al. 2008b). Da in Gerste zu PEN1, VAMP721 und SNAP33 orthologe Proteine identifiziert wurden, die in der Penetrationsresistenz gegenüber nicht-adaptierten Mehltau-Spezies fungieren, und in Tabak ein weiteres Syntaxin (SYP132) in die ETI gegen *P. syringae* involviert ist, nimmt man an, dass sekretorische Prozesse in der pflanzlichen Abwehr evolutiv konserviert sind (Kalde et al. 2007, Humphry et al. 2010).

PEN2 kodiert eine Myrosinase, eine β -Glycosidhydrolase der Familie 1, die sich in der Peripherie von Peroxisomen befindet und in die Pathogen-induzierte Spaltung und Aktivierung von Indolglucosinolaten involviert ist (Lipka et al. 2005, Bednarek et al. 2009, Clay et al. 2009).

Glucosinolate sind präformierte Abwehrstoffe, die inaktive glycosylierte Vorstufen von biologisch aktiven Senfölen darstellen. Sie kommen in der Ordnung der Capparales vor, zu denen die Familie der Kreuzblütengewächse und somit Arabidopsis und Kulturpflanzen wie Raps, Rübe und Kohl gehören. Glycosidhydrolasen und Glucosinolate liegen in der Zelle häufig in separaten Kompartimenten vor und werden passiv durch Dekompartimentierung, z.B. durch Insektenfraß, in räumliche Nähe gebracht. Im Gegensatz dazu ist die Pathogen-induzierte PEN2-abhängige Indolglucosinolat-Hydrolyse ein aktiver Prozess, der mit einem gerichteten Transport von PEN2 an Peroxisomen zur Penetrationsstelle einhergeht. Die Enzymaktivität von PEN2 ist essentiell für dessen Funktion in der Penetrationsresistenz (Lipka et al. 2005). Bednarek et al. (2009) zeigten, dass heterolog exprimiertes PEN2 die Indolglucosinolate Indolyl-3-methylglucosinolat (I3G) und 4-Methoxyindolyl-3-methylglucosinolat (4MI3G) *in vitro* spalten kann, wobei wahrscheinlich jedoch nur das von 4MI3G abgeleitete Spaltungsprodukt zur Resistenz beiträgt. Die Synthese von 4MI3G aus I3G scheint vor allem durch die Cytochrom-P450-Monooxygenase CYP81F2 katalysiert zu werden. *pen2*, *cyp81F2*- und *pen2cyp81F2*-Mutanten weisen eine verminderte Penetrationsresistenz gegenüber den Mehltau-Pilzen *Bgh* und *E. pisi* und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber dem nekrotrophen Pilz *Plectosphaerella cucumerina* auf. Außerdem führt die Mutation in *PEN2* zu einer verminderten Penetrationsresistenz gegenüber dem Oomyceten *P. infestans*, was von makroskopisch sichtbaren Zelltodreaktionen und massiven Callose-Ablagerungen nach Infektion adulter Pflanzen begleitet wird. Diese Beobachtungen zeigen, dass PEN2 und CYP81F2 im gleichen Sekundärstoffwechselweg aktiv sind und zur Resistenz gegenüber einem breiteren Pathogenspektrum beitragen, als dies für PEN1 beobachtet wurde (Collins et al. 2003, Lipka et al. 2005, Bednarek et al. 2009).

PEN3 kodiert einen transmembranständigen ABC (*ATP-binding cassette*)-Transporter, der zur Familie der *PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE* (PDR)-Proteine gehört, die nur in Pflanzen und Pilzen vorkommen (Stein et al. 2006). PDR-Transporter zeichnen sich dadurch aus, dass sie häufig toxische Moleküle exportieren, was bei Pilzen v.a. der Detoxifizierung dient und bei Pflanzen zum Export antimikrobieller Substanzen im Rahmen der Pathogenabwehr beiträgt (Crouzet et al. 2006). Wie auch für PEN1 beobachtet, akkumuliert PEN3 nach Pathogeninfektion fokal in der Plasmamembran unterhalb der Stelle der versuchten Penetration (Stein et al. 2006). Der *pen3*-Resistenzphänotyp gleicht dem von *pen2*-Mutanten, mit der Ausnahme, dass *pen3* eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Wirtspathogen *Golovinomyces* (früher *Erysiphe*) *cichoracearum* zeigt, die mit HR-ähnlichem Zelltod und starker Chlorosenbildung einhergeht. In *pen2pen3*-Doppelmutanten ist die Resistenz gegenüber *G. cichoracearum* verzögert, was eine *PEN2*-Abhängigkeit des *pen3*-Phänotyp vermuten lässt. Stein et al. (2006) postulierten ein Modell, in dem PEN3 die durch PEN2 aktivierten Indolglucosinolate in den Apoplasten transportiert, wo diese zur Penetrationsresistenz beitragen. Dementsprechend könnte eine Mutation in *PEN3* eine Akkumulation zytotoxischer 4MI3G-Spaltprodukte in angegriffenen Zellen bewirken, wodurch SA-abhängige Zelltodreaktionen und als Folge dessen die erhöhte Resistenz gegen das biotrophe Wirtspathogen induziert werden.

Mit Hilfe der *pen*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass zwei verschiedene Transportsysteme in die Penetrationsresistenz gegen *Bgh* und *E. pisi* involviert sind, wobei der Transport von Indolderivaten außerdem zur Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* und zur basalen Resistenz gegenüber adaptierten Pathogenen beiträgt.

Da in allen drei *pen*-Mutanten die Nichtwirtsresistenz nicht gebrochen ist, scheinen weitere Komponenten der Abwehr zu existieren, die bei Überwindung der Penetrationsresistenz die Nichtwirtsresistenz aufrechterhalten. Die Genprodukte von *PHYTOALEXINE DEFICIENT 4 (PAD4)*, *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 (EDS1)* und *SENESCENCE ASSOCIATED GENE 101 (SAG101)* spielen in der basalen Resistenz bei kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen und in einigen *Avr-R*-Gen-vermittelten Reaktionen der Wirtsresistenz eine Rolle (Feys et al. 2001, Feys et al. 2005). In *pen2sag101pad4*-Dreifachmutanten ist die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgh* und *E. pisi* gebrochen (Lipka et al. 2005). Ein Verlust der Nichtwirtsresistenz wurde auch für *pen3eds1*-Doppelmutanten gegenüber *E. pisi* gezeigt (Stein et al. 2006).

PAD4, *EDS1* und *SAG101* konnten somit als Komponenten der posthaustoriellen Resistenz identifiziert werden, die im Zusammenspiel mit den Komponenten der prähaustoriellen Resistenz, *PEN1*, -2 und -3, zur Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen nicht-adaptierte Mehltau-Spezies beitragen.

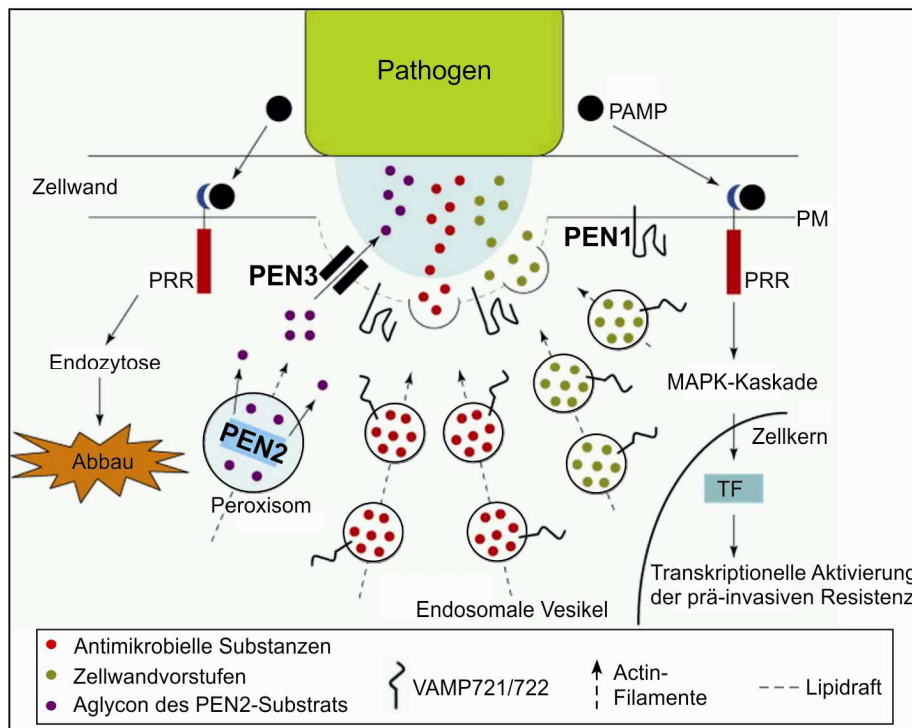


Abbildung 1-3. Schematische Darstellung der Pathogen-induzierten Akkumulation von Komponenten der Nichtwirtsresistenz in Mikrodomänen der Plasmamembran unterhalb der Angriffsstelle.

Zwei unabhängige Transportwege tragen zur Penetrationsresistenz von Arabidopsis gegenüber nicht-adaptierten Mehltau-Spezies bei: Die PEN1-abhängige Vesikel-assoziierte Sekretion vermutlich antimikrobieller Substanzen und der Transport von PEN2-aktivierten Indolderivaten über PEN3 in den Apoplasten. Am gerichteten Transport von Vesikeln und Peroxisomen zur Penetrationsstelle sind Umlagerungen des Aktin-Zytoskeletts beteiligt. Die sekretierten antimikrobiellen Substanzen und Zellwandauflagerungen verhindern oder erschweren das Eindringen in die pflanzliche Zelle. PRR, PAMP recognition receptor; TF, Transkriptionsfaktoren; PM, Plasmamembran
Abbildung verändert nach Kwon et al. (2008a)

1.3 *PHYTOPHTHORA INFESTANS* – ERREGER DER KRAUT- UND KNOLLENFÄULE

P. infestans ist ein phytopathogener Vertreter der Oomyceten, einer Gruppe Pilz-ähnlicher eukaryotischer Mikroorganismen, die sich vor allem durch ihre Cellulose- und Callose-haltige Zellwand von Pilzen unterscheiden und phylogenetisch mit Braun- und Kieselalgen verwandt sind (Kamoun und Smart 2005). Die durch *P. infestans* hervorgerufene Kraut- und Knollenfäule von Kartoffel löste in den 1840ern die große Hungersnot in Irland aus und führt noch heute weltweit zu erheblichen Ernteverlusten. Neben Kartoffel gehören Tomate und Petunie zu den wirtschaftlich bedeutenden Wirtspflanzen von *P. infestans*.

Die Bekämpfung von *P. infestans* erfolgt fast ausschließlich durch chemische Pflanzenschutzmittel. Die Erzeugung dauerhaft resistenter Kulturkartoffelpflanzen durch das Einbringen einzelner Resistenz-Gene aus Wildsorten wird durch die hohe Anpassungsfähigkeit des Oomyceten erschwert. Der Erfolg von *Phytophthora*, die Gen-für-Gen-vermittelte Resistenz zu überwinden, ist auf dessen Genomstruktur zurückzuführen. Das im Vergleich zu anderen *Phytophthora*-Spezies ungewöhnlich große Genom von *P. infestans* kann in konservierte genreiche und variable genarme Abschnitte unterteilt werden (Haas et al. 2009). Während Haushaltsgene vorwiegend in den konservierten Abschnitten liegen, werden von Genen in den variablen Genomabschnitten, die durch Sequenzwiederholungen (*repeats*) gekennzeichnet sind, viele bekannte und putative Effektorproteine kodiert. In diesen *repeat*-reichen Regionen führen Rekombinationsereignisse und Genduplikationen zu einer erhöhten Variabilität von Genen, die für die Pathogenität und Wirtsspezifität von Bedeutung sind und häufig einer positiven Selektion unterliegen (Raffaele et al. 2010).

Bei unzureichenden Bekämpfungsmaßnahmen kann *P. infestans* innerhalb weniger Tage ein ganzes Kartoffelfeld kolonisieren und zerstören. Die Infektion erfolgt v.a. durch asexuell gebildete Sporangien, die entweder selbst mit einem Keimschlauch auskeimen oder bei feuchten und kühlen Bedingungen begeißelte Zoosporen freisetzen, die auf der Blattoberfläche anhaften (encystieren) und diese mit Hilfe eines Keimschlauchs penetrieren (s. Abbildung 1-4). Als hemibiotropher Organismus durchläuft *P. infestans* zwei verschiedene Lebensphasen: Während der symptomfreien biotrophen Phase von ca. 2 Tagen breitet sich der Oomycet mit verzweigten Hyphen im Blattgewebe interzellulär aus und entwickelt Haustorien (s. Abbildung 1-4 E i-vi). In der nekrotrophen Phase, 3 bis 4 Tage nach Infektion, kommt es zur Auflösung des infizierten Wirtsgewebes und es werden wässrige braune Läsionen auf infizierten Pflanzenteilen sichtbar (s. Abbildung 1-4 A, D). Aus dem Mycel, das bei hoher Luftfeuchtigkeit als weißlicher Belag auf der Blattunterseite zu erkennen ist (s. Abbildung 1-4 A), werden Sporenträger mit Sporangien gebildet (s. Abbildung 1-4 E vii), die durch Wind oder Wasserspritzer auf andere Pflanzenteile und Nachbarpflanzen gelangen (Fry 2008).

Es wird angenommen, dass der Übergang von der biotrophen zur nekrotrophen Phase durch die koordinierte Expression und Sekretion verschiedener Effektoren reguliert wird. Während der biotrophen Phase werden v.a. Effektoren exprimiert, die im Zytoplasma der Wirtszelle aktiv sind und der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen in Form von Zelltod dienen. Im Gegensatz dazu,

werden während der nekrotrophen Phase vermehrt hydrolytische Enzyme und Zelltod-Elicitoren exprimiert und in den Apoplasten sekretiert (Kelley et al. 2010). Auch die Expression von InfestIn1 (INF1), einem *P. infestans*-spezifischen Elicitin, wirdentwicklungsspezifisch reguliert: Die Akkumulation von *INF1*-Transkript konnte nur im Mycel nachgewiesen werden und war während der Infektion von Kartoffel und Tomate in der nekrotrophen Phase erhöht (Kamoun et al. 1997b, Kelley et al. 2010).

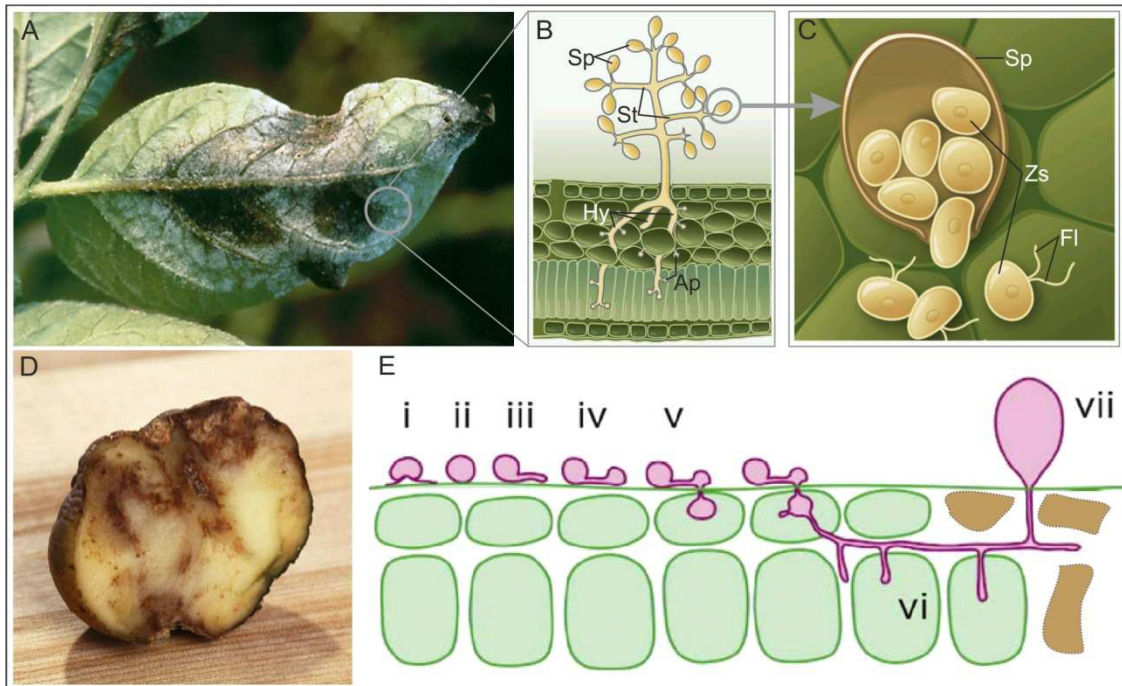


Abbildung 1-4. Infektionszyklus von *P. infestans* und Symptome auf susceptible Kartoffelpflanzen. Ein Befall mit *P. infestans* führt innerhalb weniger Tage zur Symptomausprägung auf Kartoffelblättern (A) und Knollen (D). Auf der Unterseite infizierter Blätter sind wässrige Läsionen und weißes Mycel erkennbar. Die in (E) schematisch dargestellte Infektion erfolgt i. d. R. durch begeißelte Zoosporen (i), die nach Encystierung (ii) auf der Blattoberfläche auskeimen (iii) und Appressorien ausbilden (iv). Mit Hilfe eines Keimschlauches erfolgt das Durchbrechen der Kutikula und die Penetration von Epidermiszellen, in denen Infektionsvesikel ausgebildet werden (v). Von befallenen Epidermiszellen ausgehend, breiten sich verzweigte Hyphen im Blattgewebe aus und bilden Haustorien in angrenzenden Zellen (vi). Im Verlauf der Infektion wird das befallene Pflanzengewebe nekrotisch und aus den verzweigten Hyphen entwickeln sich Sporangienträger (B) mit Sporangien (vii), aus denen 8-12 begeißelte Zoosporen freigesetzt werden können (C). Ap, Appressorien; Fl, Flagellen; Hy, Hyphen; Sp, Sporangium; St, Sporangienträger; Zs, Zoosporen (Bildquellen: (A) Fry 2008; (B und C) www.burnheads.de/images/illustration; (D) http://en.wikipedia.org/wiki/Phytophthora_infestans; (E) verändert nach Kamoun und Smart 2005)

Phytophthora- und *Pythium*-Spezies gehören der Ordnung Peronosporales an, die im Gegensatz zu Oomyceten der Ordnung Saprolegniales keine eigenen Sterole synthetisieren, sondern die für vegetatives Wachstum und Reproduktion benötigten Sterolverbindungen aus den Membranen der Wirtszellen beziehen (Hendrix 1970, Gaulin et al. 2010). Zu diesem Zweck sekretieren Vertreter der Peronosporales Elicitine, welche pflanzliche Sterole über eine hochaffine Bindungsstelle binden und mittels der nachgewiesenen Sterol-Carrier-Aktivität zugänglich machen (Mikes et al. 1997, Boissy et al. 1999). Elicitine sind hochkonservierte 10 kDa große Proteine (Kamoun et al. 1997b), die aufgrund ihrer Zelltod-induzierenden Wirkung in Tabakpflanzen entdeckt wurden (Ricci et al. 1989). Sie induzieren auch in einigen Vertretern der Kreuzblütengewächse eine HR, allerdings gehört

Arabidopsis nicht zu den INF1-responsiven Pflanzen (Takemoto et al. 2005). Aufgrund der konservierten Struktur von INF1 in *Phytophthora* und *Pythium*, der Abhängigkeit der INF1-vermittelten Zelltodreaktion von BAK1-Homologen und der Unterdrückung der HR durch *P. infestans* Effektoren wird angenommen, dass INF1 als PAMP die basale Resistenz von Tabak induziert (Kamoun et al. 1997a, Heese et al. 2007, Bos et al. 2010, Chaparro-Garcia et al. 2011). Da die Sterol-Carrier-Aktivität für die Zelltod-induzierende Wirkung der Elicitine von Bedeutung ist könnte die Bindung von Sterolen die Konformation des Elicitins verändern und somit die Interaktion mit dem entsprechenden Rezeptor ermöglichen (Osman et al. 2001).

Im Gegensatz zu Kartoffel, Tomate und Tabak ist Arabidopsis keine Wirtspflanze von *P. infestans*. Die Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* basiert u.a. auf der durch PEN2- und PEN3-vermittelten Penetrationsresistenz und bisher noch unbekanntenen Komponenten der postinvasiven Resistenz (s 1.2). Keine Rolle in der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *P. infestans* spielen die von PEN1-abhängigen Transportprozesse sowie PAD4 und SAG101, die als Komponenten der postinvasiven Resistenz gegen *Bgh* beschrieben wurden (s 1.2, Lipka et al. 2005, Westphal et al. 2008).

1.4 SYNTHESE UND BIOLOGISCHE FUNKTION VON PHYTOSTEROLEN UND STEROLDERIVATEN

Für viele eukaryotische Organismen sind Sterole von essentieller Bedeutung. Neben den höheren Pflanzen können auch Algen, die meisten Pilze und Vertebraten Sterole selbst synthetisieren (Benveniste 2004).

Als Strukturkomponenten biologischer Membranen und als Vorläufer für die Biosynthese von Steroidhormonen sind Sterole an verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen beteiligt (Boutte und Grebe 2009). Im Gegensatz zu Pilzen und Vertebraten, die im Wesentlichen nur Ergosterol bzw. Cholesterol synthetisieren, zeichnen sich Pflanzen durch eine Vielzahl von Sterolbiosyntheseprodukten aus. Die häufigsten Phytosterole sind Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Isofucosterol, während Cholesterol in eher geringerem Ausmaß vorkommt (Schaller 2004). Ausnahmen bilden dabei z.B. Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Tabak (*N. tabacum*), deren Cholesterolgehalt bis zu 20% der Gesamtsterole betragen kann (Sitbon et al. 2003). In der Zelle liegen Sterole entweder unkonjugiert als freie Sterole (FS) oder konjugiert als Sterolester (SE), Sterolglycoside (SG) und acylierte Sterolglycoside (ASG) vor (Abbildung 1-6, Benveniste 2004). Der Anteil dieser verschiedenen Sterollipid-Klassen an der Gesamtheit der Sterolverbindungen kann in Abhängigkeit von der Pflanzenart erheblich variieren. In Arabidopsis machen die FS mit 88% den größten Teil der Gesamtsterole aus (Patterson et al. 1993), wohingegen in vielen Solanaceen der Anteil an glycosylierten Sterolkonjugaten (SG + ASG) z.T. über 80% beträgt (Duperon et al. 1983, 1984).

1.4.1 FREIE STEROLE – MEMBRANKOMPONENTEN, SIGNALMOLEKÜLE UND BRASSINOSTEROID-VORLÄUFER

Sterole bestehen aus Isoprenoid-Einheiten, die hauptsächlich über den zytosolischen Mevalonat (MEV)-Weg, in den Plastiden hingegen über den Methylerytritolphosphat (MEP)-Weg, synthetisiert werden. Die Synthese von MEV aus drei Molekülen Acetyl-CoA wird u.a. durch die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR) katalysiert (Abbildung 1-5). Deren Aktivität unterliegt verschiedenen transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationsmechanismen, wodurch die Isoprenoid-Biosynthese dem aktuellen Bedarf in der Zelle angepasst wird (Stermer et al. 1994, Nieto et al. 2009). Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) werden über mehrere Zwischenschritte zu Squalen, einer C30-Verbindung, verknüpft. In Pflanzen wird 2,3-Oxidosqualen (OS) hauptsächlich zu Cycloartenol umgesetzt, aber auch der für Pilze und Säuger charakteristische Syntheseweg über Lanosterol konnte in Pflanzen nachgewiesen werden. Insgesamt werden 1,5% des Sitosterols über Lanosterol und 98,5 % über Cycloartenol synthetisiert (Ohyama et al. 2009). Die letzten Schritte der von Cycloartenol ausgehenden Sterolbiosynthese lassen sich in drei verschiedene Abschnitte unterteilen (Abbildung 1-5): Der Erste Methylierungsschritt wird durch die Sterol-Methyltransferase 1 (SMT1, Diener et al. 2000) katalysiert und führt über mehrere Zwischenschritte zur Bildung von 24-Methyl-Sterolen, wie z.B. Campesterol. Über einen zweiten Methylierungsschritt, katalysiert durch die SMT2 (Bouvier-Navé et al. 1998), werden 24-Ethyl-Sterole, wie Isofucosterol, Sitosterol und Stigmasterol gebildet. Pflanzliches Cholesterol geht ohne Methylierungsschritt aus Cycloartenol hervor. Strukturformeln von Stigmasterol, Sitosterol, Campesterol und Cholesterol sind in Abbildung 1-6 gezeigt.

Alle pflanzlichen Gewebe sind in der Lage, ihr eigenes Set an Sterolen zu synthetisieren. Ausgehend von Squalen laufen die enzymatischen Schritte v.a. in den Membranen des ERs ab, wobei aber auch die Beteiligung von Plasmamembran-assoziierten Enzymen diskutiert wird (Hartmann 1998). Der Transport der Sterole aus dem ER in die Plasmamembran erfolgt vermutlich über den Golgi Apparat (Boutte und Grebe 2009).

Die Endprodukte der Sterolbiosynthese werden v.a. als Strukturkomponenten in die Membran eingebaut, dienen aber auch als Vorläufer für die Synthese sekundärer Stoffwechselprodukte. Weiterhin handelt es sich bei den 24-Methyl-Sterolen um Ausgangssubstanzen für die Synthese von Brassinosteroiden. Brassinosteroide sind pflanzliche Steroidhormone, die in jungen wachsenden Geweben Zellwachstum, -teilung und -differenzierung regulieren und somit eine entscheidende Rolle in der pflanzlichen Entwicklung spielen. Generell werden sie als wachstumsfördernde Hormonklasse beschrieben (Clouse und Sasse 1998).

Die Bedeutung von Sterolen für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen wird bei Betrachtung der verschiedenen Sterolbiosynthese-Mutanten deutlich. Durch Mutation hervorgerufene Defekte in Synthesenzymen führen zu einem Ungleichgewicht der Sterolbiosynthese-Zwischen- und

Endprodukte und haben drastische Wachstums- und Entwicklungsphänotypen zur Folge (Lindsey et al. 2003). Sterolbiosynthese-Mutanten lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Die einen Mutanten sind in einem relativ frühen Teil der Sterolbiosynthese beeinträchtigt und deren Phänotyp kann nicht durch Brassinosteroid-Gabe revertiert werden. Bei anderen Mutanten, mit Defekte in späteren Schritten der Sterolbiosynthese, wirkt sich die Mutation auf die Brassinosteroidsynthese aus und deren Phänotypen sind durch Brassinosteroid-Gaben revertierbar. Zur ersten Gruppe gehört z.B. die *fackel* Mutante (Abbildung 1-5 B), die Defekte in der Embryonalentwicklung aufweist und deren Keimlinge mehrere Keimblätter ausbilden sowie ein verringertes Wurzelwachstum zeigen (Schrick et al. 2000). Die Entwicklungsstörungen der Mutanten der zweiten Gruppe, wie z.B. die zwergwüchsigen *dwarf* (*dwf*) 1, *dwf5* und *dwf7* (Abbildung 1-5 A, Choe et al. 1999a, Choe et al. 1999b, Choe et al. 2000) gehen v.a. auf verringerte Brassinosteroid-Gehalte zurück.

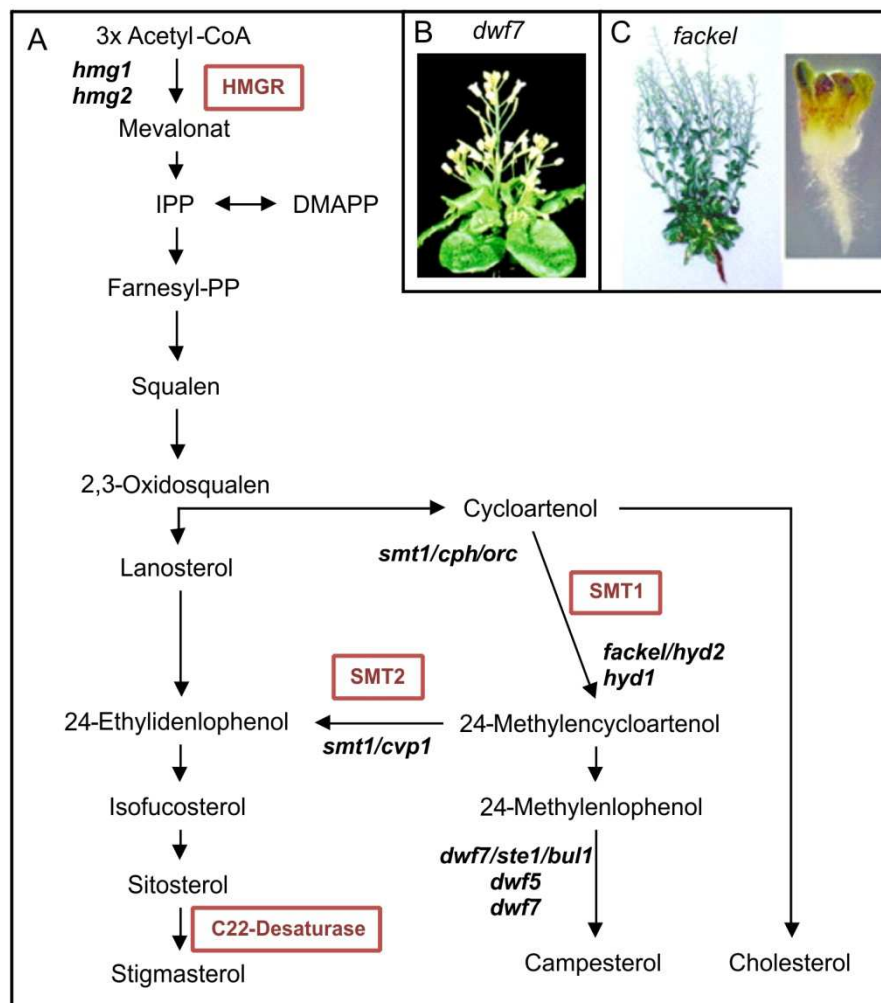


Abbildung 1-5. Sterolbiosynthese und Sterolbiosynthese-Mutanten in Arabidopsis.

(A) Vereinfachtes Schema der Sterolbiosynthese in Pflanzen. Ausgewählte Enzyme sind rot markiert. Die Anzahl der Pfeile entspricht nicht der Anzahl der jeweiligen enzymatischen Schritte. Sterolbiosynthese-Mutanten sind kursiv benannt und entsprechend ihrer defekten Enzyme in den Stoffwechselweg eingeordnet. (Clouse 2002, Lindsey et al. 2003, Boutte und Grebe 2009)

HMGR und *hmg*, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA-Reduktase; PP, Diphosphat; IPP, Isopentenyl-PP; DMAPP, Dimethylallyl-PP; SMT, Sterol-Methyltransferase; *cph*, cephalopod; *hyd*, hydra; *dwf*, dwarf; *ste*, sterol; *bul*, boule;

(B) Phänotyp einer adulten *dwf7* Mutante, die wie andere Brassinosteroid-defiziente Mutanten ein stark reduziertes Wachstum aufweist (Choe et al. 1999b).

(C) *fackel* Mutanten bilden häufig mehrere Kotyledonen aus und zeigen während der weiteren Entwicklung ein stark reduziertes Wachstum (Schrick et al. 2000).

Als Membrankomponenten regulieren Sterole das Fließvermögen und die Durchlässigkeit der Membran. Ihre polare freie Hydroxylgruppe ist nach außen ins wässrige Milieu und das hydrophobe Ringsystem ins Innere der Phospholipid-Doppelschicht gerichtet (Hartmann 1998), wo sie mit den Fettsäureketten von Phospholipiden und Proteinen interagieren. Nicht nur durch die Regulation des Flüssigkeitszustandes der Membran, sondern auch durch eine direkte Interaktion mit Membranproteinen, können Sterole Membran-assoziierte Vorgänge modulieren (Lindsey et al. 2003).

Eine Akkumulation von Sterolen und Sphingolipiden wurde in Plasmamembran-Mikrodomänen (*membrane rafts*) beobachtet, die sich strukturell von der homogenen Zusammensetzung der Plasmamembran unterscheiden (Mongrand et al. 2010). Solche Mikrodomänen haben aufgrund ihrer stark geordneten Lipidstruktur eine geringere Detergenz-Löslichkeit, weshalb sie auch oft als *detergent resistant membrane* (DRM) bezeichnet werden (Tanner et al. 2011). Es wird vermutet, dass solche Membran-Mikrodomänen funktionelle Plattformen für Protein-Interaktionen und Signalvermittlung darstellen (Mongrand et al. 2010).

Aufgrund der vielfältigen Funktion von Sterolen in der Pflanze ist die Regulation der Sterolbiosynthese von essentieller Bedeutung, jedoch ist bisher wenig über die Regulation der Expression der involvierten Gene bekannt (Schaller 2004).

1.4.2 STEROLESTER – SPEICHERFORM FREIER STEROLE

Die Synthese von SEs aus freien Sterolen kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen (Abbildung 1-6): Acyl-CoA-abhängig durch AcyCoA-AcyTransferasen (ACAT, Chang et al. 1993) oder ACAT-verwandte Enzyme (ACAT-related, Are), z.B. Are1 und Are2 aus Hefe (H. Yang et al. 1996) und Acyl-CoA-unabhängig durch Lecithin:Cholesterol-AcyTransferasen (LCAT, Rogne et al. 1987).

In Arabidopsis wurden sechs Gene identifiziert, deren Sequenz eine Homologie zu LCAT-Genen aus Mensch und Hefe aufweisen (Stahl et al. 2004). Dazu gehört u.a. die Phospholipid:Sterol-AcyTransferase1 (PSAT1, At1g04010), die als erste Sterolestersynthase von Banas et al. (2005) isoliert und charakterisiert wurde. Die Enzymaktivität der PSAT1 ist am höchsten mit Phosphatidylethanolamin (PE) als Acyl-Donor und wird durch Sterolbiosynthese-Endprodukte induziert (Banas et al. 2005). PSAT1 kann Fettsäureketten sowohl auf End- als auch auf Zwischenprodukte der Sterolbiosynthese übertragen und ihr wird eine regulatorische Funktion in der Aufrechterhaltung der Sterolhomöostase zugesprochen (Banas et al. 2005).

Die AcyCoA:Sterol-AcyTransferase ASAT1 (At3g51970) katalysiert in Arabidopsis die Bildung von SEs über den Acyl-CoA-abhängigen Weg (Chen et al. 2007). In Blättern tragen sowohl ASAT1 als auch PSAT1 zur Sterolestersynthese bei, wohingegen in Samen hauptsächlich PSAT1 die Bildung von SEs katalysiert (Bouvier-Navé et al. 2010).

SE gehören gemeinsam mit Triacylglyceriden (TAG) und Wachsesteren zur Klasse der neutralen Lipide, welche nicht in Membranen eingebaut werden können, sondern in Lipidtröpfchen gespeichert werden (Athenstaedt und Daum 2006). Lipidtröpfchen bestehen aus einem hydrophoben Kern aus

neutralen Lipiden, der von einer einfachen Phospholipidschicht umschlossen ist (Zweytick et al. 2000a). Da für Enzyme, welche an der Synthese neutraler Lipide in Hefe und Pflanzen beteiligt sind, z.T. eine Lokalisation im ER nachgewiesen werden konnte (Sorger und Daum 2002, Mullen et al. 2006, H. U. Kim et al. 2011), wird als Entstehungsort der Lipidtröpfchen ebenfalls das ER angenommen. Es wird postuliert, dass die im ER synthetisierten neutralen Lipide zwischen der Doppellipidschicht des ER bis zum Erreichen einer bestimmten Tropfengröße akkumulieren und dann ins Zytosol abgeschnürt werden (Modell der Lipidtröpfchen-Entstehung in Zweytick et al. 2000a). Solche Lipidtröpfchen dienen der Lipidspeicherung sowie der Bereitstellung von Fettsäuren zur Energiegewinnung und Membranlipid-Biosynthese. Der Abbau der neutralen Lipide und die Bereitstellung von Fettsäuren scheint direkt an oder in den Lipidtröpfchen stattzufinden, da für TAG-Lipasen und SE-Hydrolasen aus Hefe Enzymaktivität und subzelluläre Lokalisation mit Lipidtröpfchen assoziiert sind (Daum et al. 2007). Lipidtröpfchen können durch den hydrophoben Farbstoff Nil Rot sichtbar gemacht werden (s. 2.2.9.4). Mit Hilfe dieser Färbung konnten De Domenico et al. (2007) für Tabak, Arabidopsis und Medicago zeigen, dass auch in nicht Ölspeichernden pflanzlichen Geweben neutrale Lipide in Lipidtröpfchen akkumulieren.

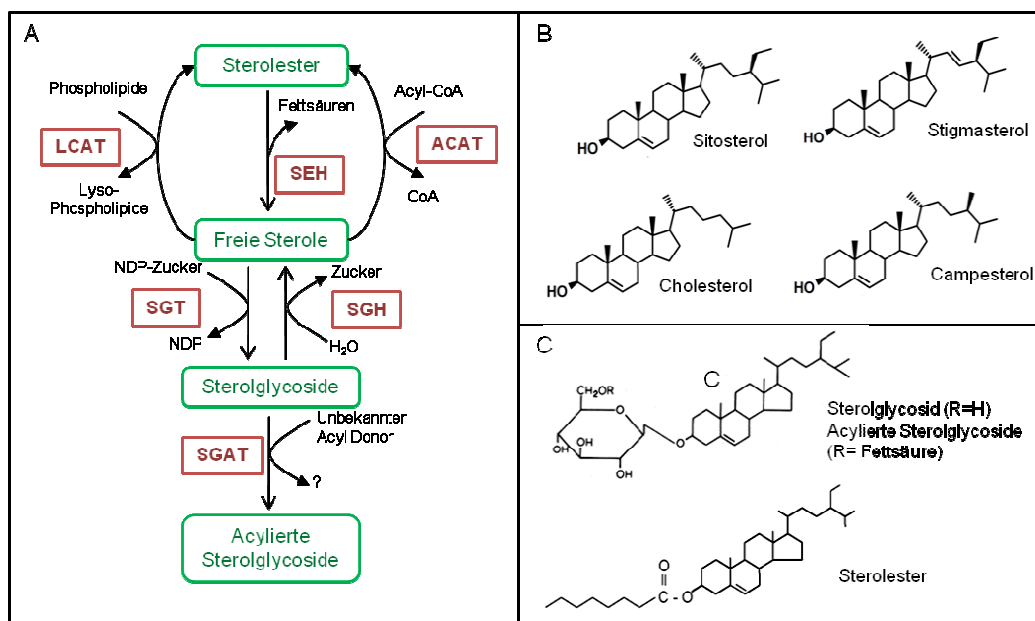


Abbildung 1-6. Freie Sterole und Sterolkonjugate

(A) Meta- und Katabolismus von Sterolestern und glycosylierten Sterolen. Beteiligte Enzyme sind rot und Lipide grün markiert. Für den Auf- und Abbau benötigte oder dabei entstehende Verbindungen sind jeweils neben den richtungsweisenden Pfeilen vermerkt. (Abb. nach Grille et al. 2010 und Athenstaedt und Daum 2006)

(B) und **(C)** Strukturformeln ausgewählter freier **(B)** und konjugierter Phytosterole **(C)**. (Schaller 2004; <http://lipidlibrary.aocs.org>). LCAT, Lecithin:Cholesterol-Acyltransferase; ACAT, Acyl-CoA:Cholesterol-Acyltransferase; SHE, Sterolesterhydrolase; SGT, NDP-Zucker: Sterol-Glycosyltransferase; SGH, Sterolglycosidhydrolase; SGAT, Sterolglycosid-Acyltransferase.

1.4.3 GLYCOSYLIERTE STEROLE – MODULATION VON MEMBRANEIGENSCHAFTEN

SG und ASG sind in Gefäßpflanzen ubiquitär verbreitet und stellen neben den freien Sterolen ebenfalls Strukturkomponenten von Membranen dar. Sterolglycoside sind hauptsächlich Sterolbiosynthese-Endprodukte und tragen als Derivate unkonjugierter Membransterole einen Zuckerrest am C3-Atom des Sterols (Grille et al. 2010). Durch den Zuckerrest wird der hydrophile Teil des Membranlipids vergrößert, was die biophysischen Eigenschaften der Membran beeinflussen kann. Die Glycosylierung freier Sterole wird durch membrangebundene Sterol-Glycosyltransferasen katalysiert. Dabei liegt das Zuckermolekül, das über eine glycosidische Bindung auf die freie OH-Gruppe des Sterols übertragen wird, in aktivierter Form als Zuckernukleotid vor. In Pflanzen fungiert vor allem Uridindiphosphat (UDP)-Glucose als Zuckerdonor. Mittlerweile sind zwei UDP-Glucose: Sterol-Glycosyltransferasen-kodierende Gene im Arabidopsis-Genom bekannt, die als UGT80A2 (AT3G07020) und UGT80B1 (AT1G43620) annotiert wurden (Warnecke et al. 1997, DeBolt et al. 2009). Der Abbau von SGs wird durch Sterolglycosidhydrolasen (SGH) katalysiert (Kalinowska und Wojciechowski 1978, 1985).

ASG entstehen durch Verknüpfung einer Fettsäurekette mit der freien Hydroxylgruppe des C6-Atoms im Glukosemolekül eines SGs. Diese Veresterung von SGs wird durch Sterolglycosid-Acyltransferasen (SGAT) katalysiert. *In vitro*-Studien mit verschiedenen Pflanzenextrakten zeigten, dass an dieser Reaktion kein Acyl-CoA beteiligt ist, sondern Acylreste von Phosphoglycerolipiden und bzw. oder Galaktolipiden übertragen werden (Grille et al. 2010). ASG kommen nicht nur in Pflanzen, sondern auch in Algen, Oomyceten und Tieren vor, sowie vereinzelt in Pilzen und Bakterien. Bisher wurden allerdings noch keine SGATs aus einem dieser Organismen isoliert und kloniert (Grille et al. 2010).

Die biologischen Funktionen von SGs und ASGs sind bisher noch relativ unklar. Es wird angenommen, dass sie im Zusammenspiel mit anderen Lipiden den Flüssigkeitszustand der Membran beeinflussen (1.4.1).

Peng et al. (2002) postulierten eine Beteiligung von SGs an der Cellulose-Synthese in Arabidopsis, da Sitosterol- β -Glycosid von einer CesA-Glycosyltransferase zur Initiierung der Cellulose-Synthese genutzt werden kann und Cellulose-Synthese-Inhibitoren die Sitosterol- β -Glycosid-Synthese hemmen. Da aber *ugt80A2ugt80B1*-Doppelmutanten trotz des stark reduzierten SG-Gehalts keine verminderte Cellulose-Mengen aufweisen, ist dieser Zusammenhang fraglich. Möglicherweise aber reichen die in *ugt80A2ugt80B1* gemessenen geringen Restmengen von SGs aus, um die Cellulosesynthese zu initiieren (DeBolt et al. 2009). Das langsame Wachstum und die Defekte in der Zellelongation während der Embryonalentwicklung in *ugt80A2ugt80B1* deuten auf weitere Funktionen von SGs und ASGs während der Entwicklung hin. Der pleiotrope *transparent testa*-Phänotyp in *ugt80B1*-Mutanten ist vermutlich auf Defekte der Cutin- und Suberin-Synthese zurückzuführen und deutet eine Funktion

von SGs und ASGs für den Transport oder Export von monomeren Lipid-Polyester-Vorstufen an (DeBolt et al. 2009, Grille et al. 2010).

1.5 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT

Die bisherigen Publikationen zur Nichtwirstresistenz von Arabidopsis beschäftigen sich v.a. mit den nicht-adaptierten Mehltaupilzen *B. graminis* und *E. pisi* (Collins et al. 2003, Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006). Es wurde gezeigt, dass Pathogen-induzierte Sekretionsprozesse und die Freisetzung antimikrobieller Metabolite sowie deren Export in den Apoplasten unterhalb der Penetrationsstelle zur Penetrationsresistenz beitragen (Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006, Kwon et al. 2008b). Bei Verlust der Penetrationsresistenz halten postinvasive Mechanismen die Nichtwirtsresistenz aufrecht. Aufgrund dieser Vielschichtigkeit der Abwehrantworten ist die Nichtwirtsresistenz die stabilste und dauerhafteste Form der natürlichen Pathogenresistenz.

P. infestans stellt als Erreger der Kraut- und Knollenfäule im Kartoffelanbau weltweit ein beträchtliches wirtschaftliches Problem dar. Die Bekämpfung des Schaderregers durch Pestizide verursacht jährlich große Kosten. Die Züchtung resistenter Sorten durch Kreuzung mit resistenten Wildsorten oder Einbringen spezifischer Resistenzgene ist zeitaufwendig und aufgrund der hohen Dynamik des *Phytophthora*-Genoms nicht von Dauer (Haas et al. 2009). Die Analyse und Identifizierung von Komponenten der Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* ist eine Möglichkeit, effektive Abwehrmechanismen gentechnisch in Wirtspflanzen zu etablieren.

In vorherigen Arbeiten wurde das Nichtwirtspathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* etabliert und *PEN2* als eine der beteiligten Komponenten identifiziert (Lipka et al. 2005). Zur Aufklärung zusätzlicher Faktoren erfolgte eine Remutagenese der *pen2*-Mutante mit Ethylmethansulfonat (EMS). Im anschließenden Screen mit *P. infestans* konnten aus 14 verschiedenen M2-Pools 31 Mutanten selektiert werden, die einen stärkeren HR-Phänotypen als *pen2* aufwiesen (Landtag 2006). Entsprechend der verstärkten Abwehrreaktion erhielten diese Mutanten die Bezeichnung *enhanced response to Phytophthora (erp)* 1 bis 14. Mit Hilfe der *erp*-Mutanten können Gene isoliert und charakterisiert werden, die entweder in einem von *PEN2*-unabhängigen Signalweg in der Penetrationsresistenz agieren oder zur postinvasiven Resistenz beitragen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der *erp1* Mutante sowie die Identifizierung des *ERP1*-Gens und die funktionelle Charakterisierung des Genproduktes. Die Rolle von ERP1 in der Sterolhomöostase von Arabidopsis und in der Abwehr von *P. infestans* und anderen Pathogenen sollte geklärt werden. Darüber hinaus sollte *AtERP1* in Kartoffel eingebracht werden, um transgene Kartoffel-Linien mit möglicherweise veränderter Anfälligkeit gegen *P. infestans* zu erzeugen. Außerdem sollten, basierend auf Sequenz-Vergleichen, *ERP1*-ähnliche Gene und deren Bedeutung in Kartoffel untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Alle hier angegebenen Medien und Lösungen wurden, je nach Hitzebeständigkeit, bei 121°C und einem Druck von 1 bar für 20 min. autoklaviert oder sterilfiltriert (Rotilabo® Spritzenfilter, 22 µm). Nicht autoklavierte Geräte wurden durch Abflammen oder Abwischen mit 70% Ethanol (v/v) sterilisiert. Soweit nicht anders vermerkt, wurde einfach destilliertes Wasser, welches mit einer Wasser-Deionierungsanlage der Marke QPAK®, MILLIPORE, WATERS (Eschborn, Deutschland) aufbereitet wurde, als Lösungsmittel benutzt.

2.1 MATERIAL

2.1.1 PFLANZEN

In dieser Arbeit wurde der Arabidopsis-Ökotyp Columbia (Col-0 und Col-3 *gll*) verwendet, dessen Saatgut vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) und V. Lipka (Georg-August-Universität, Göttingen) bezogen wurde. Das Saatgut der Mutanten *pen2* (genetischer Hintergrund Col-3 *gll*) und *pmr4-1* (genetischer Hintergrund Col-0) wurde freundlicherweise von V. Lipka (Georg-August-Universität, Göttingen) bzw. S. Somerville (University of California, Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt. Die Mutante *erp1* ging aus remutagenisiertem *pen2*-Saatgut hervor, dass einem Mutantenscreen mit *P. infestans* unterzogen wurde (Landtag 2006). Die EMS-Remutagenese von *pen2* wurde von J. Landtag (IPB, Halle) und V. Lipka am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (Köln) durchgeführt. Die Durchmusterung der Remutagenese-Mutanten in der M2-Generation und die Isolierung der insgesamt 14 *enhanced response to Phytophthora (erp)*-Mutanten erfolgte durch J. Landtag und L. Westphal (IPB, Halle). Alle Pflanzen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf einem Gemisch aus gedämpfter Einheitserde (GS90) und Vermiculit im Verhältnis 3:1 unter definierten Kurztagbedingungen (8 h Licht ([160 µE]), 16 h Dunkel, 22°C, 60% relative Luftfeuchtigkeit) in einer Phytokammer angezogen.

Neben Arabidopsis wurden auch Experimente mit *S. tuberosum* durchgeführt. Die verwendete Kartoffelsorte Désirée ist gegenüber den verwendeten *P. infestans* Stämmen (s. Tabelle 2-1) suszeptibel, da sie kein bekanntes R-Gen trägt. Alle transgenen Pflanzen wurden im Désirée-Hintergrund erzeugt. Als Vektorkontrolle dienten Pflanzen, die von A. Weinel (IPB, Halle) mit einem leeren pGPTV-Vektor transformiert worden waren. Die Kartoffelpflanzen wurden auf 2MS-Medium mit zusätzlichen Vitaminen (s. Tabelle 2-3) als Spross-Stecklinge steril angezogen und vermehrt. Um der Kontamination mit *Agrobacterium tumefaciens* vorzubeugen, wurde dem Medium Carbenicillin (250 µg ml⁻¹) zugefügt. Zur Selektion transgener Pflanzen wurde außerdem das Antibiotikum Kanamycin (50 µg ml⁻¹) zugegeben. Zur Durchführung von Experimenten wurden 3-4 Wochen alte bewurzelte Stecklinge in ein Gemisch aus gedämpfter Erde und Sand (1:1) ausgetopft und unter

definierten Langtagbedingungen (16 h Licht ([200 µE]) bei 20°C, 8 h Dunkel bei 18°C, 60% relative Luftfeuchtigkeit) in einer Phytokammer angezogen.

2.1.2 PFLANZENPATHOGENE

Die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenpathogene, deren in den Referenzen genannten Bezeichnungen und die entsprechenden Bezugsquellen sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1. Verwendete Pflanzenpathogene

Pathogen	Bezeichnung (Merkmal)	Referenz	Bezugsquelle
<i>Phytophthora infestans</i>	CRA208m2 (GFP)	Si-Ammour et al. 2003	F. Mauch, Universität Fribourg, Schweiz
<i>Phytophthora infestans</i>	PHP301 (inf1) 1306	Ah-Fong et al. 2008	H. Judelsohn, University of California, Riverside, USA
<i>Blumeria graminis f. sp. hordei</i>	Isolat K1	Lipka et al. 2005	V. Lipka, Georg-August- Universität, Göttingen
<i>Colletotrichum lagenarium</i> (syn. <i>orbiculare</i>)	104-T	Hiruma et al. 2010	Yoshitaka Takano, Universität Kyoto, Japan
<i>Colletotrichum higginsianum</i>	IMI 349061	O'Connell et al. 2004	-
<i>Golovinomyces cruciferarum</i>	UEA1	Adam et al. 1999	-
<i>Golovinomyces cichoracearum</i>	UCSC1		-
<i>Pseudomonas syringae pv.</i> <i>tomato</i>	DC3000	Whalen et al. 1991, Buell et al. 2003	Justin Lee, IPB, Halle
<i>Pseudomonas syringae pv.</i> <i>phaseolicola</i>	Psp1448A	Joardar et al. 2005	Justin Lee, IPB, Halle

2.1.3 KLONIERUNGSVEKTOREN

Die Klonierungen wurden mit Hilfe des Gateway® Systems von Invitrogen durchgeführt und richteten sich nach den Protokoll-Vorschriften des Herstellers. Die Tabelle 2-2 bietet eine Übersicht über die verwendeten Klonierungsvektoren, deren Eigenschaften, die Antibiotika-Resistenzen der jeweiligen Klone oder transgenen Pflanzen und die entsprechenden Referenzen.

Tabelle 2-2. Verwendete Klonierungsvektoren

Gateway® System	Vektor-Bezeichnung	Eigenschaften	Resistenzen	Referenz
-	pCR®2.1-TOPO®	lacZ, TA-cloning, 3,9kb	Kan, Amp	Invitrogen
Donor-Vektor	pENTR™/D-TOPO®	attL1/L2, 5'Ende Primer CACC, blunt end	Kan	Invitrogen
	pCR®8/GW/TOPO® TA	attL1/L2, TA-cloning	Spec	
	pDONR™221	attP1/P2	Kan	
	pGWB14	attR1/R2, Pro35s, C-term. 3xHA	Kan, Hyg	Nakagawa et al. 2007
Ziel-Vektor	pEARLEY 103	attR1/R2, Pro35s, C-term. GFP Fusion	BASTA, Kan	Earley et al. 2006
	pEARLEY 104	attR1/R2, Pro35s, N-term. YFP Fusion	BASTA, Kan	
	pUBC GFP	attR1/R2, ProUBQ10, C-term. GFP Fusion	Spec	Grefen et al. 2010
	pUBC CFP	attR1/R2, ProUBQ10, C-term. CFP Fusion	Spec	
	pUBN GFP	attR1/R2, ProUBQ10, N-term. GFP Fusion	Spec	
	pUBN CFP	attR1/R2, ProUBQ10, N-term. CFP Fusion	Spec	
	pDEST™17	attR1/R2, N-term. 6xHis	Amp	Invitrogen
	pHELLSGATE8	attR1/R2, RNAi-hairpin-Konstrukt mit Intron	Kan	Wesley et al. 2001

Kan, Kanamycin; Amp, Ampicillin; Spec, Spectinomycin; Hyg, Hygromycin; BASTA, Glufosinat-haltiges Herbizid; att, *attachment site*; term., terminal; ProUBQ10, Ubiquitin 10-Promotor

2.1.4 BAKTERIENSTÄMME

Für Klonierungsarbeiten und die heterologe Expression von Proteinen wurden die *E. coli*-Stämme DH5 α bzw. BL21 (Invitrogen) verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37°C in LB-Medium (s. Tabelle 2-3) mit den entsprechenden Antibiotika (50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Spectinomycin oder 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Ampicillin). Für die Transformation von *Arabidopsis* und *N. benthamiana* mittels *A. tumefaciens* wurde der Stamm GV3101 pMP90 verwendet. Für die Transformation von Kartoffelpflanzen wurde der *A. tumefaciens*-Stamm AGL0 verwendet (Lazo et al. 1991). Die Agrobakterien-Anzucht erfolgte bei 28°C und ebenfalls in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (80 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Rifampicin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin oder 100 mg ml^{-1} Spectinomycin).

2.1.5 CHEMIKALIEN, ENZYME UND OLIGONUKLEOTIDE

Alle in dieser Arbeit angegebenen Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, in Analysequalität eingesetzt und von den Firmen Bio-Rad, Carl Roth, Fluka, GE Healthcare, Merck, Serva oder Sigma-Aldrich bezogen. Lieferanten der Nährmedien-Inhaltsstoffe und Antibiotika waren

Difco, Duchefa, Serva und Sigma-Aldrich. Die für molekularbiologische Arbeiten verwendeten Enzyme kamen von Invitrogen, Fermentas, ROCHE oder New England Biolabs. Antikörper wurden von Invitrogen geliefert bzw. von Eurogentec synthetisiert. Die Synthese von Oligonukleotiden erfolgte durch Eurofins MWG Operon. Das flg22-Peptid wurde von Sylvia Krüger (IPB, Halle) mittels Festphasensynthese mit einem *Economy Peptide Synthesizer EPS221* (Abimed) hergestellt.

2.1.6 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Die Zusammensetzung der in dieser Arbeit verwendeten Anzucht-Medien ist in Tabelle 2-3, Puffer und Lösungen sind in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-3. Zusammensetzung verschiedener Medien

ATS-Medium (Estelle und Somerville 1987)	1,0 M KNO ₃	2 bzw. 3 MS-Medium (Murashige und Skoog 1962)	0,441 % (w/v) MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL)	
	1,0 M KPO ₄		0,6 % (w/v) plant agar	
	1,0 M MgSO ₄		2 bzw. 3 % (w/v) Saccharose	
	1,0 M Ca(NO ₃) ₂		0,1% (v/v) Vitaminlösung (s.u.)	
	20 mM Fe-EDTA			
1/2 MS-Medium (Murashige und Skoog 1962)	70 mM H ₃ BO ₃	GMS-Medium	pH 5,8 (KOH)	
	14 mM MnCl ₂		0,441 % (w/v) MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL)	
	0,5 mM CuSO ₄		0,6 % (w/v) plant agar	
	1,0 mM ZnSO ₄		1,6 % (w/v) Glucose	
	0,2 mM Na ₂ MoO ₄		Vitaminlösung	pH 5,8 (KOH)
	10 mM NaCl			0,5 mg ml ⁻¹ Nicotinsäure
	0,01 mM CoCl ₂			0,5 mg ml ⁻¹ PyridoxinxHCl
	(0,5% (w/v) plant agar)			0,1 mg ml ⁻¹ ThiaminxHCl
Hafer-Bohne-Medium	0,245 % (w/v) MS-Salze (Duchefa, Haarlem, NL) 0,25% (w/v) Saccharose 1mM MES pH 5,7 (KOH)	CG76-Medium:	2 mg ml ⁻¹ Glycin	
			250 µg ml ⁻¹ Carbenicillin	
			0,1 µg ml ⁻¹ BAP	
			5 µg ml ⁻¹ NAA	
LB-Medium	3,4% (w/v) Bohnenmehl 1,7% (w/v) Hafermehl 8,5% (w/v) Saccharose 1,5% (w/v) Agarose	CG75H-Medium	0,1% (v/v) Vitaminlösung (s.o.) in GMS (s.o.)	
			250 µg ml ⁻¹ Carbenicillin	
			2,0 µg ml ⁻¹ Zeatinriboside	
			0,02 µg ml ⁻¹ NAA	
			0,02 µg ml ⁻¹ GA3	
1 % (w/v) Bacto-Trypton 0,5 % (w/v) Bacto-Yeast Extract 0,5 % (w/v) NaCl (1,5 % [w/v] Agar)			0,1% (v/v) Vitaminlösung (s.o.) in GMS s.o.	

Tabelle 2-4. Zusammensetzung verschiedener Puffer und Lösungen

1 x TAE-Puffer	40 mM Tris 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA	Lysispuffer	50 mM KH_2PO_4 , pH 7,8 400 mM NaCl 100 mM KCl 10% Glycerin 0.5% Triton X-100 10 mM Imidazol 0,1 % Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich) 0,1 % Lysozym
10 x DNA-Probenpuffer	50% (v/v) Glycerin 120 mM EDTA pH 8,0 20 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1% Bromphenolblau	Protein-Extraktionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl 10% glycerol 1% (w/v) Nonidet P-40 0.5% (w/v) Natriumdesoxycholat 0,1 % Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich)
RNA-Probenpuffer	42,4 % (v/v) Formamid 28,2 % (v/v) 10 x MOPS 13,6 % (v/v) Formaldehyd 5,6 % (v/v) Wasser 5,6 % (v/v) Glycerin 10% Bromphenolblau	2xSDS-Probenpuffer	125 mM Tris-HCl pH 6,8 6,8; 4% (w/v) SDS 20% (v/v) Glycerin 2% (v/v) β -Mercaptoethanol 0,05% (w/v) Bromphenolblau
1 x MEN-Puffer	20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA pH 7,0	TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl
DNA-Extraktionspuffer	100 mM Tris-HCl pH 8,0 50 mM EDTA pH 8,0 500 mM NaCl 1,5 % SDS	Transferpuffer	50 mM Tris 40 mM Glycin 20% (v/v) Methanol
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M NaOH	Coomassie-Lösung	0,025 % (w/v) Coomassie G-250 10 % (v/v) Essigsäure 40% (v/v) Ethanol
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH7.0	Entfärber-Lösung	30 % (v/v) Methanol 5 % (v/v) Glycerin 10% (v/v) Essigsäure
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natrium-tri-Citrat-Dihydrat)	Trypan-Blau-Lösung	0,1% Trypanblau in 1 Vol. Lactophenol 2 Vol. Ethanol
Hybridisierungspuffer	0,9 M NaCl 50 mM NaH_2PO_4 5 mM EDTA 0,1 % SDS 50 % (v/v) Formamid 0,2 % PVP 40 0,2 % Ficoll 400 0,2% BSA >100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ hitzedenaturierte Heringssperma-DNA	Lactophenol	25% (v/v) Glycerin 25 % (v/v) Milchsäure 25% (v/v) Phenol 25% tridest. H_2O
		Anilinblau-Lösung	150 mM KH_2PO_4 0.01 % Anilinblau in H_2O pH 9,5 (KOH)

2.1.7 DATENBANKEN UND INTERNETRESSOURCEN

Sequenzdatenbanken:	<ul style="list-style-type: none"> • http://www.arabidopsis.org/ • http://www.ncbi.nlm.nih.gov • http://plantta.jcvi.org • http://solgenomics.net/
Sequenzvergleiche:	<ul style="list-style-type: none"> • http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/ • http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Suche nach DNA-Restriktionsschnittstellen:	<ul style="list-style-type: none"> • http://tools.neb.com/NEBcutter2/ • http://www.arabidopsis.org/cgi-in/patmatch/RestrictionMapper.pl
Vorhersage der subzellulären Lokalisation:	<ul style="list-style-type: none"> • http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi • http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/
Vorhersage von Signalpeptiden:	<ul style="list-style-type: none"> • http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ • http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
Expressionsdatenbank:	<ul style="list-style-type: none"> • https://www.genevestigator.com/gv/plant.jsp
Netzwerk-Vorhersage Koregulierter Gene:	<ul style="list-style-type: none"> • http://atted.jp/
Übersetzung von DNA- in Aminosäuresequenzen:	<ul style="list-style-type: none"> • http://www.expasy.org/tools/#translate
Erwerb und Analyse von T-DNA-Insertionslinien:	<ul style="list-style-type: none"> • http://signal.salk.edu/
Primerdesign	<ul style="list-style-type: none"> • http://frodo.wi.mit.edu/primer3/

2.2 METHODEN

2.2.1 NUKLEINSÄUREANALYTIK

2.2.1.1 DNA-EXTRAKTION

Genomische DNA aus Arabidopsis-Blattmaterial wurde nach der Methode „*Quick DNA Prep for PCR*“ (Weigel und Glazebrook 2002) isoliert. Für Sequenzierungszwecke wurde genomische DNA aus Arabidopsis-Blättern mit Hilfe des *DNeasy® Plant Mini Kits* (QIAGEN, Hilden) isoliert. Dieser DNA-Extraktions-Kit wurde außerdem zur Isolierung von genomischer DNA aus *P. infestans*-infizierten Kartoffel-Blattproben verwendet. Für Southern-Blot-Analyse bestimmte DNA aus Kartoffelblättern wurde auf folgende Weise isoliert: ~200 mg in flüssigen Stickstoff gemörstertes Blattmaterial wurde mit 1 ml DNA-Extraktionspuffer (s. Tabelle 2-4) versetzt und für 10 min. bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 5M Kaliumacetat erfolgte eine 10 min. Inkubation auf Eis und ein Zentrifugationsschritt (10 min., 15000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde mit 800 µl einer

Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) -Lösung versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation (5 min, 12000 rpm, 4°C) wurden der wässrigen Phase 600 µl Isopropanol zugefügt. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach 10 min. Inkubation bei Raumtemperatur durch Zentrifugation (10 min., 15000 rpm, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und in 20 µl bidest. H₂O aufgenommen.

2.2.1.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION (*POLYMERASE CHAIN REACTION*, PCR)

Die Amplifizierung von Genfragmenten aus genomischer DNA erfolgte standardmäßig mit der *DreamTaq*TM DNA-Polymerase (Fermentas). Für die Amplifikation der vollständigen cDNA von *AtPSAT1/ERP1* wurde das *Expand High Fidelity* PCR System (Roche Applied Science) verwendet. Das *StPSAT1*-RNAi-Fragment wurde mit einer *Pfu*-Polymerase (Fermentas) amplifiziert. Die Durchführung erfolgte nach einem Standard-Protokoll (s. 2.2.1.2) bzw. gemäß der Herstellerangaben für die jeweilige DNA-Polymerase.

Tabelle 2-5. Zusammensetzung und Thermocycler-Programm einer Standard-PCR

Zusammensetzung des Standard-PCR-Ansatzes		Standard-Thermocycler-Programm		
PCR-Komponenten	Endkonzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
Template-DNA	1/10 des Gesamtvolumens	1	94	1'
10x PCR-Puffer	1x	2	94	30''
10 mM dNTPs	200 µM	3	50-60	30''
100 µM 5'-Primer	10 µM	4	72	30''
100 µM 3'-Primer	10 µM	5	72	7'
5 u/µl DNA-Polymerase	1 unit	6	4	∞

Schritt 2-4
40x
wiederholen

2.2.1.3 EXTRAKTION VON PLASMID-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte entweder aus 2 ml (Mini-Präparation) oder aus 50 ml (Midi-Präparation) einer Übernachtskultur. Die Mini-Präparation wurde mit dem *NucleoSpin® Plasmid* Kit (Macherey-Nagel) und die Midi-Präparation mit dem *Plasmid Midi* Kit (QIAGEN) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus *A. tumefaciens* (2 ml Übernachtskultur) wurde das *Plasmid Mini* Kit (QIAGEN) verwendet, wobei das Hersteller-Protokoll leicht abgewandelt wurde: Die Inkubationszeit nach Zugabe von Puffer P2 wurde auf 10 min. und der Zentrifugationsschritt nach Puffer P3 auf 20 min. verlängert. Die Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit auf 72°C erwärmten Elutionspuffer.

2.2.1.4 KOLONIE-PCR ZUR IDENTIFIZIERUNG POSITIVER BAKTERIEN-KLONE

In PCR-Reaktionsgefäßen wurden 12 µl eines Standard-PCR-Ansatzes (Tabelle 2-5) vorgelegt. Nach Transformation und Antibiotika-Selektion wurden Einzelkolonien mit frisch autoklavierten gelben

Spitzen gepickt, auf Antibiotika-haltige LB-Agar-Platten ausgestrichen (*Masterplate*), anschließend in die vorbereiteten PCR-Reaktionsgefäße überführt und von der gelben Spitze abgezwirbelt. Die PCR-Bedingungen entsprachen dem Standard-Thermocycler-Programm (Tabelle 2-5).

2.2.1.5 RESTRIKTIONSVERDAU

Die Spaltung isolierter DNA erfolgte mit Restriktionsenzymen der Firmen Fermentas oder New England Biolabs. Standardmäßig wurde 1 Unit des Enzyms in einem 20 µl Ansatz eingesetzt. Der Restriktionsverdau erfolgte für mindestens 4 Stunden bei der für das entsprechende Enzym optimalen Temperatur, die vom Hersteller angegeben wird.

2.2.1.6 DNA-SEQUENZIERUNG UND SEQUENZANALYSE

Die automatische Sequenzierung von DNA wurde von Eurofins MWG Operon (*value read tube*) oder LGC Genomics (*Single sample DNA sequencing*) durchgeführt. Sequenziert wurden entweder aus genomischer DNA amplifizierte und aufgereinigte PCR-Fragmente oder die Plasmid-DNA selektierter Klone. Die Klonierung der zu sequenzierenden DNA-Fragmente erfolgte in den Vektor pCR2.1 (s. Tabelle 2-2). Die Vorbereitung der DNA für die Sequenzierung erfolgte entsprechend den Vorgaben der Firmen. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.2.1.7 RNA-EXTRAKTION

Die Gesamt-RNA für Northern-Blot-Analysen wurde mit der Trizol-Methode isoliert (Chomczynski und Sacchi 1987). RNA, die zur Synthese von cDNA verwendet werden sollte, wurde mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) isoliert. Unter Verwendung des Kits konnte zwar saubere RNA isoliert werden, jedoch nur in geringen Konzentrationen, v.a. bei Arabidopsis-Blattmaterial. Um die RNA-Ausbeute zu steigern, wurde Gesamt-RNA aus Arabidopsis zunächst mit der Trizol-Methode isoliert und anschließend über die im *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gelieferten Säulchen aufgereinigt. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine kurzfristige Lagerung von RNA erfolgte bei -20°C, längerfristig sollten RNA-Proben bei -80°C aufbewahrt werden. Die RNA ist bei der anschließenden Verwendung immer eisgekühlt aufzubewahren.

2.2.1.8 GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte durch Gelelektrophorese mit 1-3%-igen (w/v) Agarosegelen (SeaKem® LE Agarose, Biozym) in 1x TAE-Elektrophorese-Puffer (J. Sambrook et al. 1989; s. (s. Tabelle 2-4). Als Größenmarker diente mit *PstI* gesplattene λ-Phagen DNA. Die Proben wurden vor Beladen des Gels mit DNA-Probenpuffer (s. Tabelle 2-4) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 80 bis 90 V. Nach der Elektrophorese erfolgte die Färbung der Gele

mit Ethidiumbromid (80 µl 1% Ethidiumbromid auf 500 ml dest. H₂O) und die fotografische Auswertung mit Hilfe einer Dokumentationsanlage (Gene Genius Bio Imaging System, SYNGENE).

Die elektrophoretische Auftrennung von Gesamt-RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in 1%-igen Agarose-Gelen mit 5% Formaldehyd. Als Gel- und Laufpuffer diente 1 x MEN-Puffer. Vor Beladen des Gels wurden die RNA-Proben mit 4 µl RNA-Probenpuffer (s. Tabelle 2-4) und 0,3 µl Ethidiumbromid (100 µg ml⁻¹) versetzt und bei 65°C für 10 min. denaturiert. Aufgrund der erhöhten Instabilität von RNA sowie der Gefahr der Degradation durch RNasen sollte die RNA anschließend sofort wieder auf Eis gekühlt werden.

2.2.1.9 ELUTION VON NUKLEINSÄUREFRAGMENTEN AUS AGAROSE-GELEN

Die Extraktion von DNA-Fragmenten bestimmter Größe aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN, Hilden). Die DNA-Banden wurden unter UV-Licht mit einem Skalpel ausgeschnitten und aus dem Agarosegelblock entsprechend der Herstellerangaben isoliert.

2.2.1.10 HERSTELLUNG RADIOAKTIV-MARKIERTER SONDEN

DNA-Fragmente, welche als Sonde zur Detektion spezifischer DNA-bzw. RNA-Moleküle dienen sollten, wurden mit Hilfe des *Megaprime™ DNA labelling Kits* von GE Healthcare entsprechend der Anleitung mit α-³²P-dATP markiert. Die Sonden wurden über eine Mikrocephadexsäule (ProbeQuant™ G-50 Micro-Columns, GE Healthcare) gereinigt und vor der Zugabe zur Hybridisierungslösung 5 min. bei 95°C denaturiert.

2.2.1.11 SOUTHERN-BLOTTING

Southern-Blot-Analysen mit DNA aus Kartoffelblättern erfolgten in Anlehnung an Schmidt et al. (1999). 20 µl der isolierten DNA (s. 2.2.1.1) wurden mit *Bam*HI verdaut und gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.1.8). Anschließend wurde das Gel 45 min. in 250 ml Denaturierungspuffer (s. Tabelle 2-4) inkubiert, zweimal mit dest. H₂O gewaschen und 45 min. in Neutralisierungspuffer (s. Tabelle 2-4) geschwenkt. Der Transfer der fragmentierten DNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran (ROCHE) erfolgte über Nacht durch Kapillarkraft (J. Sambrook et al. 1989). Die Quervernetzung der DNA mit der Membran erfolgte im UV-Licht. Anschließend wurde die Membran 1 h bei 42°C mit 20 ml Hybridisierungspuffer (s. Tabelle 2-4) inkubiert. Nach Zugabe der radioaktiv-markierten DNA-Sonde (s. 2.2.1.10) erfolgte die Hybridisierung für 16-20 h bei 42°C. Anschließend wurde die Membran dreimal bei 65°C mit 3x SSC (s. Tabelle 2-4), 0,1% SDS gewaschen. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte auf *Storage Phosphor* Filmen (Molecular Dynamics) mit Hilfe des *Typhoon 9410 Variable Mode Imagers* (GE Healthcare Bio-Sciences). Als Sonde für die Analyse der *StPSAT/ERP1*-RNAi-Linien wurde das *Bam*HI-Fragment des pHELLSGATE8-Vektors (s. Tabelle 2-2) verwendet, mit dem ein ca. 1,7 kb großes Fragment detektiert wurde. Die *AtPSAT1/ERP1*- bzw.

erp1-3-exprimierenden transgenen Kartoffel-Pflanzen wurden mit dem *Bam*HI-Fragment des pGWB14-Vektors (s. Tabelle 2-2) als Sonde überprüft.

2.2.1.12 NORTHERN-BLOTTING

Die Northern-Blot-Analysen erfolgten in Anlehnung an Geerts et al. (1994) und Lehrach et al. (1977). Für Northern-Blot-Analysen wurde Gesamt-RNA (Extraktion s. 2.2.1.7) aus Arabidopsis- (10 µg RNA) bzw. Kartoffelblättern (20 µg RNA) gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.2.1.8) und mittels Kapillarkraft über Nacht auf eine Nylonmembran (ROCHE) geblottet. Die Hybridisierung der Membran mit einer radioaktiven Sonde (s. 2.2.1.10) und die Detektion des radioaktiven Signals erfolgte wie in 2.2.1.11 beschrieben. Die Expression von *AtPSATI/ERP1* wurde mit einer *PSATI/ERP1*-cDNA-Sonde untersucht. Die Amplifikation der *PSATI/ERP1*-cDNA erfolgte mit den Primern PSAT-FCD-F (ohne CACC) und PSAT-FCD-R-Neu (s. Anhang 8.1). Das 1,7 kb große Fragment wurde aus einem 1 %-igen Agarosegel extrahiert (s. 2.2.1.9) und radioaktiv markiert (s. 2.2.1.10).

2.2.1.13 cDNA-SYNTHESE UND QUANTITATIVE REVERSE TRANSKRIPTASE (QRT)-PCR

Die Synthese von cDNA aus 2 µg RNA (Extraktion s. 2.2.1.7) erfolgte mit dem *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis* Kit (Fermentas) unter Verwendung der oligo-dT-Primer entsprechend der Herstellerangaben. Zuvor wurde die RNA mit RNase-freier DNaseI (*RNase-free DNase Set*, QIAGEN) behandelt. Für den Einsatz in qRT-PCR-Analysen wurde die cDNA 1:5 bis 1:10 mit tridest. H₂O verdünnt. Der PCR-Reaktionsmix wurde unter Verwendung des *Maxima™ Probe qPCR Master Mix* (Fermentas), 5 µl der verdünnten cDNA und genspezifischen Primern angesetzt. Als Referenzfarbstoff wurde ROX verwendet (im Mastermix enthalten). Die PCR-Reaktion und die Messung der Transkriptmengenakkumulation erfolgten mit dem *Mx3005P QPCR System* (Stratagene) und der entsprechenden Hersteller-Software. Die relative Transkriptmenge der Zielgene wurde in Bezug auf die Haushaltsgene *AtPP2A* (Arabidopsis, At1g13320; Czechowski et al. 2005) bzw. *StEF1α* (Kartoffel, AB061263) unter Berechnung des ΔCT -Werts ($2^{-\Delta\text{CT}}$) ermittelt (Schmittgen und Livak 2008).

2.2.1.14 MICROARRAY-ANALYSEN

Arabidopsis ATH1 *GeneChips*® von Affymetrix wurden mit Gesamt-RNA aus Blättern *P. infestans*-infizierter und Wasser-behandelter *gl1-*, *pen2-*, *pen2erp1-3-* und *erp1-3*-Pflanzen durch die Firma AROS Applied Biotechnology (Aarhus, Dänemark) hybridisiert. Die Ernte der Blattproben erfolgte 6 und 12 h nach der entsprechenden Behandlung. *P. infestans*-Behandlung, Ernte und Probenaufarbeitung wurden von M. Häußler und L. Westphal (beide IPB, Halle) durchgeführt. Die Affymetrix-Daten wurden mit Hilfe der öffentlich verfügbaren Software ROBIN statistisch

ausgewertet (Lohse et al. 2010). Dafür wurden die Daten einer *Robust Multichip Average* (RMA)-Normalisierung (Irizarry et al. 2003) unterzogen und die Werte der drei Replikate zu einem Mittelwert zusammengefasst. Anschließend wurden die Expressionsdaten der einzelnen Chips auf Basis des R-Pakets *Bioconductor* miteinander verglichen, um differentiell exprimierte Gene zu ermitteln. Eine mindestens zweifach differentielle Expression ($\log_2 = 1$) bei einer Wahrscheinlichkeit von 95% (p-Wert $\leq 0,05$) wurde als signifikant bewertet.

2.2.2 ARABIDOPSIS-KREUZUNGEN

Für Kreuzungen vorgesehene Arabidopsis-Pflanzen wurden unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus angezogen. Alle Seitentriebe des Blütenstandes und nicht zur Kreuzung verwendete Blüten und Knospen der Mutterpflanze wurden entfernt, ebenso wie schon gebildete Schoten, um das Einbringen von, durch Selbstbefruchtung hervorgegangenen, Samen zu vermeiden. Zur Kreuzung wurden Einzelblüten der Mutterpflanze ausgewählt, deren Knospen kurz vor der Blütenöffnung standen und deren Staubblätter nicht mehr grün, aber auch noch nicht ausgereift waren, um eine Selbstbestäubung zu verhindern. Die Blüten- und Staubblätter wurden unter dem Stereomikroskop mit Hilfe einer feinen Pinzette entfernt, um die zu bestäubende Narbe freizulegen. Zur Bestäubung wurde eine geöffnete Blüte mit ausgereiften Staubblättern der Vaterpflanze ausgewählt. Eine Woche nach der Bestäubung wurden die sich entwickelnden Schoten zur Samengewinnung eingetütet und nachträglich entwickelte Seitentriebe abgeschnitten. Das F1-Saatgut wurde ausgelegt und die resultierende F2-Generation wurde mit Hilfe von molekularen Markern auf den Erfolg der Kreuzung hin überprüft (s. 2.2.3).

2.2.3 GENOTYPISIERUNG MIT MOLEKULAREN MARKERN

Die in dieser Arbeit verwendeten mutanten Allele basieren auf Punktmutationen. Diese können mit Hilfe von *cleaved amplified polymorphic sequence* (CAPS)-Markern nachgewiesen werden. CAPS-Marker basieren auf Einzelnukleotid-Unterschieden (*single nucleotide polymorphism*, SNP), die zu Veränderungen in der Anordnung von Restriktionsstellen führen. Für ihre Analyse wird der betreffende Chromosomenabschnitt amplifiziert, mit dem entsprechenden Enzym gespalten und anschließend werden die resultierenden Restriktionsfragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (Lukowitz et al. 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten CAPS-Marker wurden entweder in früheren Arbeiten beschrieben oder unter Verwendung verschiedener Internetressourcen (s. 2.1.7) selbst entwickelt. Der CAPS-Marker für den Nachweis der Mutation im *PEN2*-Gen wurde durch V. Lipka (Georg-August-Universität, Göttingen) abgeleitet (Lipka et al. 2005). Die Schnittstelle des Restriktionsenzym *BspPI* bzw. *AlwI* ist nur im *PEN2*-Wildtyp-Allel enthalten. Die durch Nishimura et al. (2003) beschriebene Mutation in *pmr4-1* führt zum Verlust einer *EaeI*-Schnittstelle im Gen *PMR4/GSL05* (*AT4G03550*). Die SNPs in *erp1-3* und *erp1-4* führen zum Verlust einer *BseNI* bzw. *BstXI*-Schnittstelle, die im *AtPSAT1/ERP1*-Wildtyp-Allele enthalten ist. Die Sequenzen der Allel-

spezifischen CAPS-Marker-Primer sowie die entsprechenden Restriktionsenzyme und die resultierenden Restriktionsfragmente sind im Anhang aufgelistet (s. Anhang 8.1).

2.2.4 ARABIDOPSIS-GENOM-SEQUENZIERUNG

Das *erp1*-Genom wurde in Kooperation mit D. Weigel (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) mit Hilfe der Illumina (Solexa) Technologie (Weigel et al. 2008) sequenziert. Die zu sequenzierende genomische DNA wurde mit dem *DNeasy® Plant Mini Kit* (QIAGEN, Hilden) aus Blütenmaterial isoliert (durchgeführt von L. Westphal und M. Häußler, beide IPB, Halle). Die Sequenz-Daten wurden durch R. Clark (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) prozessiert und analysiert.

2.2.5 TRANSFORMATIONEN

2.2.5.1 *ESCHERICHIA COLI*

Die Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue et al. (1990).

2.2.5.2 *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Chemisch kompetente Agrobakterium-Zellen wurden nach dem Protokoll von Höfgen und Willmitzer (1988) hergestellt. Die Transformation von Agrobakterium erfolgte entsprechend der *freeze and thaw*-Methode (Weigel und Glazebrook 2006).

2.2.5.3 *ARABIDOPSIS THALIANA*

Zur Transformation von Arabidopsis-Pflanzen wurde die *floral dip*-Methode angewendet (Logemann et al. 2006). Alle weit geöffneten Blüten und Schoten wurden mit einer feinen Schere von der zu transformierenden Pflanze entfernt, um das Einbringen von nicht-transformiertem Saatgut zu vermeiden. Unmittelbar nach der Transformation wurden die Pflanzen für 24 h bei 100% Luftfeuchtigkeit abgedeckt im Gewächshaus inkubiert. Danach wurde der Deckel entfernt und nach 1 Woche wurden die transformierten Blütenstände zur Samengewinnung eingetütet. Das Saatgut wurde entsprechend der Antibiotika- oder Herbizid-Resistenz der transformierten Konstrukte selektiert.

Die Kanamycin-Selektion erfolgte mit sterilisiertem Saatgut auf ½ MS-Agar-Platten (Tabelle 2-3) mit 50 µg ml⁻¹ Kanamycin. Die Oberflächensterilisation der Samen erfolgte durch 45 min. Inkubation in Chlorgas in einem Exsikkator. Um das Chlorgas zu erzeugen, wurden im Exsikkator 5 ml rauchende Salzsäure auf 10 ml Natriumhypochlorid gegeben. Nach der Inkubationszeit wurde das Chlorgas mittels Vakuumpumpe für ca. 1,5 h abgepumpt und danach der Exsikkator unter sterilen Bedingungen geöffnet. Die Eppendorfgefäße mit den Samen wurden anschließend noch mindestens eine Stunde geöffnet unter der Sterilbox aufbewahrt, um ein vollständiges Abdampfen des Gases zu ermöglichen.

2 Wochen nach Wachstum auf Kanamycin-haltigem Nährmedium wurden grüne Keimlinge auf Erde transferiert.

Die Selektion mit dem Herbizid BASTA® (Glufosinat-ammonium, BAYER), erfolgte mit auf Erde angezogenen 1 Woche alten Keimlingen. Das Herbizid wurde in einer Konzentration von 300 µM BASTA im Abstand von zwei Tagen besprüht, bis die BASTA-sensitiven untransformierten Keimlingen gelb wurden und abstarben. Resistente Keimlinge wurden vereinzelt.

2.2.5.4 ARABIDOPSIS-PROTOPLASTEN

Die Präparation und Transformation von Mesophyll-Protoplasten erfolgte entsprechend dem Protokoll von Yoo et al. (2007). Zur Transformation wurden 10 µg Plasmid-DNA (isoliert mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit) pro 100 µl Protoplasten-Suspension eingesetzt.

2.2.5.5 *NICOTIANA BENTHAMIANA*

Für transiente Expressions-Analysen in Tabak wurde eine Suspension transformierter Agrobakterien mit einer nadellosen Spritze in die Blätter infiltriert. Die Durchführung richtete sich dabei nach den Angaben in Marois et al. (2002) und Van den Ackerveken et al. (1996).

2.2.5.6 *SOLANUM TUBEROSUM*

Die Transformation von Kartoffelpflanzen durch Agrobakterien erfolgte in Anlehnung an Feltkamp et al. (1995). Die Anzucht der Agrobakterien erfolgte über Nacht in 20 ml LB-Flüssigmedium (s. Tabelle 2-3) bei 28 °C. Am folgenden Tag wurde die Agrobakterien-Kultur in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und das Medium abzentrifugiert (10 min., 10000 rpm, 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 20 ml 10 mM MgCl₂ resuspendiert und anschließend erneut pelletiert (10 min., 10000rpm, 4°C). Um das gewaschene Pellet in 10 ml 3MS-Medium (Tabelle 2-3) zu lösen, wurde das Reaktionsgefäß bei 4°C leicht geschwenkt. Die fertige Bakteriensuspension wurde bis zur Verwendung auf Eis gestellt. In Petrischalen wurden zu 10 ml 3 MS-Medium 100 µl der Agrobakterien-Suspension zugefügt. In die verdünnte Bakterienlösung wurden mit einem Skalpell eingeritzte Blätter der zu transformierenden Kartoffelpflanze mit der Unterseite nach oben gelegt und für 2 Tage im Dunkeln bei 22°C inkubiert. Anschließend wurden die Blätter auf GC76-Agar-Medium (Tabelle 2-3) überführt, um das Kalluswachstum zu induzieren, und in der Phytokammer inkubiert. Nach 7 Tagen wurden die Blätter zur Induktion des Sprosswachstums auf GC75-Agar-Medium (Tabelle 2-3) transferiert. Bis zum Austreiben erster Sprosse wurden die Blätter alle 2 Wochen auf frisches GC75-Medium umgesetzt. Einzelne Sprosse wurden unter sterilen Bedingungen abgeschnitten und auf 3MS-Medium mit den entsprechenden Antibiotika kultiviert.

2.2.6 PROTEINANALYTIK

2.2.6.1 PROTEINEXPRESSION IN *E. COLI*

Für die heterologe Expression von AtPSAT1/ERP1 bzw. *erp1-3* in *E. coli* wurden die entsprechenden cDNAs in den Expressionsvektor pDEST17 (s. Tabelle 2-2) unter Verwendung der Primer PSAT-FCD-F (ohne CACC) und PSAT-FCD-R-Neu (s. Anhang 8.1) kloniert und in kompetente BL21-Zellen transformiert. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert (bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8). Die Bakterien wurden bei 18°C für 24-36 h im Schüttelinkubator kultiviert und anschließend durch Zentrifugation (10000 rpm, 5 min., 4°C) pelletiert. Die Bakterienpellets wurden in 150 µl 2xSDS-Probenpuffer resuspendiert, bei 95°C für 5 min. inkubiert und anschließend kurz zentrifugiert. 10 µl des Protein-Rohextrakts wurden auf 10%-igen SDS-Gelen aufgetrennt und analysiert (s. 2.2.6.3 und 2.2.6.5).

Um zwischen löslicher und unlöslicher Proteinfraction zu unterscheiden, wurden die Bakterienzellen in Lysispuffer (s. Tabelle 2-4) resuspendiert. Um die Zellen aufzuschließen, wurden sie dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei 42°C aufgetaut sowie zweimal mit Ultraschall behandelt. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation (2 min., 12000 rpm, 4°C) pelletiert. 10 µl des Überstands wurden mit 10 µl 2xSDS-Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 250 µl 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Jeweils 10 µl der Proben wurden nach 5 min. Inkubation bei 95°C auf 10%-igen SDS-Gelen aufgetrennt und analysiert (s. 2.2.6.3 und 2.2.6.5).

2.2.6.2 PROTEINEXTRAKTION AUS PFLANZENMATERIAL

Die Proteinextraktion erfolgte mit dem in Chinchilla et al. (2007) beschriebenen Protein-Extraktionspuffer (s. Tabelle 2-4) aus ca. 100 mg in flüssigem N₂ gemörsertem Blattmaterial. Die Protein-Menge wurde mit Hilfe der Bradford-Analyse (BIORAD) quantifiziert (Bradford, 1976).

Um die Überexpression von ERP1-GFP in transgenen Arabidopsis- und Tabak-Linien zu überprüfen genügten Blatt-Rohextrakte. Dazu wurden pro Pflanze drei Blattscheiben mit einem Korkbohrer ausgestanzt (Ø 9 mm), in flüssigem N₂ gemörsert, mit 150 µl 2xSDS-Probenpuffer versetzt, im Precellys (PEQLAB) homogenisiert und kurz abzentrifugiert.

Alle Proben wurden vor der Auftrennung in SDS-Gelen (s. 2.2.6.3) 5 min. bei 95°C inkubiert.

2.2.6.3 SDS-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts erfolgte nach Standardmethoden (Joseph Sambrook und Russell 2006).

2.2.6.4 COOMASSIE-FÄRBUNG

Zum Färben der Proteine in SDS-Gelen wurde das Gel für 1 h in Coomassie-Lösung (s. Tabelle 2-4) geschwenkt und anschließend in Entfärber-Lösung (s. Tabelle 2-4) entfärbt, bis keine blaue Hintergrundfärbung auf dem Gel mehr zu erkennen war. Anschließend wurde das Gel fotografiert.

2.2.6.5 WESTERN-BLOT-ANALYSE

Der Transfer der Proteine aus SDS-Gelen auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran 0,45 µm) erfolgte in Transferpuffer (s. Tabelle 2-4) mit Hilfe einer *semi dry*-Transferapparatur. Nach dem Transfer wurde die Membran in TBS-Puffer gewaschen und anschließend in einem 50 ml Reaktionsgefäß 1 h bei Raumtemperatur in 5 ml 5 % Milchpulver in TBS-Puffer (5 ml) blockiert. Die Membran wurde kurz mit TBS-Puffer gewaschen und der primäre Antikörper (in 5 ml 3 % Milchpulver in TBS-Puffer) wurde zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Konzentration des anti-GFP-Antikörpers (Invitrogen) richtete sich nach den Herstellerangaben. Anti-PSAT2 (s. Anhang 8.4) wurde 1:1000 verdünnt eingesetzt. Aufbewahrt wurden die Antikörper in 50% Glycerin bei -20°C. Nach dreimaligem Waschen (10 min.) mit TBS-Puffer wurde der sekundäre Antikörper (in 5 ml 3 % Milchpulver in TBS-Puffer) zur Membran gegeben und für 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Konzentration der sekundären Antikörper richtete sich nach Herstellerhinweisen. Anschließend folgten 3 Wasch-Schritte mit TBS-Puffer (je 10 min.) und 5 min. Inkubation mit dem *enhanced chemiluminescence*-Reagenz von Amersham (*ECL plus Western Blotting Detection System*). Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte auf *CL-Xposure* Filmen von Pierce (Thermo Scientific).

2.2.7 PATHOGENINFEKTIONEN

2.2.7.1 *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

P. infestans wurde für Infektionsexperimente und zur Herstellung von Dauerkulturen auf Hafer-Bohne-Medium (s. Tabelle 2-3) in Petrischalen bei 18 °C im Dunkeln angezogen. Die Anfertigung von Dauerkulturen und Kulturplatten mit *P. infestans* übernahm freundlicherweise L. Westphal (IPB, Halle). Für die Anfertigung von Glycerinstocks wurden zwei Möglichkeiten genutzt: (1.) Elf Tage altes Mycel wurde mit 8 ml sterilem 50%-igem Glycerin (v/v) überschichtet und eine Zoosporensuspension gewonnen, oder (2.) ein mit Mycel bewachsenes Stück Medium wurde mit 50%-igem Glycerin (v/v) versetzt. In beiden Fällen erfolgte eine schrittweise Abkühlung (30 min. 4°C, 1h -20°C und -80°C über Nacht) und anschließende Lagerung in flüssigem Stickstoff. Von Dauerkulturen ausgehend wurden Kulturplatten angeimpft und für 10-14 Tage inkubiert, bis die Platte ausreichend von Mycel bedeckt war. Zoosporensuspensionen wurden durch Abschwemmen der Sporangien mit 5 ml tridest. H₂O gewonnen (Lipka et al. 2005). Nach dreistündiger Inkubation bei 4°C wurde die Konzentration [Anzahl Zoosporen ml⁻¹] der geschlüpften Zoosporen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt.

Arabidopsis-Pflanzen wurden mit 10 µl Tropfen der Zoosporensuspension mit Konzentrationen von 5×10^4 bis 5×10^5 Sporen ml^{-1} inokuliert. Dabei dienten hohe Sporenkonzentrationen der Differenzierung von Wildtyp- und Nekrose-Phänotyp, die niedrigen Konzentration der Unterscheidung von *pen2*- und *erp1*-Phänotyp. Nach der Tropfen-Inokulation wurden die Pflanzen für 3-4 Tage unter Langtagbedingungen in einer Phytokammer (16 h Licht, $140 \mu\text{Mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bei 20°C und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Beurteilung der HR-Stärke erfolgte im Vergleich mit den Kontrollpflanzen Col-0, *g11* und *pen2*.

Die Infektion von Kartoffelpflanzen mit 10 µl einer Zoosporensuspension (1×10^5 Sporen ml^{-1}) erfolgte wie in Halim et al. (2007) beschrieben. Die *P. infestans*-Biomasse in infizierten Kartoffel-Blättern wurde nach 3 Tagen durch qRT-PCR ermittelt (Eschen-Lippold et al. 2007).

2.2.7.2 *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Zellsuspensionen von *P. syringae* pv. *tomato* (*Pto* DC300 und *Pto* DC3000 *avrRPM1*, Inokulum-Konzentration 1×10^5 cfu ml^{-1}) und *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph* 1448A, Inokulum-Konzentration 1×10^8 cfu ml^{-1}) wurden in 3 Rosettenblätter pro Arabidopsis-Pflanze, mit Hilfe einer nadellosen Spritze infiltriert. Unmittelbar nach der Infiltration und erneut nach 4 Tagen wurden die Bakterientiter im Blatt bestimmt. Dafür wurden jeweils 3 Blattscheiben (\varnothing 9 mm) von 3 verschiedenen Pflanzen pro Genotyp vereint und in 200 µl 10 mM MgCl_2 gemörsert. Das bakterielle Wachstum wurde quantifiziert, indem Verdünnungsreihen der Blatt-Bakterien-Suspension auf LB-Platten aufgebracht und nach 2 Tagen (bei 28°C) die Anzahl der Kolonien (*colony forming unit*, cfu) bestimmt wurden (Katagiri et al. 2002).

2.2.7.3 *BLUMERIA GRAMINIS F. SP. HORDEI (BGH)*

Die Anzucht von *Bgh* (Isolat K1; s. Tabelle 2-1) auf Gerste (Kultivar Ingrid, Linie I-10) und die Infektionsexperimente (nach Zimmerli et al. (2004)) wurde im Rahmen einer Kollaboration mit V. Lipka und R. Fuchs (Georg-August-Universität) in Göttingen durchgeführt. Um die Pathogeninfektion zu bewerten und zu quantifizieren wurden 2 Tage nach Behandlung Blattproben mikroskopisch unter UV-Licht analysiert (Lipka et al. 2005). Dabei wurden in 2 Experimenten jeweils 100 Interaktionsstellen betrachtet. 6 Tage nach Infektion wurden Blattproben einer kombinierten Trypanblau-Anilinblau-Färbung unterzogen, um die Reaktion im Mesophyll mikroskopisch zu untersuchen. Nach 9 Tagen wurde der makroskopische Infektionsphänotyp fotografisch festgehalten.

2.2.7.4 *COLLETOTRICHUM SP.*

Die Pathogenassays mit *Colletotrichum* wurden in Kollaboration mit V. Lipka und R. Fuchs (Georg-August-Universität, Göttingen) durchgeführt. Die Anzucht von *C. lagenarium* (Stamm 104-T, s. Tabelle 2-1) und *C. higginsianum* (Stamm IMI 349061, s. Tabelle 2-1) erfolgte auf PDA-Medium (Hiruma et al. 2010). Die Inokulation wurden nach O'Connell et al. (2004) durchgeführt. Nach der

Sprühinokulation wurden die Pflanzen unter Kurztagbedingungen in Phytoschränken (8 h Licht, $\approx 150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 65 % Luftfeuchtigkeit) bei 20°C inkubiert. Makroskopisch sichtbare Infektionsphänotypen wurden nach 9 Tagen fotografiert.

2.2.7.5 GOLOVINOMYCES SP.

Auch die Golovinomyces-Experimente wurden in Kollaboration mit V. Lipka von R. Fuchs (Georg-August-Universität, Göttingen) durchgeführt. Die Anzucht von *G. cichoracearum* (Stamm ICSC1, s. Tabelle 2-1) und *G. cruciferarum* (Stamm UEA1, s. Tabelle 2-1) sowie die Infektion von Arabidopsis erfolgten nach Adam et al. (1999). Die quantitative Analyse der Infektionsphänotypen erfolgte 48 h nach der Infektion. Dabei wurden jeweils 100 Interaktionsstellen mikroskopisch im UV-Licht auf Penetrationserfolg und Zelltod hin untersucht.

2.2.8 BEHANDLUNG MIT FLG22

Die Behandlung von Arabidopsis-Keimlingen erfolgte mit 10 μM flg22. Eine 1mM Stocklösung wurde durch Lösen von flg22 (2272.5 g/mol) in Wasser hergestellt. Die Lösung wurde anschließend steril filtriert.

Für die Wurzellängen-Assays wurden die Keimlinge 5 Tage auf ATS-Agar-Medium (Tabelle 2-3) vorkultiviert und anschließend auf flg22-haltige ATS-Platten transferiert. Nach weiteren 9 Tagen wurde die Wurzellänge gemessen. Als Kontrolle dienten Keimlinge, die auf ATS-Platten ohne flg22 transferiert wurden. Um die Wurzelwachstumshemmung durch flg22-Behandlung zu ermitteln, wurde die Wurzellänge der flg22-behandelten Keimlinge prozentual auf die Wurzellänge der unbehandelten Keimlinge bezogen.

Um die Expression flg22-induzierter Gene zu analysieren, wurden Arabidopsis-Keimlinge in 16-well-Platten (10 Keimlinge pro well) in 2 ml MS-Flüssigmedium (Tabelle 2-3) angezogen. Nach 13 Tagen wurde das Flüssigmedium entfernt und die Wells wurden mit 1,5 ml frischem MS-Medium aufgefüllt. Am darauffolgenden Tag wurden 500 μl einer 40 μM flg22-Lösung (in MS) in jedes Well zugefügt, um eine Endkonzentration von 10 μM zu erreichen. Als Kontrolle diente die Zugabe von 500 μl MS-Medium. 4 Stunden nach Behandlung wurden 30 Keimlinge pro Genotyp geerntet und für die Expressions-Analyse weiter aufbereitet (s. 2.2.1.13).

2.2.9 FÄRBETECHNIKEN

2.2.9.1 TRYPANBLAU

Die Trypanblau-Färbung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Koch und Slusarenko (1990). Drei Tage nach Inokulation wurden die Blätter für mindestens 1 min. in einer Trypanblau-Lösung (s. Tabelle 2-4) gekocht, anschließend unter mehrfachem Wechseln der Lösung in Chloralhydrat (2,5 g ml^{-1}) entfärbt und in 50% (v/v) Glycerin aufgenommen.

2.2.9.2 ANILINBLAU

Für die Färbung von Callose wurde die Anilinblau-Färbung angewandt (Adam und Somerville 1996). Dazu wurden Pathogen-behandelte Blattproben in 96% Ethanol bis zur vollständigen Entfärbung gekocht und anschließend einmal mit 50% Ethanol sowie zweimal mit Wasser gewaschen. Die entfärbten Blätter wurden für 1-2 h im Dunkeln in Anilinblau-Lösung (s. Tabelle 2-4) inkubiert. Die Lagerung der Blattproben erfolgte im Dunkeln in 50% (v/v) Glycerin.

2.2.9.3 KOMBINIERTER TRYPANBLAU-ANILINBLAU-FÄRBUNG

Um Zelltodreaktionen im Hellfeld und im gleichen Präparat Callose-Depositionen im UV-Licht zu analysieren, wurden die Trypanblau- und Anilinblau-Färbungen kombiniert. Zuerst wurde die Trypanblau-Färbung wie unter 2.2.9.1 beschrieben durchgeführt. Nach der Entfärbung in Chloralhydrat wurden die Blätter vorsichtig in 70% Ethanol gewaschen und anschließend in Anilinblau wie in 2.2.9.2 beschrieben inkubiert. Die Blättchen wurden unmittelbar nach der Anilinblau-Färbung in 50% (v/v) Glycerin aufgenommen und auf Objektträger aufgezogen. Dies muss sehr vorsichtig erfolgen, da eine kombinierte Färbung das Blattgewebe aufweicht.

2.2.9.4 NILROT

Nilrot-Färbung wurde in Anlehnung an De Domenico et al. (2007) durchgeführt, um Neutrallipide im Blattgewebe von *Arabidopsis* sichtbar zu machen. Nilrot (Sigma-Aldrich) wurde in 100% DMSO gelöst (Stocklösung 1 mg ml^{-1}) und die Färbung von Blattscheiben ($\varnothing 7 \text{ mm}$) erfolgte mit $2,5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$. Nach 20 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Blattscheiben mit Wasser gespült und in Wasser auf Objektträgern mit Deckglas mittels konfokaler Laserscan-Mikroskopie unmittelbar analysiert.

2.2.10 MIKROSKOPISCHE ANALYSEN

2.2.10.1 LICHT-UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE

In 50% (v/v) Glycerin aufbewahrte Trypanblau-gefärbte Blätter, wurden auf Objektträger aufgezogen und lichtmikroskopisch mit einem *Axioplan 2 imaging*-Mikroskop (Zeiss, Jena) unter Weißlicht analysiert. Fotografische Aufnahmen der Präparate erfolgten mit Hilfe einer *AxioCam MRc5*-Kamera und der *Axio Vision 4*-Software von Carl Zeiss.

Licht- und fluoreszenzmikroskopische Analysen Trypanblau-Anilinblau-gefärbter Präparate wurden mit dem Nikon AZ100 Stereomikroskop durchgeführt, ausgestattet mit einer 5 Megapixel CCD-Kamera (DS-Fi1c). Die Anilinblaufluoreszenz wurde mit dem Standard-Filterblock UV-2A (Anregung 330-380 nm, Kaltlicht 400 nm, Emission 420 nm) detektiert.

2.2.10.2 KONFOKALE LASERSCAN-MIKROSKOPIE

Die Detektion von intrazellulärer GFP-, mCherry- und Nilrot-Fluoreszenz erfolgte mit dem invertierten Konfokalmikroskop LSM 710 (Zeiss, Jena). GFP und Nilrot wurden mit dem Argonlaser (488 nm) angeregt. Die Anregung von mCherry erfolgte bei 561 nm. Die Emission von GFP wurde bei 490-530 nm detektiert, Nilrot bei 550-600 und mCherry bei 585-645nm. Zur Bildbearbeitung wurde die ZEN 2009-Software genutzt.

2.2.10.3 ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Blattproben wurden für die Elektronenmikroskopie in 3% Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich) in 0,1 M Natriumcacodylat-Puffer (NCP, Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat in Wasser, pH 7.2) für 3 h bei Raumtemperatur fixiert, anschließend mit NCP gewaschen und mit 1% Osmiumtetroxid (Carl Roth; www.carlroth.com) nachfixiert. Das Gewebe wurde schrittweise in Ethanol mit ansteigender Konzentration dehydriert und in Epoxyharz eingebettet (Spurr 1969). Ultradünnschnitte wurden mit einem Ultramicrotome S (Leica) angefertigt und auf mit Formvar-beschichtete Gitternetzchen (*grids*) übertragen. Für die Immunogold-Markierung wurden die Schnitte mit einem monoklonalen anti- β -1,3-glucan-Antikörper aus Maus (Biosupplies) inkubiert. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Maus 10 nm Goldkonjugat-Antikörper (Sigma-Aldrich). Anschließend wurden die Präparate mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt. Untersucht wurden die Proben mit einem EM 900 Transmissions-Elektronenmikroskop (Zeiss, Jena) bei einer Beschleunigungs-Spannung von 80 kV. Elektronenmikrogramme wurden mit einer Variospeed SSCCD-Kamera (SM-1k-120; TRS, Germany) aufgenommen.

2.2.11 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die statistische Beurteilung der experimentell erlangten Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Programms Prism5 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA).

3 ERGEBNISSE

In vorhergehenden Arbeiten waren das Nichtwirtpathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* etabliert und durch Remutagenese von *pen2* die *erp*-Mutanten erzeugt worden, welche nach Inokulation mit *P. infestans* einen stärkeren HR-Phänotypen als *pen2* aufweisen (s. 1.5; Landtag 2006). Die Identifizierung der betroffenen Gene soll Aufschluss über weitere Komponenten der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegenüber *P. infestans* geben.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung der *erp1*-Mutante und der Identifizierung des entsprechenden *ERP1*-Gens. In den ersten Abschnitten werden die morphologischen und *P. infestans*-induzierten Phänotypen der *erp1*-Mutante zusammengefasst. Basierend auf den Feinkartierungsdaten der Vorarbeiten (Kopischke 2007) wurde das *ERP1*-Gen nach der Resequenzierung des Genoms identifiziert. Der Großteil der vorliegenden Arbeit befasst sich mit der Funktion von *ERP1* und dessen Genproduktes, sowie dem Einfluss mutierter *ERP1*-Allele auf die Abwehrantwort von Arabidopsis gegenüber *P. infestans* und anderen Pathogenen. Außerdem wurde der Einfluss von *ERP1* und *ERP1*-homologen Genen in Kartoffel auf die Wirtsinteraktion mit *P. infestans* untersucht.

Im Folgenden wird die aus remutagenisiertem *pen2*-Saatgut hervorgegangene *erp1*-Mutante als *pen2erp1*-Doppelmutante bezeichnet, da dies den genetischen Hintergrund beschreibt und außerdem einer Verwechslung mit *erp1*-Einzelmutanten vorbeugt. Da neben *pen2-1* keine weitere *pen2*-Mutante verwendet wurde, wird das Allel in dieser Arbeit nicht weiter spezifiziert, die Mutante wird vereinfacht als *pen2*-Mutante bezeichnet.

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER *pen2erp1*-MUTANTE

3.1.1 MORPHOLOGISCHE MERKMALE

In vorherigen Arbeiten war festgestellt worden, dass einige *erp*-Mutanten Abweichungen in ihrer Morphologie aufweisen (Landtag 2006). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin die Entwicklung von *pen2erp1*-Keimlingen und adulten Pflanzen beobachtet und mit der Entwicklung von *gll* und *pen2* verglichen. Dabei beschränkten sich die Beobachtungen auf makroskopisch sichtbare Merkmale wie Wurzellänge, Blatt- und Rosettengröße, sowie die Ausbildung spontaner Chlorosen auf Blättern.

Im Vergleich zu *gll* und *pen2* zeigten steril auf ATS-Agar angezogene *pen2erp1*-Keimlinge nach 7 Tagen kürzere Primärwurzeln und weniger Seitenwurzeln (Abbildung 3-1 A). Zwar wies auch *gll* im Vergleich zu *pen2* ein leicht verringertes Wurzelwachstum auf, allerdings sind die Wurzeln von *gll*-Keimlingen mit ~4 cm deutlich länger als die Wurzeln von *pen2erp1*-Keimlingen mit ~3 cm durchschnittlicher Wurzellänge. Außer des verminderten Wurzelwachstums zeigten *pen2erp1*-Keimlinge keine morphologischen Besonderheiten. Bis zu 5 Wochen nach der Aussaat unterschieden

sich die oberirdischen Pflanzenorgane auf Erde angezogener *pen2erp1*-Pflanzen in Größe und Morphologie nicht von den Kontrollpflanzen (Abbildung 3-1 B und C). Die Chlorosen 6-7 Wochen alter *pen2erp1*-Pflanzen, die bereits in der Arbeit von J. Landtag (2006) beschrieben wurden, konnten bestätigt werden, jedoch waren sie erst 8-10 Wochen nach der Aussaat deutlich ausgeprägt (Abbildung 3-2). Die ältesten Blätter 8-10 Wochen alter *pen2erp1*-Pflanzen waren gelb gefärbt (Abbildung 3-2 A), was auf starken Chlorophyll-Abbau hinweist, und z.T. nekrotisch (Abbildung 3-2 B). Für *gl1* und *pen2* waren in diesem Entwicklungsstadium kaum vollständig chlorotische Blätter zu beobachten, die Gelbfärbung beschränkte sich hier auf die Blattränder (Abbildung 3-2).

Das verringerte Wurzelwachstum und die früher einsetzende Blattseneszenz könnte die Reaktion der *pen2erp1*-Mutante gegenüber biotischen und bzw. oder abiotischen Stressoren beeinflussen und ist deshalb bei der Interpretation der entsprechenden Experimente zu berücksichtigen (z.B. Wurzelwachstums-Analysen nach *flg22* oder die Reaktion gegenüber anderen Pathogenen, s. 3.7 und 3.8).

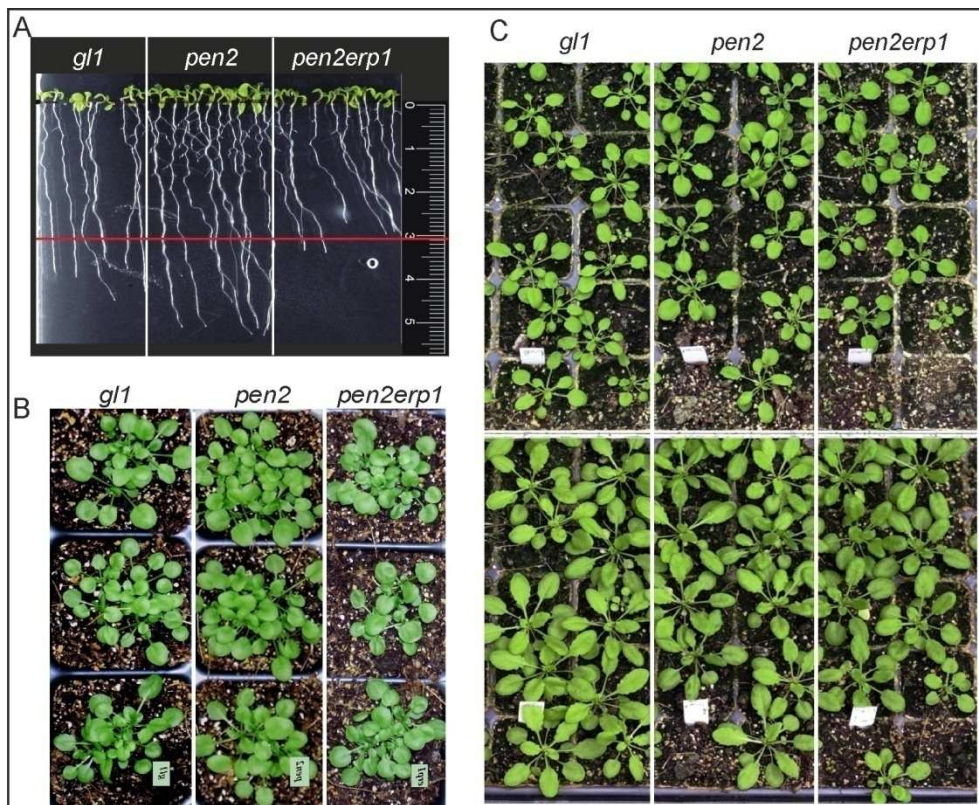


Abbildung 3-1. Morphologie der *pen2erp1*-Mutante auf ATS-Platten und Erde im Vergleich zu *gl1*- und *pen2*-Pflanzen

(A) Unterschiedliche Wurzelentwicklung 7 Tage alter Keimlinge nach steriler Anzucht auf ATS-Medium. Die rote Linie markiert die durchschnittliche Wurzellänge von *pen2erp1*-Keimlingen (3,1 cm). Die Platte wurde repräsentativ aus drei Replikaten mit jeweils 10 Keimlingen pro Genotyp ausgewählt. In (B) und (C) ist der morphologische Phänotyp 10 Tage (B), sowie 3 (C-oben) und 5 Wochen (C-unten) alter Pflanzen nach Anzucht auf Erde unter Kurztagbedingungen dargestellt. Die Bilder stehen exemplarisch für 3 Experimente.

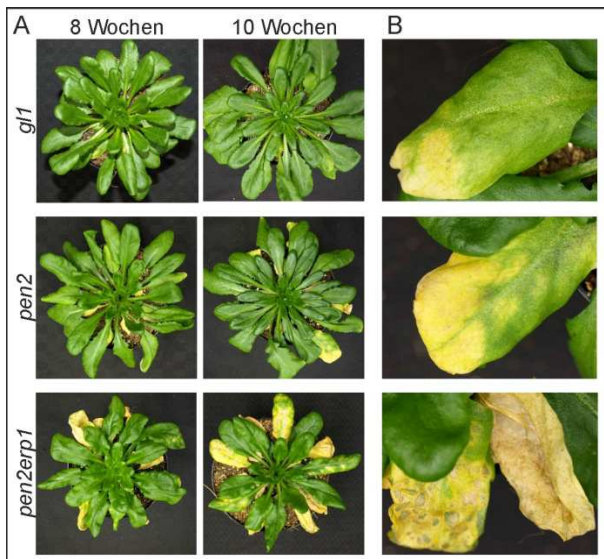


Abbildung 3-2. Frühere Blattseneszenz adulter *pen2erp1*-Pflanzen im Vergleich zu *gl1* und *pen2*
 (A) Rosetten von 8 und 10 Wochen alten Pflanzen nach Anzucht in Erde unter Kurztagbedingungen. Die Bilder sind exemplarisch für 3 Experimente mit jeweils 10 Pflanzen pro Genotyp.

(B) Großansicht repräsentativer chlorotischer Blätter von 10 Wochen alten *gl1* (oben)-, *pen2* (Mitte)- und *pen2erp1* (unten)-Pflanzen.

3.1.2 RESISTENZREAKTIONEN GEGEN *P. INFESTANS*

Pflanzliche Abwehrstrategien gegen Penetrationsversuche durch Pathogene umfassen präformierte und induzierbare Mechanismen. Die Deposition von Zellwandbestandteilen und Callose, sowie die Akkumulation antimikrobieller Substanzen und ROS an der Stelle des Penetrationsversuchs tragen zur Penetrationsresistenz der Pflanze bei (s.1.2). Überwindet das Pathogen die Penetrationsresistenz, greift eine zweite Ebene der Nichtwirtsresistenz, die im Rahmen einer hypersensitiven Reaktion (HR) zum Absterben der penetrierten Zellen führt (Thordal-Christensen 2003). Dieser programmierte Zelltod verhindert die Ausbreitung biotropher Pathogene, da ihnen die Lebensgrundlage entzogen wird.

pen2erp1 und alle weiteren *pen2erp*-Mutanten zeigen im Vergleich zu *pen2* einen verstärkten HR-Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion (s. 1.5; Landtag 2006). Makroskopisch wurde die verstärkte Zelltodreaktion von *pen2erp1* innerhalb von 3 Tagen nach Tropfen-Inokulation (5×10^4 Sporen ml^{-1}) in Form von Nekrosen im Bereich der Inokulationsstelle erkennbar (Abbildung 3-3 A). Die Zelltod-Antwort von *pen2* wurde ebenfalls spätestens 3 Tage nach Inokulation sichtbar, fiel aber deutlich schwächer aus. Auf den Blättern inokulierter *gl1*-Pflanzen wurden keine Abwehrreaktionen beobachtet. Der Defekt im Gen *GLABROUS1* (*GLI*) führt zum Verlust der Trichombildung auf Blättern und Stängel (Herman und Marks 1989, Marks und Feldmann 1989), beeinflusst jedoch nicht die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis.

Um die Reaktion von *pen2erp1* auf *P. infestans* differenzierter zu untersuchen, wurden inokulierte Blätter spezifischen Färbungen und mikroskopischen Analysen unterzogen (Abbildung 3-3).

Die *P. infestans*-induzierte Zelltodreaktion im Bereich der Inokulationsstelle wurde durch Trypanblaufärbung (s. 2.2.9.1) veranschaulicht. Auf Trypanblau-gefärbten *gl1*-Blättern war die Position des 10 μl Tropfens 3 Tage nach Inokulation nicht deutlich zu erkennen und mikroskopisch wurden nur ganz vereinzelt tote Epidermiszellen beobachtet. Im Gegensatz dazu waren die Inokulationsstellen bei *pen2* und *pen2erp1* intensiv blau gefärbt, wobei die *pen2*-Inokulationsstellen im Vergleich zu *pen2erp1* eine schwächere Färbung aufwiesen (Abbildung 3-3 A). Die

Zelltodreaktion von *pen2* und *pen2erp1* beschränkte sich nicht nur auf penetrierte Epidermiszellen, sondern setzte sich auch im Mesophyll fort. Dabei wurden bei *pen2erp1* häufig zusammenhängende Flächen toter Zellen im Bereich der Inokulationsstelle beobachtet, während bei *pen2* v.a. einzelne Zellen betroffen waren.

Ein weiteres spezifisches Merkmal der *pen2erp1*-Mutante sind rundliche Strukturen, die in intakten Mesophyllzellen innerhalb des Inokulationsbereiches auftraten (Abbildung 3-3 A). In *pen2* oder *gll* wurden solche Strukturen nicht beobachtet. Um Pathogen-induzierte Callose-Ablagerungen im pflanzlichen Gewebe nachzuweisen, wurde infiziertes Blattmaterial einer Anilinblaufärbung (s. 2.2.9.2) unterzogen. In *pen2erp1*-Blattpräparaten wiesen, neben epidermalen Papillen und Zellwandverstärkungen in Epidermis- und Mesophyllzellen, die auch in *pen2* beobachtet wurden, auch die ungewöhnlichen Strukturen im Mesophyll die typische Anilinblaufluoreszenz im UV-Licht auf (Abbildung 3-3 C). Blattquerschnitte und elektronenmikroskopische Analysen, die durch G. Hause (Biozentrum der Martin-Luther-Universität, Halle) durchgeführt wurden, zeigten, dass die Strukturen Zellwand-assoziiert und durch eine Zellmembran vom Zytosol der Zelle getrennt sind (Abbildung 3-3 B und Abbildung 3-4). Die Immunogoldmarkierung von β -1,3-Glucanen mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers diente dem elektronenmikroskopischen Nachweis von Callose im infizierten Blattgewebe. Wie schon die Anilinblaufärbung vermuten ließ, enthalten die nach *P. infestans*-Infektion gebildeten Strukturen im Mesophyll der *pen2erp1*-Mutante große Mengen an Callose (Abbildung 3-3 D). Die Zusammensetzung dieser Callose-haltigen Zellwandauflagerungen ist relativ heterogen mit mehreren Einschlüssen elektronendichter Zellbestandteile (Abbildung 3-4). Im Randbereich der Strukturen konnten außerdem Vesikel-ähnliche Strukturen beobachtet werden, die z.T. auch Callose enthielten (Abbildung 3-4 D). Häufig sind diese Zellwandauflagerungen von intaktem Zytoplasma mit einer hohen Anzahl an Chloroplasten und Mitochondrien umgeben (Abbildung 3-4), was auf einen hohen Energiebedarf für die Synthese dieser Strukturen hinweist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *pen2erp1* mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten makroskopisch sichtbaren HR auf *P. infestans* reagiert. Auf zellulärer Ebene geht die verstärkte HR mit starkem Mesophyll-Zelltod und deregulierten Callose-Depositionen im Mesophyll einher.

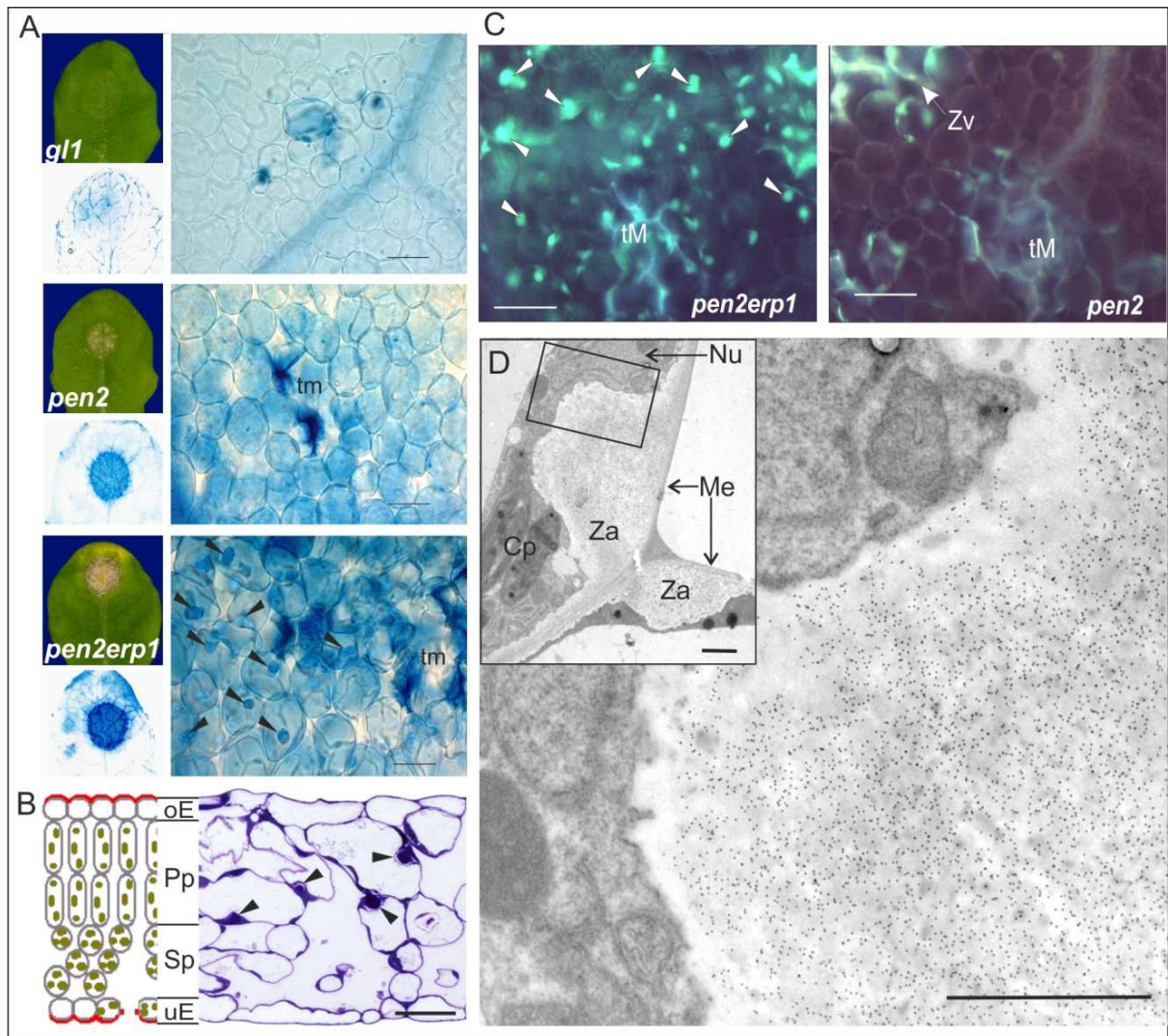


Abbildung 3-3. *P. infestans*-Inokulation induziert in *pen2erp1* eine verstärkte Zelltodreaktion und Callose-Ablagerungen im Mesophyll.

Die Analyse der zellulären Abwehrreaktionen erfolgte 3 Tage nach *P. infestans*-Behandlung (5×10^5 Sporen ml^{-1}). Die Bilder stehen exemplarisch für 3 (A und B) bzw. 2 (C und D) Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

(A) Makro- und mikroskopische Aufnahmen *P. infestans*-behandelter Blätter von *gl1*-, *pen2*- und *pen2erp1*-Pflanzen. Die inokulierten Blätter wurden fotografiert und anschließend mit Trypanblau gefärbt. Die mikroskopischen Bilder zeigen Hellfeld-Aufnahmen von Mesophyllzellen im Bereich der Inokulationsstelle. In *pen2erp1* auftretende runde Strukturen im Mesophyll sind durch Pfeile markiert. tm, tote Mesophyllzelle; Maßstab = 50 μm

(B) Schematischer Blattquerschnitt (links) und Toluidinblau-gefärbter Semidünnschnitt eines *P. infestans*-behandelten *pen2erp1*-Blatts im Bereich der Inokulationsstelle (rechts). Die Zellwand-assoziierten Strukturen im Mesophyll (Palisadenparenchym) sind durch Pfeile gekennzeichnet. oE, obere Epidermis; Pp, Palisadenparenchym; Sp, Schwammparenchym; uE, untere Epidermis

(C) Anilinblaufluoreszenz in Mesophyllzellen *P. infestans*-behandelter *pen2*- und *pen2erp1*-Blätter. Die runden Strukturen im Mesophyll von *pen2erp1* sind durch Pfeile gekennzeichnet. tM, tote Mesophyllzellen; ZV, Zellwandverstärkung; Maßstab = 100 μm

(D) Immunzytologische Analyse der *P. infestans*-induzierten Zellwandauflagerungen in *pen2erp1* unter Verwendung eines anti- β -1,3-Glucan Antikörpers. Das kleine Elektromikrogramm zeigt einen Teilausschnitt von zwei aneinandergrenzenden Mesophyllzellen (Me) mit Zellwandauflagerungen (Za). In der Vergrößerung des Bildausschnitts ist die Immunogoldmarkierung (schwarze Punkte) erkennbar. Im angrenzenden Zytoplasma sind Chloroplasten (Cp) und ein gelappter Nukleus (Nu) erkennbar.

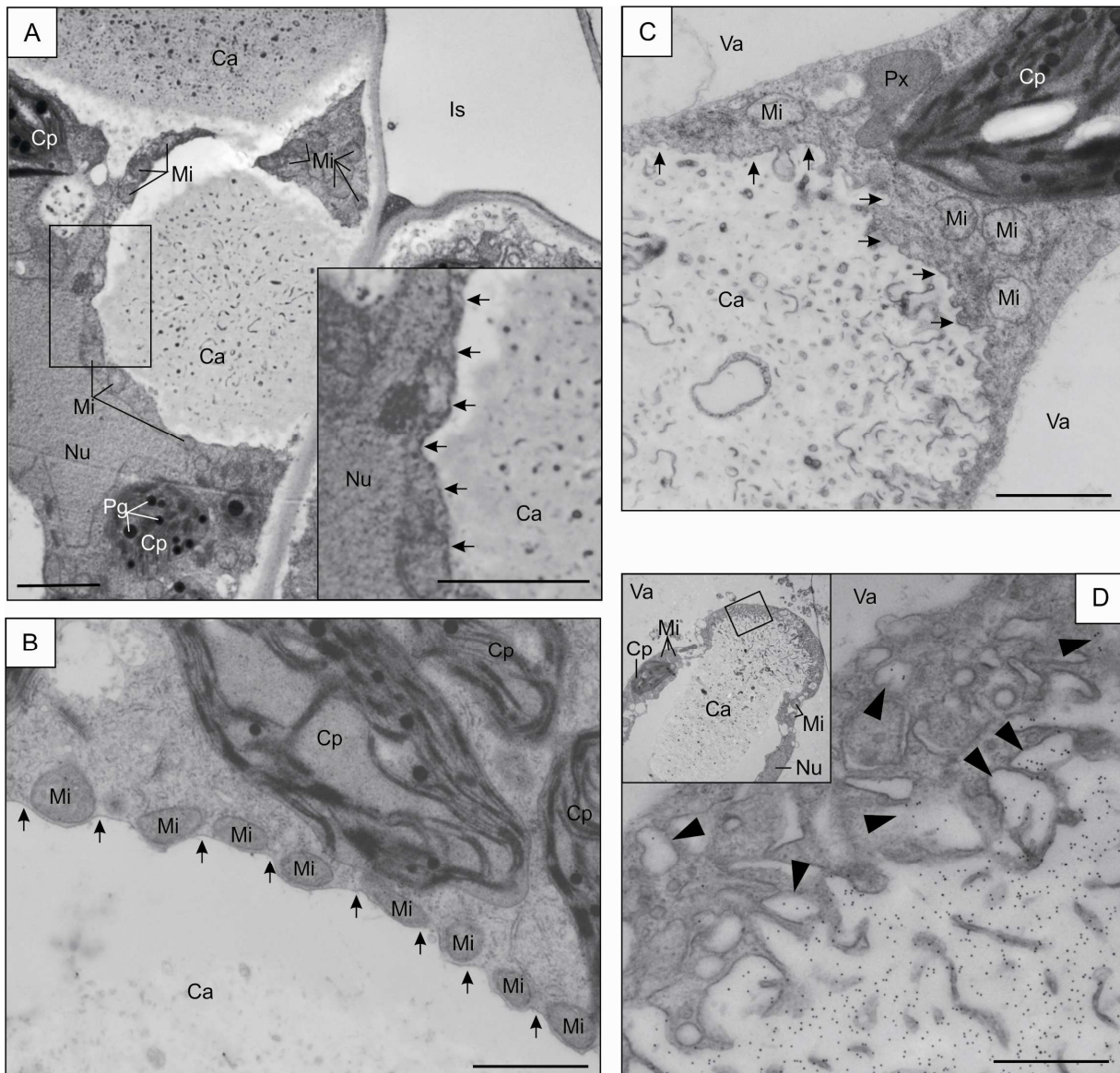


Abbildung 3-4. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der *P. infestans*-induzierten Callose-Depositionen im Mesophyll von *pen2erp1*.

pen2erp1-Blätter wurden mit *P. infestans* inokuliert (5×10^5 Sporen ml^{-1}) und die Inokulationsstellen wurden 3 Tage nach Infektion ausgestanzt und fixiert.

(A-C) Die massiven Callose-Depositionen sind durch die Plasmamembran (Pfeile) vom Zytosol der Mesophyllzelle getrennt und enthalten Einschlüsse mit hoher Elektronendichte, v.a. im Zentrum der Struktur. Ca, Callose; Cp, Chloroplasten; Is, Interzellularraum; Mi, Mitochondrien; Nu, Nukleus; Pg, Plastoglobuli; Px, Peroxisomen. Maßstab = 1 μm

(D) Immunzytologischer Nachweis von Callose in einer Mesophyllzelle unterhalb der Inokulationsstelle unter Verwendung eines anti- β -1,3-Glucan Antikörpers. Goldpartikel sind auch in Vesikel-ähnlichen Strukturen an der Peripherie der Callose-Deposition zu erkennen (Pfeile). Ca, Callose; Cp, Chloroplasten; Mi, Mitochondrien; Nu, Nukleus; Va, Vakuole. Maßstab = 1 μm

3.2 KARTIERUNG UND IDENTIFIZIERUNG DES *ERP1*-GENS

Zum Erstellen einer Kartierungspopulation wurde die *pen2erp1*-Mutante mit dem Arabidopsis Ökotyp Landsberg *erecta* (*Ler*) gekreuzt (L. Westphal, IPB Halle). Mit Hilfe molekularer Marker, die auf Sequenz-Polymorphismen (SNPs, s. 2.2.3) zwischen den Ökotypen Col-0 und *Ler* basieren, konnte *ERP1* auf dem oberen Arm von Chromosom 1 kartiert werden (Kopischke 2007). Der entsprechende Chromosomenabschnitt zwischen den Markern NF21B7 (0,9 Mbp) und NF20D22 (1,07 Mbp) enthält 46 offene Leseraster. Zur Identifizierung des *ERP1*-Gens wurde das *pen2erp1*-Genom durch K. Schneeberger aus dem Labor von D. Weigel (Max Planck Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen) mit Hilfe der Illumina (Solexa) Technologie (Weigel et al. 2008) sequenziert.

Die EMS-Mutagenisierung führt zu Entstehung zufällig verteilter Mutationen im gesamten Genom. Die Effizienz der EMS-Remutagenese des *pen2*-Saatguts betrug im Durchschnitt 2% (Landtag 2006). Im Genom von Arabidopsis sind 33.602 Gene annotiert, davon 27.416 Protein-kodierende Gene (TAIR10). Bei einer Mutagenese-Effizienz von 2% kann man davon ausgehen, dass ca. 670 Gene, davon etwa 550 Protein-kodierende, durch Mutation betroffen sind. Die Sequenzierung des *pen2erp1*-Genoms ergab 689 SNPs im Vergleich zur Col-0-Referenzsequenz, was annähernd der berechneten Zahl eingeführter SNPs entspricht. In dem Intervall zwischen 0,9 bp und 1,07 Mbp auf Chromosom 1 wurden lediglich zwei SNPs identifiziert. Der eine SNP liegt im vierten Intron von *At1g03960* und der andere SNP betrifft den kodierenden Bereich von *At1g04010*. Die G/C→A/T Substitution im Gen *At1g04010* führt zum Verlust einer *Bse*NI Restriktionsschnittstelle (5'-ACTG**G**N-3'), was für die Entwicklung eines Allel-spezifischen CAPS-Markers genutzt wurde (Abbildung 3-5). Mit Hilfe der Allel-spezifischen CAPS-Marker für *pen2* (Lipka et al. 2005) und *erp1*, konnten *erp1*-Einzelmutanten mit dem Genotyp *PEN2erp1* aus der Nachkommenschaft einer Rückkreuzung von *pen2erp1* mit *gll* selektiert werden. Von diesen Einzelmutanten wurde eine repräsentative Linie ausgewählt, die für alle weiteren Experimente und Rückkreuzungen mit *gll* verwendet wurde.

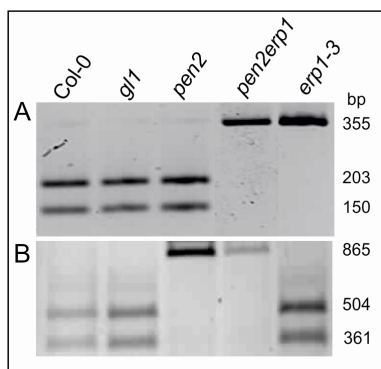


Abbildung 3-5. Allel-spezifische CAPS-Marker für *erp1* und *pen2*.

(A) Der SNP in *erp1* führt zum Verlust einer *Bse*NI-Restriktionsschnittstelle. Amplifikation eines genomischen *ERP1*-Fragments durch PCR und anschließender Restriktionsverdau führt zur Spaltung des PCR-Fragments in Col-0, *gll* und *pen2*, aber nicht in *pen2erp1* und *erp1-3*.

(B) Der SNP in *pen2* führt zum Verlust einer *Bsp*PI Restriktionsschnittstelle. Amplifikation eines genomischen *PEN2*-Fragments durch PCR und anschließender Restriktionsverdau führt zur Spaltung des PCR-Fragments in Col-0, *gll* und *erp1-3*, aber nicht in *pen2* und *pen2erp1*.

3.2.1 *ERP1* KODIERT DIE PHOSPHOLIPID:STEROL-ACYLTRANSFERASE ATPSAT1

Das in der *pen2erp1*-Mutante durch einen Basenaustausch veränderte Gen *At1g04010* kodiert die Phospholipid: Sterol-Acyltransferase PSAT1, die als erste Sterolestersynthese in Arabidopsis beschrieben wurde (s. 1.4.2, Banas et al. 2005). *PSAT1/ERP1* besteht aus 15 Exons und 14 Introns (Abbildung 3-6 A), wobei die kodierende Sequenz 1902 bp umfasst. Das Genprodukt ist ein 633 Aminosäuren langes Protein mit einer molekularen Masse von 71,7 kDa. Der in *pen2erp1* in Exon 14 vorliegende Basenaustausch führt zu einem STOP-Codon (TGA) anstelle eines Tryptophan-Codons (TGG) (Abbildung 3-6 A), was theoretisch in einem verkürzten Genprodukt von 590 Aminosäuren resultiert. Die Mutation betrifft nicht die vorhergesagte katalytische Triade (Ser-195, Asp-461 und His-546) oder die vermutliche Phospholipid-Bindungs-Domäne (¹⁵²AVPYDYRLSP; Banas et al., 2005) des Enzyms. *In silico* Analysen der PSAT1/ERP1- und *erp1*-Aminosäuresequenzen mit ScanProsite (<http://prosite.expasy.org/scanprosite/>) resultierten in der Vorhersage von drei Domänen, die dem verkürzten *erp1*-Protein im Vergleich zum Wildtyp-Protein fehlen (Abbildung 3-6 C): zwei putative Phosphorylierungsstellen, davon ist die Eine (609-612 bp) typisch für die Casein Kinase II (CKII) und die Andere (618-620 bp) für die Proteinkinase C (PKC), sowie eine *N-Glycosylierungs* Stelle (623-626 bp).

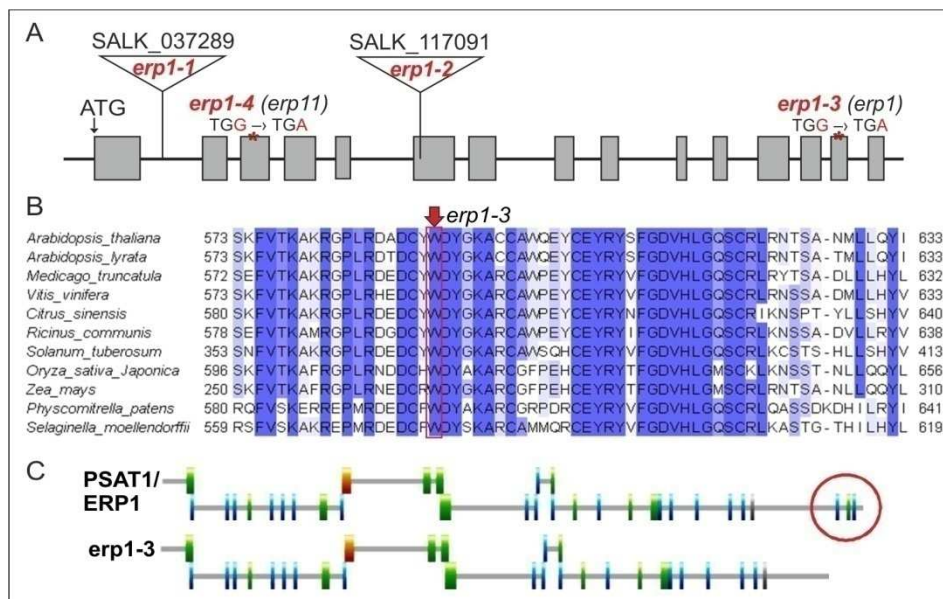


Abbildung 3-6. Die Mutation in *pen2erp1* betrifft das Gen *PSAT1* (*At1g04010*)

(A) Schematische Darstellung des *PSAT1/ERP1*-Gens mit Exon-Intron-Struktur (graue Boxen und schwarze Linien) und Position der Einzelnukleotidaustausche (rot gekennzeichnet) in *erp1-3* (*erp1*) und *erp1-4* (*erp11*), sowie der T-DNA-Insertionen in *erp1-1* (SALK_037289) und *erp1-2* (SALK_117091).

(B) Sequenzvergleich des C-Terminus' von PSAT1/ERP1 und homologer Proteine verschiedener Pflanzenarten. Der Nukleotidaustausch in *erp1-3* führt zur Entstehung eines Stop-Codons an Stelle des Tryptophans (W) an Position 591 in Arabidopsis (durch roten Pfeil und rote Box markiert). Konservierte Aminosäuren sind blau markiert. Gendatenbank-Nummern der Proteinsequenzen: *At*, NP_171897.2; *Al*, XP_002892193.1; *Mt*, AAN77002.1; *Vv*, XP_002271509.1; *Cs*, AAX56094.1; *Rc*, XP_002526572.1; *St*, TA31107_4113; *Os*, BAD21662.1; *Zm*, NP_001170392.1; *Pp*, XP_001782337.1; *Sm*, XP_002972018.1 (*St* TIGR Datenbank, Rest NCBI GeneBank).

(C) *In silico*-Vorhersage von Proteindomänen in PSAT1/ERP1 und *erp1-3* mit ScanProsite. Der rote Kreis markiert die C-terminalen Domänen, welche im verkürzten *erp1-3* theoretisch fehlen.

3.2.2 ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG WEITERER *ATPSATI/ERP1*-ALLELE

Die Überprüfung, ob die verstärkte Abwehrantwort der verschiedenen *erp*-Mutanten nach *P. infestans*-Behandlung auf Mutationen in verschiedenen Genen oder in demselben Gen beruhen, erfolgte durch Allelietests (L. Westphal, IPB Halle). Hierfür wurden die *erp*-Mutanten miteinander gekreuzt und die F1-Nachkommenschaft auf ihren HR-Phänotyp hin untersucht. Aus den Kartierungsanalysen war bekannt, dass die *pen2erp*-Phänotypen rezessiv vererbt werden und die mutierten *erp*-Allele demnach nur im homozygoten Zustand zur Ausprägung kommen. Kommt es bei der Kreuzung zweier *erp*-Mutanten zur Komplementation des HR-Phänotyps, sind verschiedene Gene betroffen, da sich in den heterozygoten F1-Pflanzen das jeweilige Wildtyp-Allel phänotypisch ausprägt. Ist dasselbe Gen mutiert, sind in der heterozygoten F1-Nachkommenschaft nur mutierte Allele des betroffenen Gens vorhanden und es kommt nicht zur Komplementation des HR-Phänotyps. Während der Allelietests wurde festgestellt, dass die Mutante *pen2erp11* allelisch zu *pen2erp1* ist. *pen2erp11* besitzt eine Punktmutation in Exon 3 des *PSATI/ERP1*-Gens, die zu einem verfrühten STOP-Codon (Abbildung 3-6 A) und somit theoretisch zu einem stark verkürzten Genprodukt von 156 Aminosäuren führt. Dieser SNP führt zum Verlust einer *Bst*XI-Restriktionsschnittstelle und wurde als CAPS Marker verwendet, um eine *erp11*-Einzelmutante aus der Rückkreuzung von *pen2erp11* mit *gll* zu isolieren (Daten nicht gezeigt).

Um auszuschließen, dass Hintergrundmutationen den Morphologie- und *P. infestans*-induzierten Phänotyp der *erp1*-Mutante beeinflussen, wurden zusätzlich T-DNA-Insertionslinien des *PSATI/ERP1*-Gens untersucht. Parallel dazu wurden *pen2erp1* und *erp1* mit *pen2* bzw. *gll* zurückgekreuzt, um die Zahl der Hintergrund-Mutationen zu verringern. Aus Zeitgründen wurden die meisten Versuche der vorliegenden Arbeit mit Pflanzen der ersten Rückkreuzungsgeneration durchgeführt.

Für das *PSATI/ERP1*-Gen sind mehrere T-DNA-Insertionslinien erhältlich, von denen die Linien SALK_037289 und SALK_117091 in der Literatur als *psat1-1* und *psat1-2* beschrieben wurden (Bouvier-Navé et al. 2010). Die T-DNA-Insertionen betreffen das zweite Intron bzw. das sechste Exon (Abbildung 3-6 A). *psat1-1* und *psat1-2* wurden ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet und in *erp1-1* (SALK_037289) und *erp1-2* (SALK_117091) umbenannt. Die auf Punktmutation beruhenden *erp1*-Allele der EMS-Mutanten *erp1* und *erp11* werden dementsprechend im Folgenden als *erp1-3* und *erp1-4* bezeichnet (Abbildung 3-6 A), die Doppelmutanten entsprechend als *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4*.

Makro- und mikroskopisch sind die *P. infestans*-induzierten Abwehrreaktionen von *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4* vergleichbar (Abbildung 3-7 A). Der HR-Phänotyp von *pen2erp1-4* ist deutlich stärker als der von *pen2* und korreliert bereits bei einer geringen Sporenkonzentration (5×10^4 Sporen ml⁻¹) mit einer starken Zelltodreaktion und Callose-Depositionen im Mesophyll.

Der Phänotyp der von *erp1-3* und *erp1-4* sowie der beiden T-DNA-Insertionslinien ist schwächer als der von *pen2*, aber stärker als von *gll*, was vor allem nach Trypanblau-Färbung deutlich wird. Bei Inokulationen mit hohen Sporenkonzentrationen (5×10^5 Sporen ml^{-1}) konnten in allen vier *erp1*-Einzelmutanten im Inokulationsbereich Callose-Ablagerungen in Mesophyllzellen beobachtet werden (Abbildung 3-7 B). Somit ist die Bildung dieser Callose-haltigen Zellwandauflagerungen spezifisch für die Mutationen im *PSATI/ERP1*-Gen und beruht nicht auf einer Hintergrundmutation bzw. auf einer Wechselwirkung mit *pen2*.

Um die Stärke der Abwehrreaktion der *erp1*-Einzel- und *pen2erp1*-Doppelmutanten und der entsprechenden Kontrollpflanzen nach *P. infestans*-Behandlung zu quantifizieren, wurde die Intensität der Trypanblau-Färbung im Inokulationsbereich mit Hilfe des Grafikprogramms ImageJ ermittelt. Die Ausprägung der HR kann zwischen verschiedenen Experimenten z.T. stark schwanken (Abbildung 3-7 C). Aufgrund dieser hohen Variabilität konnten in statistischen Analysen, trotz eines Stichprobenumfangs von 60-100 Inokulationsstellen pro Experiment, keine signifikanten Unterschiede in der Trypanblau-Intensität erzielt werden. Allerdings sind, je nach eingesetzter Sporenkonzentration, innerhalb eines Experiments die Unterschiede zwischen *pen2*- und *pen2erp1*-ähnlicher HR (5×10^4 Sporen ml^{-1}) oder zwischen der HR der *erp1*-Einzelmutanten und den entsprechenden Kontrollpflanzen (5×10^5 Sporen ml^{-1}) teilweise erkennbar (Abbildung 3-7 C). Aufgrund der biologischen Variabilität und des zeitlichen Rahmens der vorliegenden Arbeit wurden keine weiteren Versuche unternommen, die Abwehrreaktion der *erp1*-Mutanten zu quantifizieren. In nachfolgenden Experimenten wurde hauptsächlich die deregulierte Callose-Deposition im Mesophyll als *erp1*-spezifischer Phänotyp analysiert.

Zusätzlich zum *P. infestans*-induzierten HR-Phänotyp zeigten alle *erp1*-Einzel- und Doppelmutanten die verfrühte Blattseneszenz, die bei *pen2erp1-3* im Vergleich zu *pen2* und *gll* festgestellt worden war (Daten nicht gezeigt). Das reduzierte Wurzelwachstum konnte allerdings nur für *erp1-3* beobachtet werden, nicht für *erp1-1*, *erp1-2* und *erp1-4*, was darauf hindeutet, dass sich dieser Phänotyp aufgrund einer Hintergrund-Mutation in *pen2erp1-3* und *erp1-3* ausprägt, die nicht im genetischen Hintergrund von *erp1-4* und den T-DNA-Insertionslinien vorhanden ist.

Insgesamt führen vier verschiedene Mutationen in *AtPSATI* zur Ausprägung desselben HR-Phänotyps als Reaktion auf *P. infestans* und zu einer verfrühten Blattseneszenz im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollpflanzen. Im Folgenden wird daher *Atlg04010* als *PSATI/ERP1* bezeichnet.

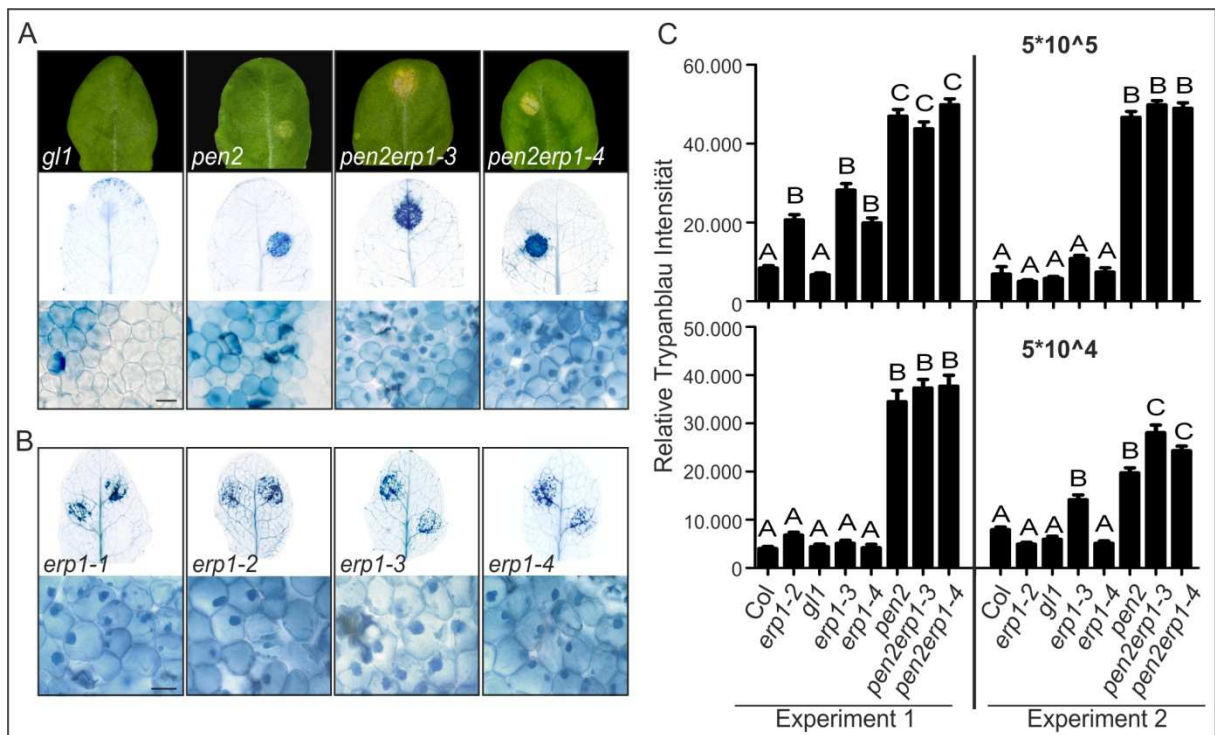


Abbildung 3-7. Nichtwirtsresistenz-Phänotyp verschiedener *erp1*-Allele nach Inokulation mit *P. infestans*. (A) und (B) zeigen makro- und mikroskopische Aufnahmen *P. infestans*-behandelter Blätter 3 Tage nach Inokulation. Die Blätter wurden fotografiert und anschließend mit Trypanblau gefärbt. Die mikroskopischen Bilder zeigen Hellfeld-Aufnahmen von Mesophyllzellen im Bereich der Inokulationsstelle. Die Aufnahmen stehen exemplarisch für 2 Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

(A) Doppelmutanten *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4* im Vergleich zu *gl1* und *pen2* nach Inokulation (5×10^4 Sporen ml^{-1}). Maßstab = 50 μm

(B) *erp1*-Einzelmutanten nach Inokulation (5×10^5 Sporen ml^{-1}). Aufgrund der relativ schwachen Zelltodreaktion der Einzelmutanten wurden keine ungefärbten Blätter abgebildet. Maßstab = 25 μm

(C) Quantifizierung der Zelltodreaktion anhand der relativen Intensität der Trypanblau-Färbung. Die Inokulation der Mutanten und entsprechenden Kontrollpflanzen erfolgte mit 5×10^5 Sporen ml^{-1} (oben) und 5×10^4 Sporen ml^{-1} (unten). In 2 unabhängigen Experimenten wurde die Intensität der Trypanblaufärbung an Inokulationsstellen mit Hilfe der Software ImageJ ermittelt und auf die Hintergrund-Färbung normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte von 90-120 Inokulationsstellen pro Genotyp. Die Großbuchstaben kennzeichnen signifikant verschiedene Klassen der relativen Trypanblau-Intensität (nach Kruskal-Wallis).

3.2.3 KOMPLEMENTATIONSANALYSEN

Die T-DNA-Insertions-Mutante *erp1-2* und die EMS-Mutante *erp1-3* weisen denselben HR-Phänotypen nach Inokulation mit *P. infestans* auf. Durch Kreuzung beider Linien sollte überprüft werden, ob der *erp1-3*-Phänotyp allein auf der Punktmutation in *PSATI/ERP1* beruht, oder ob zusätzliche Hintergrundmutationen zum HR-Phänotyp beitragen. F1-Nachkommen der Kreuzung von *erp1-2* mit *erp1-3* wurden mit *P. infestans* inokuliert und der HR-Phänotyp nach drei Tagen analysiert. In Abbildung 3-8 A ist zu erkennen, dass die F1-Pflanzen mit einer schwachen aber makroskopisch sichtbaren HR auf die *P. infestans*-Behandlung reagierten. Mikroskopische Analysen belegten auch das Auftreten der *erp1*-spezifischen deregulierten Callose-Deposition in Mesophyllzellen in *P. infestans*-behandelten Blättern dieser F1-Pflanzen. Somit ist keine Komplementation des Mutanten-Phänotyps nach Kreuzung von *erp1-2* mit *erp1-3* erfolgt. Dieses Ergebnis bestätigt, dass Mutationen *PSATI/ERP1* den Nichtwirtsresistenz-Phänotyp von *A. thaliana* verändern. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob durch ektopische Expression des *PSATI/ERP1*-

Gens in der *erp1-3*-Mutante der Mutanten-Phänotyp komplementiert werden kann. Dafür wurde die kodierende Sequenz von *PSAT1/ERP1* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaikvirus (CaMV) im *erp1-3* Hintergrund exprimiert, und die Expression des Wildtyp-Transkripts in transgenen *erp1-3*-Linien durch Northern-Blot-Analyse überprüft. In Abbildung 3-8 B und C sind sechs unabhängige transgene *erp1-3*-Pflanzen der T1-Generation gezeigt. In der *erp1-3*-Mutante selbst konnte kein *PSAT1/ERP1*-Transkript detektiert werden. Alle transgenen *erp1-3*-Linien mit *PSAT1/ERP1*-Transkriptakkumulation (#1, 3, 5 und 6) wiesen nach *P. infestans*-Behandlung einen Wildtyp-Phänotyp auf. Transgene Linien ohne erhöhte *PSAT1*-Expression (#2 und 4) zeigten den HR-Phänotyp der *erp1-3*-Mutante. Diese Beobachtungen wurden auf makro- und mikroskopischer Ebene für mehrere unabhängige T1-Transformanten bestätigt.

Die Identifizierung und Charakterisierung vier verschiedener Mutanten mit Defekt im *PSAT1/ERP1*-Gen und die Komplementationsanalysen bestätigen, dass es sich bei dem in *pen2erp1* mutierten *PSAT1*-Gen um *ERP1* handelt.

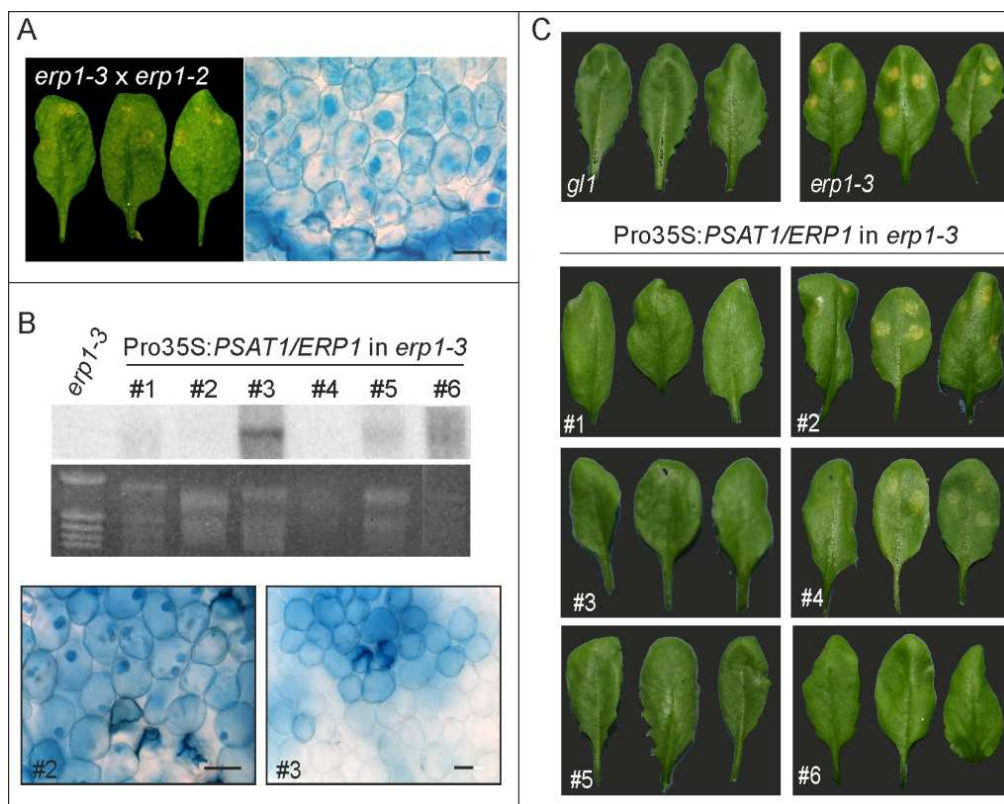


Abbildung 3-8. Komplementationsanalysen bestätigen *PSAT1* als in *erp1-3* betroffenes Kandidatengen
P. infestans-infizierte (5×10^5 Sporen ml^{-1}) Blätter wurden 3 dpi fotografiert und einer Trypanblaufärbung unterzogen.

(A) Repräsentative makro (links)- und mikroskopische (rechts) Aufnahme *P. infestans*-behandelter Blätter von F1-Pflanzen einer Kreuzung von *erp1-2* mit *erp1-3*.

(B) Northern-Blot-Analyse (oben) für sechs unabhängige *erp1-3*-Linien, die mit Pro35S::*PSAT1/ERP1* transformiert wurden (#1-6). Das Blattmaterial Kanamycin-resistenter T1-Transformanten wurde 4 Wochen nach Transfer auf Erde geerntet und zur Isolierung von Gesamt-RNA verwendet. Der Nachweis der ektopischen Expression von *PSAT1* erfolgte mit einer radioaktiv markierten cDNA-Sonde. Ethidiumbromid Färbung der rRNA diente als Ladekontrolle. Die mikroskopischen Bilder (unten) zeigen repräsentative Hellfeld-Aufnahmen von Mesophyllzellen der Transformanten #2 und #3 nach Inokulation mit *P. infestans*.

(C) Makroskopische Aufnahmen *P. infestans*-behandelter Blätter der auch in (B) gezeigten transgenen Linien im Vergleich zu den Kontrollen *erp1-3* und *gl1*.

3.3 EXPRESSION VON *PSATI/ERP1* IN *erp1*-MUTANTEN

Laut *Genevestigator*, einer auf Microarraydaten basierenden öffentlichen Expressionsdatenbank (www.genevestigator.com, Zimmermann et al. 2004), wird *PSATI/ERP1* ubiquitär in allen Organen der Pflanze exprimiert. Eine entwicklungspezifische oder Stress-induzierte Veränderung der *PSATI/ERP1*-Expression geht aus den *Genevestigator*-Daten nicht hervor. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Transkription der verschiedenen *erp1*-Allele im Vergleich zum Wildtyp-Allel verändert ist und wie sich die Mutationen auf die Expression des ERP1-Proteins auswirken.

Hierfür wurden zunächst Northern-Blot-Analysen mit Gesamt-RNA aus Blättern der *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen durchgeführt. Allerdings konnte in mehreren Experimenten für keine der Linien *PSATI*-Transkript detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine sehr schwache Expression des Gens hin, was mit den *Genevestigator*- und Arabidopsis *eFP-Browser*-Daten (bar.utoronto.ca; Provar et al. 2007) übereinstimmt. Um die Sensitivität gegenüber mRNAs mit geringer Expressionsstärke zu erhöhen, wurden RT-PCR-Analysen durchgeführt, in denen die mRNA zunächst mittels Oligo-d(T)₁₈-Primer revers transkribiert und anschließend mit Hilfe verschiedener *PSATI/ERP1*-spezifischer Primer amplifiziert wurde.

Das Primerpaar PR1 und PR2 (s. Anhang 8.1) flankiert die T-DNA-Insertion in *erp1-1* und liegt *upstream* der *erp1-2*-Insertion. PR3 und PR4 (s. Anhang 8.1) flankieren die T-DNA-Insertion in *erp1-2* und binden *downstream* der *erp1-1*-Insertion (Abbildung 3-9 A). Beide Primerpaare wurden für die Amplifikation von cDNA-Fragmenten des *PSATI*-Gens aus den Kontrollpflanzen *gll*, Col-0 und *pen2*, sowie aus *erp1-1*, *erp1-2*, *erp1-3*, *erp1-4*, *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4* eingesetzt (Abbildung 3-9 B). Für *erp1-3*, *erp1-4*, die Doppelmutanten und Kontrollpflanzen wurden mit beiden Primerpaaren RT-PCR-Fragmente erhalten. Bei *erp1-1* führte nur die PCR mit dem Primerpaar PR3PR4 zu einem Produkt, bei *erp1-2* nur mit dem Primerpaar PR1PR2 (Abbildung 3-9 B, rote Box). Die Amplifikation der durch T-DNA-Insertion unterbrochenen Sequenzen war demnach nicht möglich, jedoch konnten Fragmente des *PSATI*-Transkripts, die stromauf- bzw. -abwärts der T-DNA-Insertion liegen, durch RT-PCR nachgewiesen werden. Dies stimmt mit der Arbeit von Bouvier-Navé et al. (2010) überein, die bereits berichteten, dass die T-DNA-Insertionen in den entsprechenden SALK-Linien nicht zu einem vollständigen Verlust, sondern zu einer Verkürzung des *PSATI*-Transkripts führen.

Die Primer PSAT-FCD-F und PSAT-FCD-Rneu (s. Anhang 8.1) ermöglichen die Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenz des *PSATI/ERP1*-Gens. RT-PCR mit diesen Primern erbrachte für *erp1-3*, *erp1-4*, die Doppelmutanten und Kontrollpflanzen das entsprechende 1,7 kb-Produkt, jedoch nicht bei den T-DNA-Linien *erp1-1* und *erp1-2* (Daten nicht gezeigt). Zum Nachweis der Punktmutationen in der cDNA von *erp1-3* und *erp1-4* wurde Gesamt-RNA aus Blättern für eine *One-Step*-RT-PCR mit den Primerpaaren *erp1*-SNP-CDS-F/-R bzw. *erp11*-SNP-CDS-F/-R eingesetzt (s. Anhang 8.1). Klonierung und Sequenzierung der RT-PCR-Produkte ergab, dass die *PSATI*-cDNA von *erp1-3* und *erp1-4* die jeweilige Punktmutation enthält (s. Anhang 8.3).

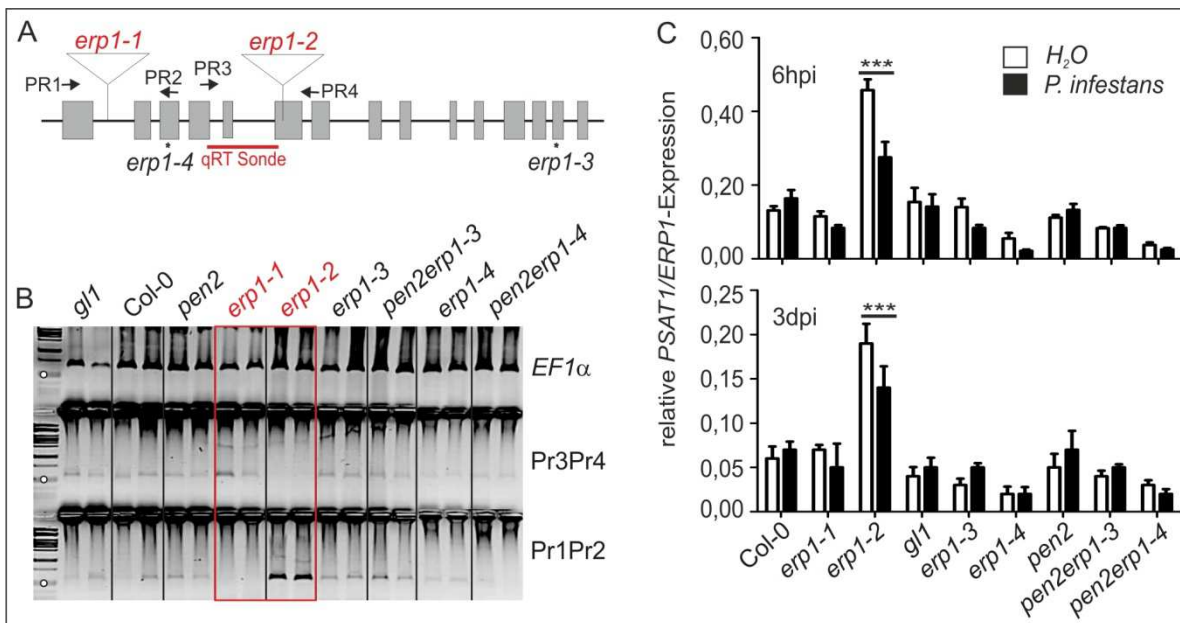


Abbildung 3-9. Punktmutationen und T-DNA-Insertionen in *ERP1* führen nicht zu einem Verlust des Transkripts.

(A) Schematische Darstellung des *PSAT1*-Gens mit Introns (schwarze Linien) und Exons (graue Boxen), sowie der Position der RT-Primer (Pfeile) und qRT-Sonde (roter Balken), die zur Analyse und Quantifizierung der *PSAT1*-Transkriptmenge in den T-DNA-Insertionslinien *erp1-1* und *erp1-2* sowie den EMS-Mutanten *erp1-3* und *erp1-4* dienten. Primersequenzen und Sondeninformation sind im Anhang aufgeführt (8.2).

(B) RT-PCR-Analyse mit den Primern Pr1Pr2 und Pr3Pr4. Die Amplifikation von *EF1α*-mRNA diente als endogene Kontrolle. Der weiße Punkt markiert die 500 bp-Markerbande.

(C) Quantifizierung der *PSAT1*-Transkriptmenge durch qRT-PCR. Als Referenzgen diente *PP2A*. Dargestellt ist der ΔCT -Wert als Mittelwert aus 3 Experimenten mit 6 biologischen Replikaten und die entsprechende Standardabweichung. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen *P. infestans*-behandelten und -unbehandelten Pflanzen (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test, $p < 0,001$)

Die Ergebnisse der RT-PCR wurden mit Hilfe der sensitiveren Methode der qRT-PCR verifiziert. Die relative *PSAT1/ERP1*-Transkriptmenge in Blättern der *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen wurde 6 Stunden bzw. 3 Tage nach Behandlung mit *P. infestans* oder Wasser analysiert. Die relative Expression wurde über den ΔCT -Wert ($2^{-\Delta\text{CT}}$) bestimmt, welcher die Expression des Zielgens, bezogen auf die Expression des stabil exprimierten Referenzgens *PP2A* (*At1g13320*, Czechowski et al. 2005), angibt (Schmittgen und Livak 2008). Mit Ausnahme von *erp1-2* unterschieden sich die relativen *PSAT1/ERP1*-Transkriptmengen der *erp1*-Mutanten und Kontrollen nicht signifikant voneinander (Abbildung 3-9 C). In Wasser-behandelten *erp1-2*-Blättern konnte eine erhöhte Transkriptakkumulation beobachtet werden, die scheinbar durch *P. infestans*-Behandlung gehemmt wird. Da die Taqman-Sonde für die qRT-Analysen *upstream* der *erp1-2*-Insertion bindet, wurde möglicherweise akkumulierende verkürzte *PSAT1/ERP1*-cDNA detektiert. Für Folgeuntersuchungen sollte eine Sonde *downstream* der T-DNA-Insertion verwendet werden. Die Behandlung mit *P. infestans* bewirkte mit Ausnahme von *erp1-2* bei keiner Linie eine Veränderung der *PSAT1*-Transkription (Abbildung 3-9 C). Dies bestätigt die Expressionsdaten von *Genevestigator* und dem Arabidopsis *eFP-Browser* für Col-0.

Für die Detektion des *PSAT1/ERP1*-Proteins wurden zwei spezifische anti-*PSAT1* Peptid-Antikörper konstruiert (Eurogentec, siehe Anhang 8.4) und in Western-Blot-Analysen mit Proteinextrakten aus

Blättern der *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen eingesetzt. Funktionalität und Spezifität der Antikörper wurden mit bakteriell exprimiertem PSAT1/ERP1- und *erp1-3*-Protein getestet. Die erwartete Größe von PSAT1/ERP1 entspricht 71,7 kDa, wohingegen das um 43 Aminosäuren kürzere *erp1-3*-Protein eine molekulare Masse von 66,6 kDa aufweisen sollte (<http://web.expasy.org>). Während der Antikörper PSAT-1 keine hohe Spezifität aufwies und deshalb in späteren Analysen nicht mehr verwendet wurde (Daten nicht gezeigt), führten Western-Blot-Analysen mit dem Antikörper PSAT-2 (s. Anhang 8.4) zur spezifischen Detektion der rekombinant exprimierten Proteine (Abbildung 3-10). Daraufhin wurde dieser Antikörper für Western-Blot-Analysen mit Gesamtproteinextrakten aus Blättern der *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen verwendet, allerdings konnte in mehreren Experimenten kein Signal erhalten werden. Auch in den unter 3.2.3 beschriebenen transgenen *erp1-3*-Linien, welche *PSAT1/ERP1* unter Kontrolle des konstitutiv aktiven CaMV 35S-Promotors exprimieren, konnte kein PSAT1/ERP1-Protein detektiert werden. (Daten nicht gezeigt). In Tabak und Arabidopsis konstitutiv exprimierte ERP1-GFP Fusionsproteine konnten z.T. mit dem PSAT-2-Antikörper detektiert werden (s. 3.5 und Anhang 8.4).

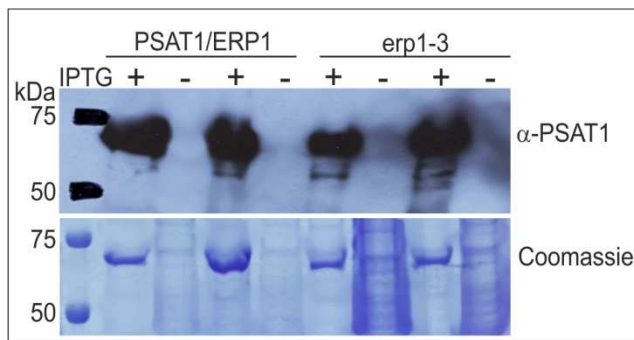


Abbildung 3-10. Spezifischer anti-PSAT1-Antikörper detektiert rekombinantes ERP1- und *erp1-3*-Protein.

Western-Blot-Analyse mit spezifischem anti-PSAT1-Antikörper (PSAT-2). Die Konstrukte *Pro35S:PSAT/ERP1* und *Pro35S:erp1-3* in pDEST17 wurden in chemisch kompetente BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen transferiert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1mM IPTG induziert (+). Als Negativkontrolle dienten nicht-induzierte *E. coli*-Zellen (-). In Proteinextrakten IPTG-induzierter Zellen konnte mit PSAT-2 eine Bande bei ca. 70kDa detektiert werden, die auch nach Coomassie-Färbung (unten) als dominante Bande sichtbar wurde.

3.4 VERÄNDERUNG DER STEROLHOMÖOSTASE DURCH MUTATIONEN IN *PSAT1/ERP1*

Die bisherigen Untersuchungen lieferten keine Erkenntnisse über die Auswirkungen der verschiedenen *ERP1*-Mutationen auf die Funktion von PSAT1/ERP1. Um indirekt Hinweise auf Funktionsveränderungen zu erhalten, wurde das Sterolprofil der verschiedenen *erp1*-Mutanten mit dem von Kontrollpflanzen verglichen. Die Analyse der Sterollipid-Zusammensetzung in Mutanten und transgenen Linien erfolgte in vorangegangenen Studien durch Dünnschichtchromatografie in Kombination mit gaschromatischen und massenspektrometrischen Verfahren (TLC/GC-MS; Banas et al. 2005, Bouvier-Navé et al. 2010). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Quantifizierung von Sterollipiden der *erp1*-Mutanten erfolgte in Kooperation mit P. Dörmann und V. Wever (Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanzen, Universität Bonn). Dabei kam eine in Wever et al. (2011) beschriebene Methode zum Einsatz, die auf Quadrupol-Flugzeit-Massenspektrometrie (Q-TOF MS) basiert. Mit Hilfe dieser Methode können nicht nur die

Sterollipid-Klassen FS, SG, SE und ASG (s. 1.4) detektiert und quantifiziert werden, sondern auch die verschiedenen molekularen Spezies der Sterollipidverbindungen. Untersucht wurden Lipidextrakte aus Blättern adulter *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen, zum einen ohne vorangegangene Behandlung, um mögliche Unterschiede in der Sterolkomposition zu analysieren, und zum anderen nach Behandlung mit *P. infestans*, um mögliche Veränderungen in der Sterolhomöostase während der Nichtwirtsinteraktion zu beobachten.

Die Mengen der verschiedenen Sterollipide in den Kontrollpflanzen Col-0, *gll* und *pen2* unterschieden sich nicht voneinander und entsprechen einer Verteilung von FS>SE>SG>ASG (Abbildung 3-11 A). Dabei betrug der Anteil der vier Sterollipid-Klassen an der Gesamtmenge der Sterole in Col-0 Blättern 73% FS, 14% SE, 8% SG und 4% ASG (s. 3.10, Tabelle 3-2), was mit den Daten von Patterson et al. (1993) vergleichbar ist. Im Gegensatz dazu entsprechen die Mengen der Sterollipide in *erp1-3* einem Verhältnis von FS>SG>SE>ASG (Abbildung 3-11 A) mit einem Anteil von 83% FS, 14% SG, 1,75% ASG und 0,75% SE an den Gesamtsterolen im Blatt (s.3.10, Tabelle 3-2). Die SE-Gehalte der *erp1*-Mutanten waren im Vergleich zu den Kontrollen stark reduziert (Abbildung 3-11 A). Die SE-Menge in Col-0 betrug 0,05 nmol mg⁻¹ Frischgewicht (*fresh weight*, FW), während für die T-DNA-Insertionslinien *erp1-1* und *erp1-2* nur 0,0052 bzw 0,012 nmol mg⁻¹ FW gemessen wurden. Bouvier-Navé et al. (2010) ermittelten mit Hilfe einer TLC/GC-MS-basierten Methode ähnliche SE-Mengen in Blättern von Wildtyppflanzen und *psat1*-Mutanten (ca. 0,06 nmol mg⁻¹ FW in Col-0, ca. 0,027 nmol mg⁻¹ FW in *erp1-1* (*psat1-1*) und ca. 0,015 nmol mg⁻¹ FW in *erp1-2* (*psat1-2*); Umrechnung nach Wewer et al., 2011). In *erp1-3*, *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4* war die SE-Menge mit durchschnittlich 0,002 nmol mg⁻¹ FW noch stärker reduziert als in den T-DNA-Insertionslinien. Die ASG-Mengen in den *erp1*-Mutanten waren mit durchschnittlich 0,005 nmol mg⁻¹ FW um das 2-fache geringer als in den Kontrollen mit durchschnittlich 0,01 nmol mg⁻¹ FW (Abbildung 3-11 A). Im Gegensatz zu den reduzierten Mengen an acylierten Sterolen wurden in den *erp1*-Mutanten höhere SG-Gehalte als in den Kontrollen gemessen. Im Durchschnitt enthielten Blattextrakte der *erp1*-Mutanten 0,05 nmol SGs mg⁻¹ FW, während in Blättern der Kontroll-Linien maximal 0,025 nmol mg⁻¹ FW gemessen wurden. (Abbildung 3-11 A). Die Mengen der FS in den *erp1*-Mutanten, mit Ausnahme von *erp1-3*, waren im Vergleich zu den Kontrollpflanzen leicht erhöht (Abbildung 3-11 A).

SE gehören zur Klasse der neutralen Lipide, die in zytosolischen Lipidtröpfchen akkumulieren (s. 1.4.2). Diese können mit dem lipophilen Farbstoff Nilrot sichtbar gemacht werden, wobei die Fluoreszenz von der Hydrophobizität der Lipide abhängt (Diaz et al. 2008). In Blattgewebe von *gll* und *pen2* konnte nach Nilrot-Färbung die gelbe Fluoreszenz neutraler Lipide (550-600nm) durch konfokale Laserscan-Mikroskopie in Lipidtröpfchen detektiert werden (Abbildung 3-11 B). In *erp1-3* und *pen2erp1-3* (Abbildung 3-11 B) sowie in allen anderen *erp1*-Mutanten (s. Anhang 8.9) wurde nur in den Stomata Nilrot-Fluoreszenz beobachtet. Dieser Phänotyp der fehlenden Fluoreszenz von Lipidtröpfchen nach Nilrot-Färbung konnte in insgesamt 3 Experimenten als spezifisch für die unterschiedlichen *erp1*-Allele bestätigt werden.

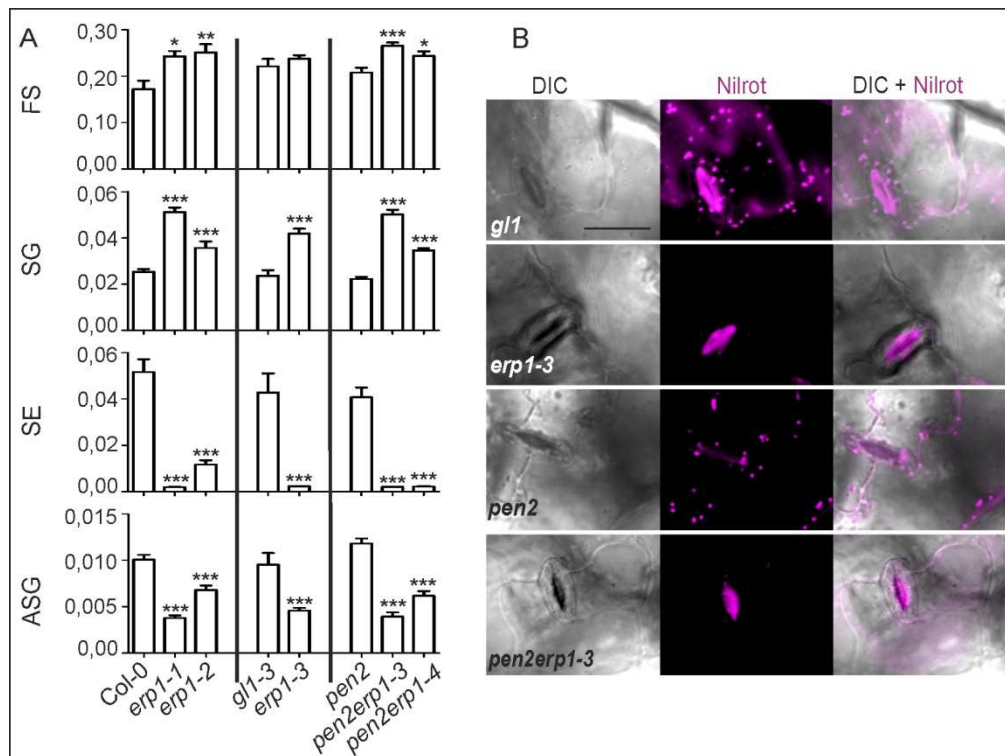


Abbildung 3-11 Veränderte Sterollipid-Zusammensetzung und fehlende Nilrot-Fluoreszenz von Lipidtröpfchen in *erp1*-Mutanten.

(A) Die Mengen (nmol mg⁻¹ FW) der verschiedenen Sterollipide wurden mittels Q-TOF MS/MS quantifiziert. Die Lipidextraktion erfolgte aus Blättern 5 Wochen alter Pflanzen. Gezeigt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten und deren Standardabweichung (n=10). Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollpflanzen unterscheiden, wurden durch Sternchen markiert (Mann WhitneyTest; *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001). Die Kontrollpflanzen entsprechen dem genetischen Hintergrund der jeweiligen *erp1*-Mutante. FS, freie Sterole; SG, Sterolglycoside; SE, Sterolester; ASG, acylierte Sterolglycoside

(B) Nilrot-Färbung von Blattscheiben 5 Wochen alter *erp1-3*-, *pen2erp1-3*-, *gl1*- und *pen2*-Pflanzen. Gezeigt sind Lichtbildaufnahmen mit differenziellem Interferenzkontrast (DIC), Nilrot-Fluoreszenz zwischen 550-600nm der im Lichtbild abgebildeten Zellstrukturen (Nilrot) und die Überlagerung beider Kanäle (DIC + Nilrot). Maßstab = 20 µm

In Abbildung 3-12 A sind die nach *P. infestans*-Behandlung gemessenen Mengen der verschiedenen Sterollipid-Klassen exemplarisch für *gl1* und *erp1-3* dargestellt, in Anhang 8.5 sind die Sterollipid-Gehalte der übrigen Kontrollpflanzen und *erp1*-Mutanten aufgeführt. In inokulierten Blättern von *gl1* und *pen2* wurden erhöhte SE-Mengen gemessen. In *gl1* z.B. steigt die SE-Menge von ca. 0,04 nmol mg⁻¹ FW innerhalb von 3 Tagen nach *P. infestans*-Behandlung auf ca. 0,07 nmol mg⁻¹ FW. Im Gegensatz dazu wurde in keiner der *erp1*-Mutanten eine solche *P. infestans*-induzierte SE-Akkumulation beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhten SE-Mengen in *gl1* und *pen2* nach *P. infestans*-Behandlung auf die Aktivität von PSAT1/ERP1 zurückzuführen ist. Außerdem weisen Blätter behandelter *gl1*- und *erp1-3*-Pflanzen geringere FS-Mengen auf als Blätter unbehandelter Pflanze. Dieser Unterschied im FS-Gehalt konnte allerdings für keine andere Linie statistisch abgesichert werden (Anhang 8.5).

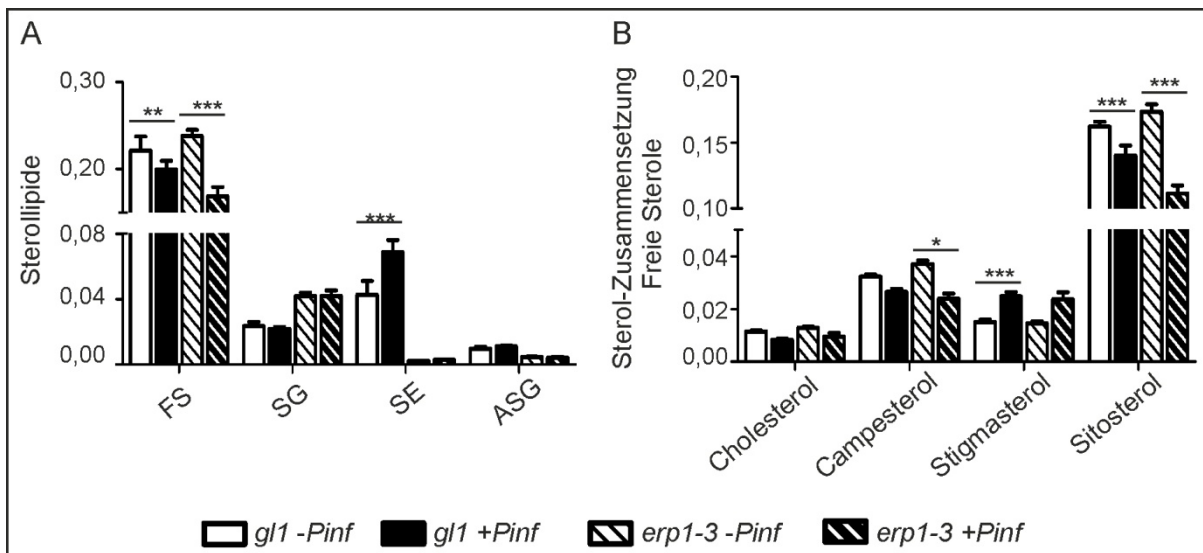


Abbildung 3-12. Einfluss von *P. infestans* auf das Sterolprofil von *gl1* und *erp1-3*.

Die Lipidextraktion erfolgte aus Blättern 3 Tage nach Behandlung mit *P. infestans* (Tropfeninokulation, 5×10^5 Sporen ml^{-1}) bzw. Wasser (gesprüht). Dargestellt sind die Mengen (nmol mg^{-1} FW) der verschiedenen Sterollipidklassen (A) bzw. freier Sterole (B) als Mittelwerte aus 2 Experimenten ($n=10$) und deren Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Pflanzen eines Genotyps wurden durch Sternchen markiert (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

(A) *P. infestans*-Behandlung führt zu erhöhter SE-Akkumulation in *gl1*, nicht aber in *erp1-3*, und zu verminderten FS-Mengen.

(B) *P. infestans*-Behandlung führt zu erhöhter Stigmasterol-Akkumulation und reduzierten Sitosterol-Gehalten.

Um zu untersuchen, ob die *erp1*-Mutationen nicht nur die Sterolhomöostase sondern auch die Sterolbiosynthese beeinträchtigt, wurden die einzelnen Sterolverbindungen der FS analysiert. Die Quantifizierung erfolgte dabei mit Hilfe interner Standards für Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol und Cholesterol (Wewer et al. 2011). Aufgrund des gleichen Fragmentierungsmusters von Stigmasterol und Isofucosterol wurden diese Phytosterole zusammen quantifiziert.

Die ermittelten Sterol-Mengen nach *P. infestans*- bzw. Wasser-Behandlung sind in Abbildung 3-12 B exemplarisch für *gl1* und *erp1-3* dargestellt, die Sterolprofile der übrigen Linien sind in Anhang 8.5 aufgeführt. Wie von Patterson et al. (1993) beschrieben, machten die Hauptsterole Sitosterol und Campesterol den größten Anteil der FS aus, gefolgt von Stigmasterol/Isofucosterol und Cholesterol (Abbildung 3-12 B). Die Zusammensetzung und Mengen der FS in Blättern adulter Kontrollpflanzen und *erp1*-Mutanten unterschieden sich nicht voneinander. Der Anteil von Sitosterol, Campesterol, Stigmasterol/Isofucosterol bzw. Cholesterol an der Gesamtmenge der FS in Wasser-behandelten Col-0-Blättern betrug 73%, 14%, 6% bzw. 5% und 73%, 16%, 6% bzw. 5% in *erp1-3* (s. 3.10, Tabelle 3-2). Das Verhältnis der Sterolverbindungen in Blättern wird durch Behandlung mit *P. infestans* in Kontrollpflanzen und *erp1*-Linien gleichermaßen verändert. Drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* konnte sowohl in Kontroll-Linien, als auch in *erp1*-Mutanten ein signifikant erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol nach *P. infestans*-Behandlung beobachtet werden (Abbildung 3-13). Dabei geht dieses erhöhte Verhältnis von Stigma- zu Sitosterol in allen Linien, außer *erp1-3*, auf einen signifikanten Anstieg von Stigmasterol zurück (s. Anhang 8.5). In *erp1-3* hingegen führt eine signifikant reduzierte Menge an Sitosterol zu dem erhöhten

Stigmasterol/Sitosterol-Verhältnis (Abbildung 3-12 B). Der Anstieg von Stigmasterol ist am höchsten in den *pen2erp1-3*- und *pen2erp1-4*-Doppelmutanten und in *pen2* höher als in den *erp1*-Einzelmutanten, *gll* sowie Col-0 (Abbildung 3-13). Auch die Akkumulation der anderen untersuchten Sterole scheint durch *P. infestans* beeinflusst zu werden. So konnte für manche Linien eine Abnahme von Cholesterol und Campesterol beobachtet werden (Abbildung 3-12 B, s. Anhang 8.5).

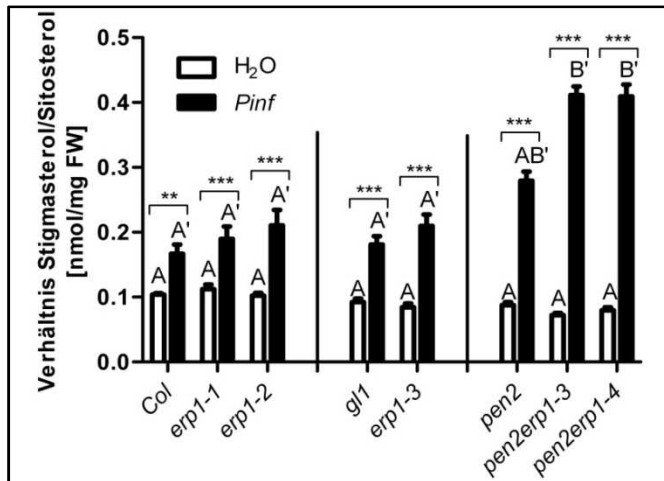


Abbildung 3-13. Erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol in *P. infestans*-behandelten Arabidopsis-Blättern.

Die Stigmasterol- und Sitosterol-Mengen in Blättern *P. infestans*-behandelter (5×10^5 Sporen ml^{-1} , schwarze Balken) und -unbehandelter (weiße Balken) Kontroll- und *erp1*-Linien wurden 3dpi mittels Q-TOF MS/MS quantifiziert. Ein signifikanter Anstieg von Stigmasterol im Verhältnis zu Sitosterol nach *P. infestans*-Behandlung ist durch Sternchen markiert (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$). Die Großbuchstaben kennzeichnen Unterschiede der gemessenen Sterolmenge zwischen den einzelnen Genotypen (nach Kruskal-Wallis). Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Experimenten und deren Standardabweichung ($n=10$).

Zusammenfassend wurde in den Q-TOF MS/MS-Messungen beobachtet, dass Mutationen in *PSAT1/ERP1* zu einem Ungleichgewicht der Sterolhomöostase führen, mit reduzierten SE- und ASG-Mengen sowie einem erhöhten SG-Gehalt und einem leichten Anstieg der FS im Blatt. In *gll* und *pen2* führte die Behandlung mit *P. infestans* zur Akkumulation von SEs, was vermutlich auf die *PSAT1/ERP1*-Aktivität zurückgeht, da dies in *erp1*-Mutanten nicht beobachtet wurde. Eine in allen Linien beobachtete Reaktion auf *P. infestans* war ein im Vergleich zu Wasser-behandelten Proben erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol.

3.5 LOKALISATION DES KONSTITUTIV EXPRIMIERTEN PSAT1/ERP1-GFP-FUSIONSPROTEINS

Über die subzelluläre Lokalisation von *PSAT1/ERP1* ist bisher kaum etwas bekannt. Da sequenzbasierte *in silico*-Analysen (SubCellular Proteomic Database, SUBA) keine eindeutige Vorhersage zur Lokalisation ermöglichten und bisher keine Daten aus *in vivo*-Lokalisationsstudien vorliegen, sollte die subzelluläre Lokalisation von *PSAT1/ERP1* mit Hilfe von GFP-Fusionen fluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Aufgrund der schwachen Aktivität des endogenen *PSAT1/ERP1*-Promotors wurde die kodierende Sequenz von *PSAT1/ERP1* hinter den konstitutiv aktiven CaMV-35S-Promotor kloniert. Dafür wurde der binäre Gateway-Vektor pEARLEY103 (Earley et al. 2006) genutzt, in dem das *PSAT1/ERP1*-Gen im Leserater mit *GFP* fusioniert wurde. Die Analyse der *PSAT1/ERP1*-GFP-Fluoreszenz erfolgte in Blattepidermiszellen stabil transformierter Arabidopsis-Linien und transient transformierter *N. benthamina*-Pflanzen. In transgenen Arabidopsis-Linien sollte außerdem die Lokalisation des verkürzten *erp1-3*-Genproduktes und der Einfluss von *P.*

infestans auf die subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Die Lokalisationsstudien wurden mit einem konfokalen Laserscan-Mikroskop (*confocal laserscanning microscope*, CLSM) durchgeführt (s. 2.2.10.2).

3.5.1 LOKALISATIONSSTUDIEN MIT TRANSGENEN ARABIDOPSIS-LINIEN

Pro35S:PSAT1/ERP1- und Pro35S:erp1-3-GFP-Konstrukte wurden mit Hilfe der Agrobakterienvermittelten Blütentransformation stabil in *gll*, *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* eingebracht. In der resultierenden T1-Generation wurde die Expression der Fusionsproteine mit einem anti-GFP Antikörper in Western-Blot-Analysen überprüft. Die gelelektrophoretisch ermittelten Größen der PSAT1/ERP1- und erp1-3-GFP-Fusionsproteine entsprachen den erwarteten Größen von ca. 100 bzw. 96 kDa, bei einem GFP-Molekulargewicht von 30 kDa (s. 3.3). Bei starker Expression von PSAT1/ERP1-GFP konnte das Fusionsprotein z.T. auch mit dem spezifischen anti-PSAT1-Antikörper PSAT-2 (s. 3.3) nachgewiesen werden (s. Anhang 8.4).

Die Expression von PSAT1/ERP1-GFP führte zur Komplementation der *erp1*-spezifischen HR nach *P. infestans*-Behandlung, veränderte jedoch nicht die Resistenzreaktion der Referenz-Linien, wie in Abbildung 3-14 A exemplarisch dargestellt ist. Durch die Expression von erp1-3-GFP wurde keine Komplementation des *erp1*-Phänotyps transgener *erp1-3*- und *pen2erp1-3*-Pflanzen und keine Veränderung der Resistenzreaktion transgener *gll*- und *pen2*-Pflanzen gegen *P. infestans* erzielt (Daten nicht gezeigt). Transgene Pflanzen mit einer starken Expression von PSAT1/ERP1- oder erp1-3-GFP wurden für Lokalisationsstudien verwendet und in die T2-Generation überführt. Die Expression der Fusionsproteine in T2-Pflanzen wurde nur fluoreszenzmikroskopisch überprüft, da bereits in der T1-Generation eine Korrelation zwischen einem deutlichen Signal in der Western-Blot-Analyse und der fluoreszenzmikroskopischen Detektion in Blattepidermiszellen festgestellt werden konnte.

In PSAT1/ERP1-GFP-exprimierenden Pflanzen war die GFP-Fluoreszenz in kleinen sphärischen Strukturen lokalisiert (Abbildung 3-14 B). Diese Lokalisation war unabhängig vom genetischen Hintergrund der transgenen Pflanze. Durch die Aufnahme von Zeitserien im CLSM konnte die Bewegung der Strukturen im Zytoplasmastrom von Epidermis- und Mesophyllzellen erfasst werden. Um die Bewegung der grün fluoreszierenden Strukturen zu veranschaulichen, wurden zwei Einzelbilder im Abstand von 20 Sekunden aufgenommen und mit einem Bildbearbeitungsprogramm (ImageJ) übereinander gelegt. Um die zu beiden Zeitpunkten detektierte Fluoreszenz unterscheiden zu können, wurde die GFP-Fluoreszenz zu Beginn der Messung in Grün und nach 20 Sekunden in Rot dargestellt. In Abbildung 3-14 C ist zu erkennen, dass die im Abstand von 20 Sekunden detektierten GFP-Signale kaum überlappen (Überlappung in Gelb dargestellt), was die Bewegung der Strukturen verdeutlicht. Die Bewegung der grün-fluoreszierenden Strukturen konnte auch nach *P. infestans*-Behandlung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Es ließ sich keine fokale Akkumulation von PSAT1/ERP1-GFP unterhalb von Penetrationsstellen 24h nach Inokulation feststellen (Abbildung

3-14 D). Die Lokalisation von *erp1-3*-GFP unterschied sich kaum von der des PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsproteins in transgenen Arabidopsis-Pflanzen. Zum Teil schienen die grün-fluoreszierenden Strukturen in *erp1-3*-GFP-exprimierenden Pflanzen größer und nicht so zahlreich zu sein (Abbildung 3-15).

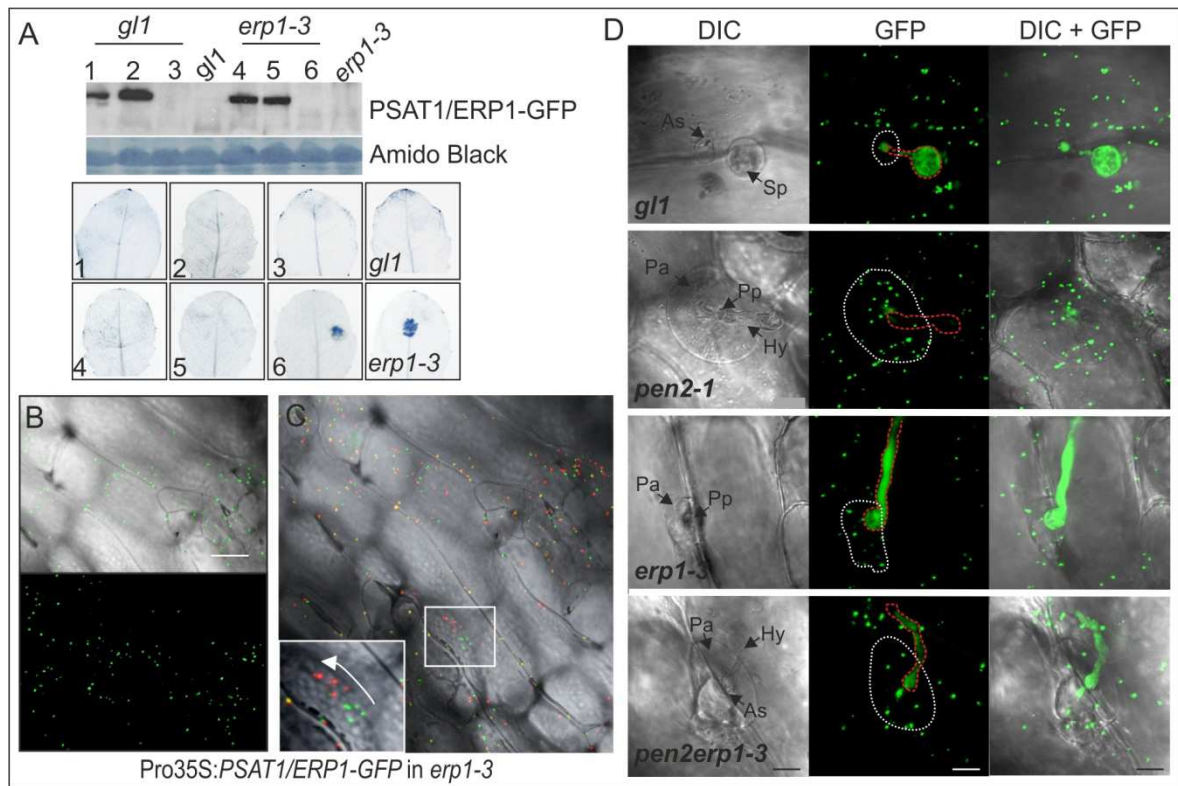


Abbildung 3-14. Lokalisation des PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsproteins in transgenen Arabidopsis-Linien

(A) Expression von PSAT1/ERP1-GFP in transgenen *gl1*- (#1-3) und *erp1-3*- (#4-6) Pflanzen der T1-Generation. Die Detektion von PSAT1/ERP1-GFP in Western-Blot-Analysen (oben) erfolgte mit einem anti-GFP-Antikörper. Die Amidoschwarz-Färbung der Western-Blot-Membran diente als Ladekontrolle (RubisCo). Blätter der transgenen Pflanzen wurden 3 Tagen nach *P. infestans*-Inokulation (5×10^5 Sporen ml^{-1}) einer Trypanblaufärbung unterzogen. Gezeigt ist ein repräsentatives Blatt pro Linie (unten).

(B-D) Konfokale Laserscan-Mikroskopie zur Analyse der subzellulären Lokalisation von PSAT1/ERP1-GFP in Blattepidermiszellen transgener Pflanzen. Die GFP-Fluoreszenz wurde durch Licht der Wellenlänge 488nm angeregt und bei 490-530nm in sphärischen Strukturen in Epidermiszellen detektiert.

(B) GFP-Fluoreszenz in einer transgenen *erp1-3*-Pflanze mit (oben) und ohne (unten) Hellfeld-Aufnahme des Blattausschnittes. Maßstab = 25 μm

(C) Überlagerung zweier Einzelaufnahmen der GFP-Fluoreszenz (in rot und grün), die im Abstand von 20 Sekunden in demselben Bildausschnitt detektiert wurde. Beide Aufnahmen wurden mit der entsprechenden Hellfeld-Aufnahme des Blattausschnittes kombiniert.

(D) PSAT/ERP1-GFP-Fluoreszenz an Stellen versuchter Penetration von *P. infestans* in transgenen *gl1*-, *pen2*-, *erp1-3*- und *pen2erp1-3*-Pflanzen. Die mikroskopische Analyse erfolgte 1 Tag nach Inokulation (2×10^4 Sporen ml^{-1}). Gezeigt sind repräsentative Lichtbildaufnahmen mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC), die GFP-Fluoreszenz der im Lichtbild abgebildeten Zellstrukturen (GFP) und die Überlagerung beider Kanäle (DIC + GFP). Die Position der im Hellfeld beobachteten Papille ist im GFP-Kanal weiß, *Phytophthora*-Strukturen sind rot markiert. As, Angriffsstelle; Sp, Sporangium; Pa, Papille; Pp, Penetrationspore; Hy, Hyphenähnliche Struktur; Maßstab = 10 μm

Erste Analysen transient in Arabidopsis-Protoplasten, Tabakblättern und Zwiebelepidermiszellen exprimierter PSAT1/ERP1-GFP- und *erp1-3*-GFP-Fusionsproteine, deuten auf einen Einfluss der Mutation in *erp1-3* auf die subzelluläre Lokalisation von PSAT1/ERP1 hin. Während PSAT1/ERP1-GFP, wie bereits in stabil transformierten transgenen Arabidopsis-Pflanzen, in runden beweglichen

Strukturen detektiert werden konnte, schien *erp1-3*-GFP eher im Zytoplasma oder ER lokalisiert zu sein (s. Anhang 8.10).

Zusätzlich zur C-terminalen GFP-Fusion wurde auch die Lokalisation von PSAT1/ERP1 und *erp1-3* mit N-terminaler YFP-Fusion untersucht. Hierfür wurde die kodierende Region von *PSAT1/ERP1* und des verkürzten *erp1-3*-Allels in den Vektor pEARLEY104 kloniert und transient in Arabidopsis-Protoplasten und Tabak-Epidermiszellen exprimiert. Die YFP-Fluoreszenz beider Fusionsproteine wurde vor allem im Zytoplasma detektiert, nur vereinzelt wurde eine Assoziation mit sphärischen Strukturen beobachtet (s. Anhang 8.10). N-terminal fusioniertes YFP scheint demnach die Lokalisation von PSAT1/ERP1 zu verändern, was auf das Vorhandensein eines N-terminalen Lokalisationssignals hinweisen könnte.

Transgene Arabidopsis-Pflanzen, welche PSAT1/ERP1 und *erp1-3* mit N-terminaler YFP-Fusion exprimieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht erzeugt. Um die Bedeutung des N-Terminus‘ für die Lokalisation von PSAT1 zu verifizieren, sollte dies nachgeholt werden.

Durch Nilrotfärbung sollte zum einen die Akkumulation neutraler Lipide und zum anderen eine mögliche Assoziation von PSAT1/ERP1 mit Lipidtröpfchen überprüft werden. In PSAT1/ERP1-GFP-exprimierenden *gll*- und *erp1-3*-Pflanzen konnte Nilrotfluoreszenz in sphärischen Strukturen detektiert werden (Abbildung 3-15). Das Sterol-Profil transgener *erp1-3*-Pflanzen wurde bisher nicht untersucht, würde aber Aufschluss darüber geben, ob die Überexpression von PSAT1/ERP1-GFP zu WT-ähnlichen SE-Mengen und somit zum WT-ähnlichen Nilrot-Phänoyp in *erp1*-Mutanten führt. In transgenen *erp1-3*-Pflanzen, die das verkürzte *erp1-3*-GFP-Fusionsprotein exprimieren, konnten keine Nilrot-gefärbten Strukturen beobachtet werden (Abbildung 3-15). In transgenen *erp1-3*-GFP-exprimierenden *gll*-Pflanzen schien die Bildung von Lipidtröpfchen vermindert zu sein (Abbildung 3-15). Die CLSM-Aufnahmen in Abbildung 3-15 zeigen außerdem, dass die GFP-Fluoreszenz von PSAT1/ERP1-GFP und die Nilrot-Fluoreszenz nicht überlappen, was darauf hindeutet, dass PSAT1/ERP1 nicht mit Lipidtröpfchen assoziiert ist.

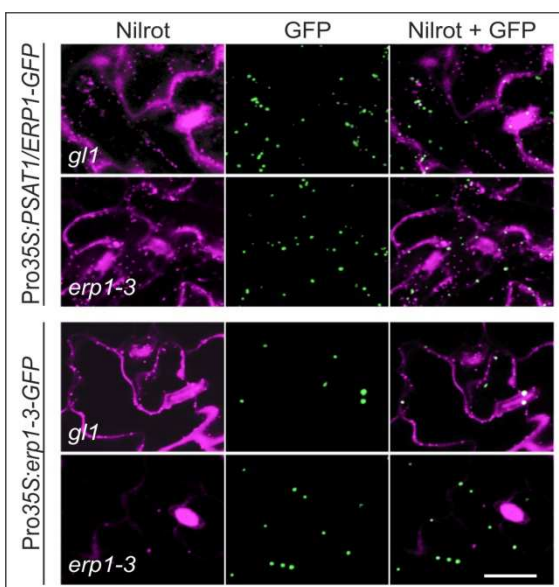


Abbildung 3-15. PSAT1/ERP1-GFP ist nicht mit zytosolischen Lipidtröpfchen assoziiert

Konfokale Laserscanning-Mikroskopie zur Analyse der subzellulären Lokalisation von PSAT1/ERP1-GFP (oben) und *erp1-3*-GFP (unten) in Nilrot-gefärbten Blattpräparaten transgener *gll*- und *erp1-3*-Pflanzen. Die Fluoreszenz von GFP und Nilrot wurde mit Licht der Wellenlänge 488nm angeregt und bei 490-530 nm bzw. 550-600 nm detektiert. Für jede transgene Pflanze ist die Nilrot- (magenta) und die GFP-Fluoreszenz (grün) in Blattepidermiszellen eines repräsentativen Ausschnitts gezeigt sowie die Überlagerung beider Kanäle (Nilrot + GFP). Maßstab = 10 µm

3.5.2 KOLOKALISATIONSSTUDIEN NACH TRANSIENTER EXPRESSION IN TABAK

Die GFP-Fluoreszenz von ERP1-GFP wurde in runden zytoplasmatischen Strukturen beobachtet, bei denen es sich offenbar nicht um Lipidtröpfchen handelt. Um die Identität der Zellstrukturen, in denen ERP1-GFP lokalisiert ist, aufzuklären, wurde die Lokalisation von ERP1-GFP mit der Lokalisation fluoreszierender Organellmarker nach transienter Expression in Tabak verglichen. Da Peroxisomen kleine runde Organellen darstellen und auch die Cisternen des Golgi-Apparates je nach Orientierung rund erscheinen, sollte die Kolokalisation mit diesen Organellen überprüft werden. Dafür wurden die in Nelson et al. (2007) beschriebenen Marker px-rk (Peroxisomen, rote Fluoreszenz, Kanamycinresistenz) und g-rk (Golgi, rote Fluoreszenz, Kanamycinresistenz) verwendet.

Die CLSM-Aufnahmen der Abbildung 3-16 zeigen, dass keine Überlappung der grünen Fluoreszenz von ERP1-GFP mit der roten Fluoreszenz der Organellmarker zu beobachten war. ERP1-GFP ist offenbar nicht in Peroxisomen oder dem Golgi-Apparat lokalisiert.

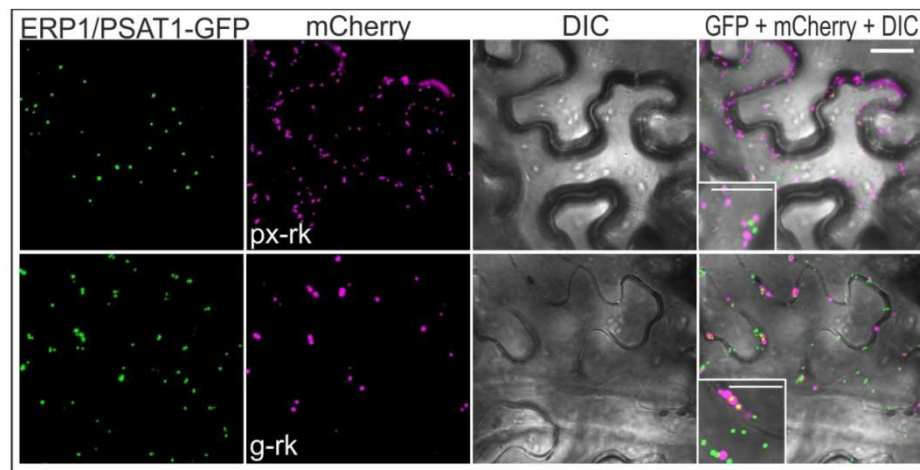


Abbildung 3-16. PSAT1/ERP1-GFP ist nicht in Peroxisomen oder dem Golgi-Apparat lokalisiert

Konfokale Laserscan-Mikroskopie zur Überprüfung der Kolokalisation von PSAT1/ERP1-GFP mit dem Peroxisomen-Markerprotein px-rk (oben) und dem Golgi-Markerprotein g-rk (unten) in transient transformierten Epidermiszellen von *N. benthamiana*. Die mCherry-Fluoreszenz der Markerproteine wurde durch Licht der Wellenlänge 561 nm angeregt und die GFP-Fluoreszenz durch Licht der Wellenlänge 488 nm. Die GFP-Emmission wurde bei 490-530nm detektiert und die mCherry-Fluoreszenz bei 585-645nm. Repräsentativ dargestellt ist die GFP- (grün) und die mCherry- (magenta) Fluoreszenz der im Durchlicht gezeigten Epidermiszellen (DIC), sowie die Überlagerung aller Kanäle (GFP + mCherry + DIC). Maßstab = 10 µm

3.6 UNTERSUCHUNG ZUSÄTZLICHER KOMPONENTEN DER RESISTENZ GEGEN *P.*

INFESTANS

Wie in den Abschnitten 3.1.2 und 3.2.2 näher erläutert wurde, ist der *erp1*-spezifische Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation durch eine verstärkte Zelltodreaktion und deregulierte Callose-Ablagerungen im Mesophyll charakterisiert. Um Hinweise auf die molekularen Mechanismen dieser Resistenzreaktion zu erhalten, wurden Resistenzkomponenten untersucht, die in der Literatur im Zusammenhang mit der Ausprägung einer HR oder der Pathogen-induzierten Callose-Akkumulation beschrieben wurden.

3.6.1 PATHOGENESIS RELATED (PR)-GENE

Die durch Pathogenerkennung induzierten Abwehrantworten gehen u.a. mit einer Veränderung der Expression von *PR*-Genen einher (Schlauch et al. 2002, Durner et al. 2008). Zelluläre Abwehrreaktion von Arabidopsis gegen *P. infestans* sind u.a. mit der Aktivierung der Expression von *PR1* und *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN 1.2*) verbunden (Huitema et al. 2003). *PR1* ist ein Markergen für die SA-vermittelte Abwehr, wohingegen die Induktion der *PDF1.2*-Expression durch JA und ET erfolgt (Glazebrook 1999). SA- und JA/ET-Signalwege wirken häufig antagonistisch, es kommt aber auch zu Überlappungen. So sind zum Beispiel die spontanen HR-ähnlichen Nekrosen der Mutante *acd2* (*accelerated cell death*) durch konstitutive *PR1*- und *PDF1.2*-Expression und erhöhte SA- und JA-Mengen charakterisiert (Greenberg et al. 1994, Penninckx et al. 1996).

Um zu untersuchen, ob der HR-Phänotyp der *erp1*-Mutanten mit einer veränderten Expression von Abwehrgenen korreliert, wurde die Transkriptakkumulation von *PR1* und *PDF1.2* in *erp1*-, *pen2*- und *gll*-Pflanzen über einen Zeitraum von 48h beobachtet. Nach Behandlung der Pflanzen mit *P. infestans* oder Wasser wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Blattmaterial geerntet, Gesamt-RNA isoliert und eine Northern-Blot-Analyse mit spezifischen *PR1*- und *PDF1.2*-Sonden durchgeführt. In Wasser-behandelten Pflanzen konnte weder *PR1*- noch *PDF1.2*-Transkript nachgewiesen werden (s. Abbildung 3-17). Keine der untersuchten Pflanzenlinien weist demnach eine konstitutive Expression dieser *PR*-Gene auf.

Für *gll* konnte innerhalb des Untersuchungszeitraums auch nach *P. infestans*-Behandlung kein *PR1*-Transkript detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurde in *pen2*, *pen2erp1-3* und den *erp1*-Einzelmutanten (*erp1-2* und *erp1-3*) eine erhöhte Transkriptakkumulation von *PR1* nach Inokulation mit *P. infestans* beobachtet (s. Abbildung 3-17). Die Expression von *PR1* in *pen2* und *pen2erp1-3* wird in einem Zeitraum zwischen 6 und 12h aktiviert und bleibt über den untersuchten Zeitraum anhaltend, was zu einer zunehmenden Transkriptakkumulation führt. Im Vergleich dazu erschien die *P. infestans*-induzierte Akkumulation des *PR1*-Transkripts in den *erp1*-Einzelmutanten verzögert und schwächer.

In Bezug auf *PDF1.2* wurde in allen Linien, mit Ausnahme von *pen2erp1-3*, zwischen 6 und 12 Stunden nach *P. infestans*-Behandlung eine erhöhte Transkriptakkumulation detektiert. Für die *pen2erp1-3*-Doppelmutante konnte bereits 6h nach Inokulation eine deutliche Transkriptakkumulation von *PDF1.2* beobachtet werden, was auf eine frühere Aktivierung der Genexpression im Vergleich zu den anderen untersuchten Linien hinweist. Die *PDF1.2*-Transkriptakkumulation nach *P. infestans*-Behandlung verlief in allen Linien im untersuchten Zeitraum transient. Im Vergleich zu *gll* und den *erp1*-Einzelmutanten schien die Transkriptakkumulation in *pen2* und *pen2erp1-3* stärker zu sein und war auch 48 h nach Pathogenbehandlung noch detektierbar. Die stärkste Transkriptakkumulation konnte in *pen2* nach 24h und in *pen2erp1-3* nach 12h detektiert werden. In *gll*, *erp1-2* und *erp1-3* wurde 12h nach Behandlung die höchste *PDF1.2*-Transkriptmenge detektiert, nach 48h war jedoch kein bzw. kaum Transkript nachweisbar.

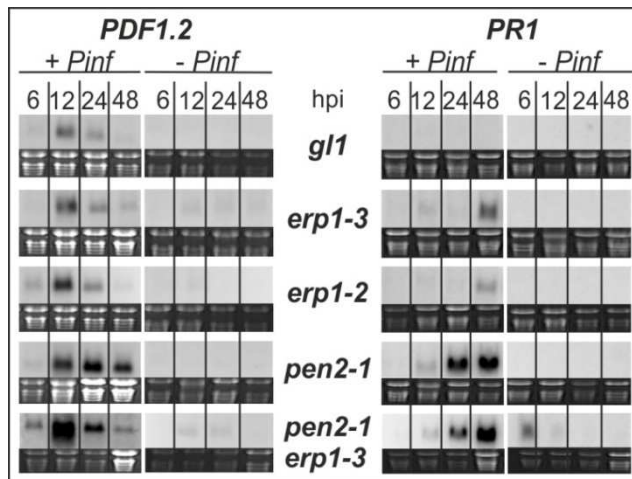


Abbildung 3-17. Keine erhöhte *PDF1.2*- und *PR1*-Transkriptakkumulation in *P. infestans*-behandelten und -unbehandelten *erp1*-Mutanten.

Nothern-Blot-Analyse zur Untersuchung der Expression der Markergene *PR1* und *PDF1.2* in *g11*-, *erp1-3*-, *erp1-2*-, *pen2*- und *pen2erp1-3*-Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, 24 und 48 hpi) nach Behandlung mit *P. infestans* (5×10^5 Sporen ml^{-1}). Gesamt-RNA wurde aus Blättern *P. infestans*- (+*Pinf*) und Wasser-behandelter (-*Pinf*) Pflanzen isoliert. Visualisierung des Transkripts erfolgte mit radioaktiv markierten *PDF1.2*- (links) und *PR1*-Sonden (rechts). Ethidiumbromid Färbung der rRNA dient als Ladekontrolle. Der gezeigte Northern Blot ist repräsentativ für 2 Experimente mit ähnlichem Ergebnis.

Aus den Analysen der Expression von *PR*-Genen wird ersichtlich, dass die Mutation in *pen2* zu einer verstärkten Expression von *PR1* und *PDF1.2* nach *P. infestans*-Behandlung führt, während die *erp1*-Mutation die Expression dieser Abwehrgene kaum beeinflusst. Die stärkere HR von *pen2erp1* im Vergleich zu *pen2* spiegelt sich nicht in einer deutlich stärkeren oder konstitutiven Expression der untersuchten Abwehrgene wieder. Ein synergistischer Effekt beider Mutationen ist dennoch nicht auszuschließen und sollte mit sensibleren Detektionsmethoden und bzw. oder weniger *P. infestans*-Sporen überprüft werden. Generell scheint das Auftreten und die Stärke der HR nach *P. infestans*-Behandlung mit der Induktion SA-abhängiger Abwehrreaktionen zu korrelieren.

3.6.2 *POWDERY MILDEW RESISTANCE 4 (PMR4)*

Das Gen *PMR4* kodiert die Callosesynthase *GSL5* (*GLUCAN SYNTHASE LIKE*), welche in der Stress-induzierten Callosesynthase von Bedeutung ist (Jacobs et al. 2003, Nishimura et al. 2003). Die Bezeichnung *powdery mildew resistance* geht auf die erhöhte Resistenz der *pmr4*-Mutanten gegen biotrophe Mehlaupilze zurück. In *pmr4*-Mutanten werden an Penetrationsstellen Papillen ausgebildet, jedoch enthalten diese keine Callose (Jacobs et al. 2003, Nishimura et al. 2003).

Ein spezifischer *erp1*-Phänotyp ist die Akkumulation großer Mengen von Callose im Mesophyll, die nicht konstitutiv ist, sondern durch *P. infestans* induziert wird (s. 3.1.2). Da die Callosesynthase *PMR4/GSL5* als Hauptenzym der Pathogen-induzierten Callose-Synthese beschrieben wurde, sollte ihre Bedeutung für die *erp1*-spezifische Callose-Deposition untersucht werden.

Nach Kreuzung von *pmr4-1* mit *pen2erp1-3* wurden mit Hilfe Allel-spezifischer CAPS-Marker für *pen2*, *erp1-3* und *pmr4-1* (s. Anhang 8.1) aus der F2-Generation *pmr4pen2*, *pmr4erp1* und *pmr4pen2erp1*-Mutanten selektiert. *pmr4erp1* und *pmr4pen2erp1* wiesen pleiotrope Phänotypen in Form von reduziertem Wachstum und der Bildung von Chlorosen auf älteren Blättern auf (s. Abbildung 3-18 E). Die reduzierte Blattgröße scheint mit einer im Vergleich zu *pmr4*, *erp1-3* und *pen2* reduzierten Zellgröße zu korrelieren (Abbildung 3-18 B).

Neben der Pathogen-induzierten Akkumulation von Callose ist auch die Wund-induzierte Callosesynthese von PMR4/GSL5 abhängig (Vogel und Somerville 2000, Nishimura et al. 2003). Um den Verlust der PMR4/GSL5-Aktivität für die selektierten Mutanten zu verifizieren, wurden Blätter durch Anritzen mit einer Rasierklinge verwundet und anschließend einer Anilinblau-Färbung unterzogen. Anilinblaufluoreszenz im Bereich der Einschnittstelle trat bei *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* auf, nicht aber bei *pmr4-1*, *pmr4pen2*, *pmr4erp1-3* und *pmr4pen2erp1-3* (Abbildung 3-18 A). Demnach sind alle Linien mit *pmr4-1*-Mutation nicht in der Lage, im Rahmen der Wundantwort Callose zu synthetisieren.

Die Behandlung von *pmr4erp1-3* und *pmr4pen2erp1-3* mit *P. infestans* führte zur Deposition von Callose in Epidermis- und Mesophyllzellen, was bei *pmr4-1* und *pmr4pen2* nicht beobachtet worden war (Abbildung 3-18 B-D). In *pmr4-1* und *pmr4pen2* war nach *P. infestans*-Behandlung neben der Autofluoreszenz toter Zellen lediglich eine schwache punktuelle Anilinblaufluoreszenz erkennbar (Abbildung 3-18 D, Pfeile), die vermutlich von Callose-haltigen *P. infestans*-Appressorien ausgeht. Im Bereich der Inokulationsstelle wurden in der Epidermis von *pmr4-1*, *pmr4pen2*, *pmr4erp1-3* und *pmr4pen2erp1-3* Papillen gebildet (Daten nicht gezeigt), Anilinblaufluoreszenz zeigten jedoch nur die *pmr4erp1-3*- und *pmr4pen2erp1-3*-Papillen (Abbildung 3-18 D). Die HR penetrierter Epidermiszellen geht in *pen2*, *pen2erp1-3* und z.T. auch in *erp1-3* häufig mit der Akkumulation von Callose entlang der Zellgrenze der abgestorbenen Zelle einher (Abbildung 3-18 D). Diese Form der Zellbegrenzung durch Callose trat bei *pmr4erp1-3* oder *pmr4pen2erp1-3* nicht auf. Die Callose-Ablagerungen im Mesophyll von *pmr4erp1-3* und *pmr4pen2erp1-3* scheinen im Vergleich zu *erp1-3* und *pen2erp1-3* kleiner zu sein, was möglicherweise auf die reduzierte Größe der Mesophyllzellen zurückzuführen ist (Abbildung 3-18 B,C).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass im Gegensatz zu *pmr4-1* und *pen2pmr4-1* der Verlust der PMR4/GSL5-Aktivität im *erp1-3*- und *pen2erp1-3*-Hintergrund nicht zum Verlust der *P. infestans*-induzierten Callose-Akkumulation führt. Dementsprechend scheint die *erp1*-spezifische Callose-Deposition unabhängig von PMR4/GSL5 zu sein.

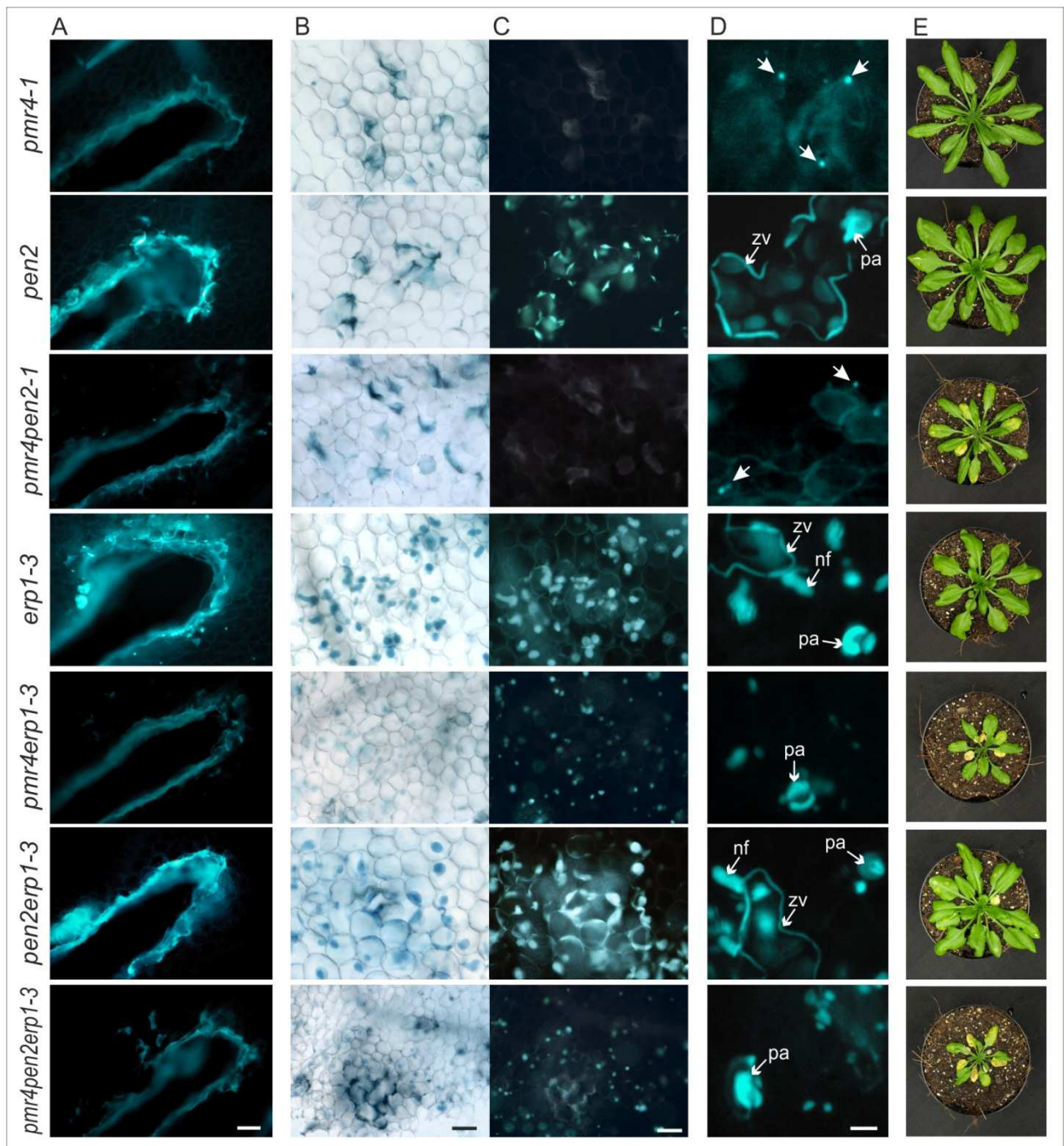


Abbildung 3-18. *GSL5/PMR4* ist essentiell für die Wund-induzierte, aber nicht für die *P. infestans*-induzierte Callose-Deposition in *erp1*-Pflanzen

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Anilinblau-gefärbter Blätter der aufgeführten Arabidopsis-Linien nach Verwundung. Die Anilinblau-Färbung erfolgte 24 h nach Verwundung der Blattspreiten mit einer Rasierklinge. Maßstab = 100 μm

(B) Hellfeld- und (C, D) fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 3 Tage nach *P. infestans*-Behandlung (5×10^5 Sporen ml^{-1}) mit Trypanblau-Anilinblau-gefärbten Blättern. Gezeigt sind Hellfeld-Aufnahmen (B) und die Anilinblaufluoreszenz unter UV-Licht Anregung (C) der im Hellfeld abgebildeten Mesophyllzellen. Maßstab = 50 μm

(D) Callose-Depositionen als Reaktion auf versuchte Penetration in Epidermiszellen in großer Vergrößerung (Maßstab = 20 μm). Die Pfeile mit den großen Köpfen markieren die punktuelle Anilinblaufluoreszenz in *pmr4-1* und *pmr4pen2*. Die anderen Pfeile weisen auf Papillen (Pa), Zellwandverstärkungen (Zv) oder nasenförmige Calloseauflagerungen (nf) hin. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder aus 3 Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

(E) Morphologie der jeweiligen Mutanten. Die fotografierten Pflanzen sind 5 Wochen alt.

3.6.3 *PHYTOPHTHORA* ELICITIN INFESTIN 1 (INF1)

Phytopathogene *Phytophthora*-Arten sekretieren Elicitine, um Sterolverbindungen aus den Membranen der Wirtspflanze zu beziehen (s. 1.3). Die Erkennung von Elicitinen durch die Pflanze geht mit der Aktivierung der pflanzlichen Abwehrantwort und zum Teil mit Zelltod einher. In Tabak induziert das *P. infestans*-Elicitin INF1 durch Bindung an eine Lektin-ähnliche Rezeptor-Kinase (LRK) eine HR (Kanzaki et al. 2008). Obwohl in Arabidopsis Proteine mit hoher Sequenzähnlichkeit zu der LRK aus Tabak identifiziert wurden, wird durch eine Elicitin-Behandlung keine HR induziert (Takemoto et al. 2005).

PSAT1/ERP1 ist in die Regulation der Sterolhomöostase in Blättern involviert (s. 3.4). Da in *erp1*-Mutanten die stark reduzierten Mengen acylierter Sterole mit einem Anstieg glycosylierter und freier Sterole im Blatt korrelieren (s. 3.4), könnte die Lebensfähigkeit von *P. infestans* aufgrund der erhöhten Menge an Membransterolen begünstigt sein und so zu dem *erp1*-Nichtwirtsresistenz-Phänotyp führen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Resistenzreaktion der *erp1*-Mutanten gegen ein *INF1*-defizientes *P. infestans*-Isolat analysiert (311 *inf1*, Ah-Fong et al. 2008), das freundlicherweise von H. S. Judelson (*University of California, Riverside, USA*) zur Verfügung gestellt wurde.

Die stark verminderte *INF1*-Transkriptakkumulation des Isolats 311 im Vergleich zu den *INF1*-exprimierenden Isolaten Cra208m2 und 1360 konnte in infizierten Kartoffelblättern verifiziert werden (Abbildung 3-19 A). Alle drei *P. infestans*-Isolate führten zu einer vergleichbaren Infektion der suszeptiblen Kartoffelsorte Désirée. Makroskopisch konnte keine veränderte Virulenz des *INF1*-defizienten *P. infestans*-Stamms beobachtet werden (Abbildung 3-19 A).

Die Infektion von Arabidopsis mit den drei verschiedenen *P. infestans*-Stämmen führte innerhalb eines Genotyps zu ähnlichen Abwehrantworten, es konnten keine Unterschiede in Abhängigkeit von der *INF1*-Expression beobachtet werden. Sowohl die Behandlung mit den *INF1*-exprimierenden Stämmen Cra208m2 und 1360 als auch die Inokulation mit dem *INF1*-defizienten Isolat 311 führte zu einer stärkeren HR von *pen2* im Vergleich zu *gll* bzw. von *pen2erp1-3* im Vergleich zu *erp1-3* (Abbildung 3-19 B). Die im Vergleich zu *pen2* schwächere, aber gegenüber *gll* stärkere HR der *erp1*-Einzelmutanten führte bei allen drei Stämmen zu einer vergleichbaren Intensität der Trypanblaufärbung. Der Verlust der *INF1*-Expression bedingt demnach keine Veränderung der makroskopisch sichtbaren Abwehrreaktion der getesteten Genotypen. In mikroskopischen Analysen konnten auch auf zellulärer Ebene keine Unterschiede in der Abwehrantwort gegen den *inf1*-Stamm und die *INF1*⁺-Isolate festgestellt werden. Wie exemplarisch für *pen2erp1-3* in Abbildung 3-19 B gezeigt ist, wurde die *erp1*-spezifische Deposition von Callose im Mesophyll unabhängig von der *INF1*-Expression durch *P. infestans* induziert.

INF1 scheint für die Entstehung des Phänotyps von *erp1* keine Rolle zu spielen oder redundante Sterol-Carrier-Proteine übernehmen die Funktion von INF1 bei der Aufnahme pflanzlicher Sterole. Die Frage, ob die veränderte Nichtwirtsresistenzreaktion der *erp1*-Mutanten mit einer veränderten

Verfügbarkeit freier Sterole für *P. infestans* zusammenhängt, konnte durch die hier dargestellten Experimente und im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

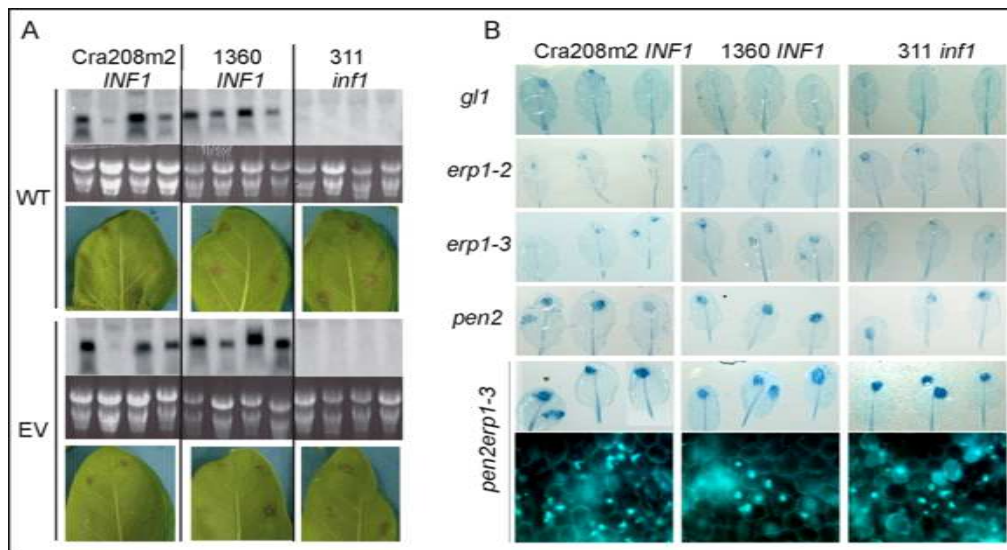


Abbildung 3-19. Die Expression von Infestin 1 (INF1) durch *P. infestans* beeinflusst weder die Wirtsinteraktion mit Kartoffel noch die Nichtwirtsinteraktion mit Arabidopsis

(A) Aufnahmen des Infektionsphänotyps der *P. infestans*-Isolate Cra208m2, 1360 und 311 in Kartoffel und Northern-Blot-Analyse der *INF1*-Expression. Die Infektion von Wildtyp (WT) und Leervektor-tragenden transgenen Kartoffel-Linien (EV) erfolgte mit 1×10^5 Sporen ml^{-1} . 3 Tage nach Inokulation wurden die Blätter fotografiert und die infizierten Blattbereiche zur Isolierung von Gesamt-RNA ausgestanzt. Die Northern-Blot-Analyse erfolgte mit 20 μg RNA und einer *INF1*-genspezifischen radioaktiv-markierten Sonde. Die Ethidiumbromid-Färbung des Gels diente als Ladekontrolle (rRNA).

(B) Resistenzreaktion von *gl1*, *erp1-2*, *erp1-3*, *pen2* und *pen2erp1-3* gegenüber den *P. infestans*-Isolaten Cra208m2, 1360 und 311. Für jeden Genotyp sind jeweils 3 repräsentative Trypanblau-gefärbte Blätter gezeigt und für *pen2erp1-3* zusätzlich fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Anilinblau-gefärbter Blattpräparate nach UV-Licht Anregung. *P. infestans*-inokulierte (5×10^5 Sporen ml^{-1}) Blätter wurden nach 3-tägiger Inkubation einer Trypanblau-Färbung unterzogen und nach Entfärbung in Chloralhydrat fotografiert.

3.7 REAKTION VON *erp1*-MUTANTEN AUF WEITERE PATHOGENE

Während einige Komponenten der pflanzlichen Abwehr in Pathogen-spezifische Resistenzmechanismen involviert sind, tragen Andere zur Aufrechterhaltung der Resistenz gegen ein breiteres Pathogen-Spektrum bei. So vermittelt z.B. *PEN2* die Penetrationsresistenz gegen biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pathogene, während *PEN1* spezifisch in der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen nicht-adaptierte Mehltau-Spezies fungiert (Lipka et al. 2005). Um zu untersuchen, ob die Funktion von *PSATI/ERP1* auf die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *P. infestans* begrenzt ist oder aber auch in Interaktionen mit anderen Pathogenen eine Rolle spielt, wurden die *erp1*-Mutanten mit weiteren Pathogenen getestet. Die Experimente mit adaptierten und nicht-adaptierten Mehltau- bzw. Anthracnose-Pathogenen wurden durch R. Fuchs in Kooperation mit V. Lipka (Georg-August Universität, Göttingen) durchgeführt. Die *P. syringae*-Stämme zur Analyse des Wachstums virulenter, avirulenter und nicht-adaptierter Bakterien auf *erp1*-Mutanten wurden freundlicherweise von Justin Lee (IPB, Halle) zur Verfügung gestellt.

3.7.1 NICHT-ADAPTIERTE PILZLICHE PATHOGENE

Im Hinblick auf die Bedeutung von *PSATI/ERP1* für die Interaktion mit anderen Nichtwirts-Pathogenen neben *P. infestans* wurden die *erp1*-Mutanten mit dem biotrophen Gersten-Mehltau *Bgh* bzw. dem hemibiotrophen Gurkenanthracnose-Erreger *C. lagenarium* (synonym *C. orbiculare*) behandelt. Die Beurteilung des Phänotyps erfolgte 9 Tage nach Inokulation im Vergleich zu den Kontroll-Linien Col-0, *g11* und *pen2*.

Nach Behandlung mit *C. lagenarium*-Konidiosporen konnte für keine Linie die Ausbildung makroskopischer Nekrosen auf den inokulierten Blättern beobachtet werden (Abbildung 3-20 A). Demnach ist die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *C. lagenarium* unabhängig von *PEN2*, was mit den Daten von Shimada et al. (2006) und Hiruma et al. (2010) übereinstimmt. Auch *PSATI/ERP1* scheint keine essentielle Funktion in der Aufrechterhaltung dieser Nichtwirtsresistenz zu haben. Aus der Literatur ist bekannt, dass in Epidermiszellen von Col-0 und *pen2* eine *PMR4/GSL5*-abhängige Akkumulation von Callose unterhalb von *Colletotrichum*-Appressorien stattfindet (Shimada et al. 2006, Hiruma et al. 2010). Da im Rahmen der Kooperation die Resistenzreaktion gegen *C. lagenarium* nur makroskopisch betrachtet wurde, ist keine Aussage über die zelluläre Abwehrreaktion der *erp1*-Mutanten möglich.

Die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgh* scheint durch die Mutation in *ERP1* verändert zu sein: Während bei Col-0 und *g11* nach neun Tagen keine Chlorosen oder Nekrosen auf den Blättern beobachtet worden waren, bildeten sich auf infizierten Blättern von *erp1-2* und *erp1-3* chlorotische Flecken (Abbildung 3-20 C). Obwohl die Penetrationsresistenz von *pen2* gegenüber *Bgh* herabgesetzt ist, was sich in einem Anstieg des Penetrationserfolgs und einer HR-ähnlichen Zelltodreaktion der penetrierten Epidermiszellen äußert (Abbildung 3-20 B; Lipka et al. 2005), wurden keine Chlorosen oder Nekrosen auf infizierten *pen2*-Blättern beobachtet (Abbildung 3-20 C). Im Gegensatz dazu ließen sich auf Blättern von *pen2erp1-3* neun Tage nach Behandlung stark chlorotische Bereiche feststellen (Abbildung 3-20 C). Die Chlorosen waren offenbar eine Folge von Zelltod im Mesophyll, was bei *pen2* nur selten zu beobachten war (persönliche Kommunikation R. Fuchs). Die kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung infizierter Blätter (6 dpi) und anschließende Fluoreszenzmikroskopie ermöglichte die Detektion Callose-haltiger Strukturen im Mesophyll von *erp1-3* und *pen2erp1-3*, aber nicht bei *g11* und *pen2* (Abbildung 3-20 D). Wie bereits für die Interaktion mit *P. infestans* beobachtet worden war, ist auch bei der Interaktion mit *Bgh* der *erp1*-spezifische Zelltod mit der Deposition Callose-haltiger Strukturen im Mesophyll verbunden. Im Gegensatz zu den nach 6 bis 9 Tagen sichtbaren Unterschieden war die nach 48 Stunden ermittelte Penetrationsrate von *Bgh* und die Anzahl toter Epidermiszellen an Interaktionsstellen in den *erp1*-Einzelmutanten und in *pen2erp1-3* im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen bzw. zu *pen2* nicht erhöht (Abbildung 3-20 B). Die verstärkte Zelltod-Reaktion der *erp1*-Mutanten nach *Bgh*-Behandlung prägte sich demnach erst in späteren Phasen der Interaktion aus.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen geht hervor, dass *PSATI/ERP1* nicht nur für die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegen *P. infestans*, sondern auch gegenüber *Bgh* von Bedeutung ist. Wie *PEN2*, scheint auch *PSATI/ERP1* keine Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen *C. lagenarium* zu haben.

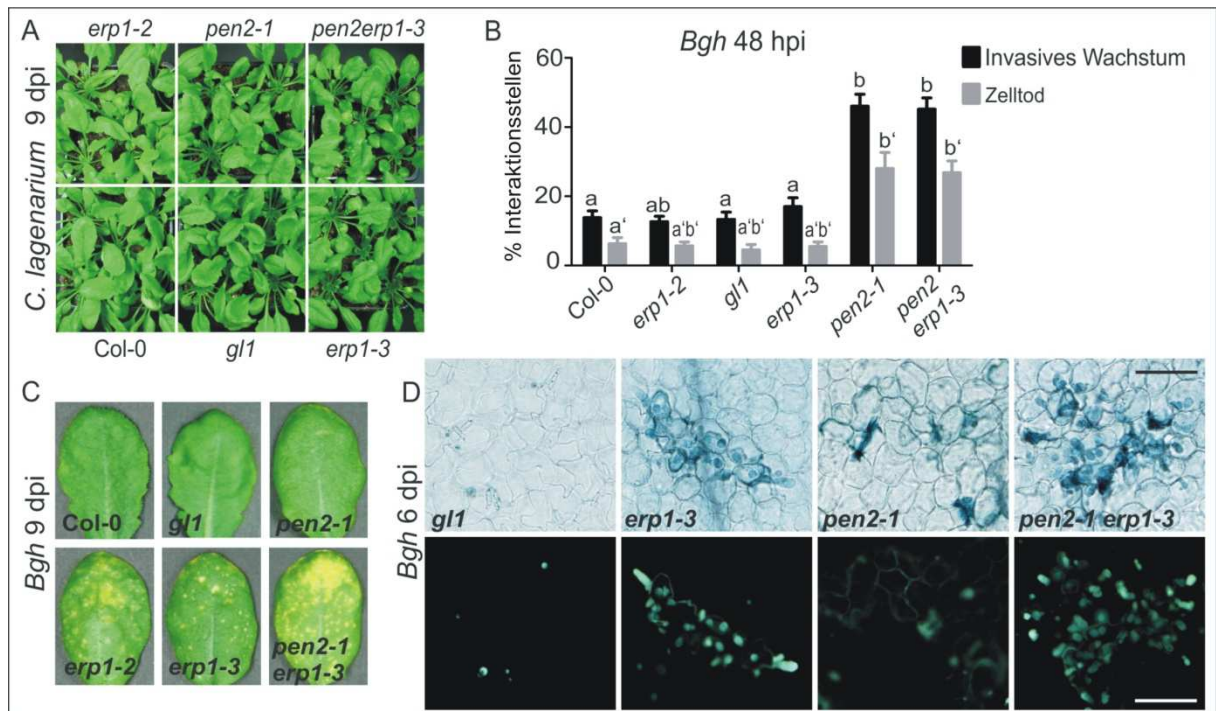


Abbildung 3-20. Effekt von Mutationen in *ERP1* auf die Nichtwirtsresistenz gegen *Bgh* und *C. lagenarium*. (A) Repräsentative Aufnahmen des makroskopischen Nichtwirtsresistenz-Phänotyps gegen *C. lagenarium*. 4-5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Konidiosporen-Lösung besprüht (1×10^6 Sporen ml^{-1}) und nach 9-tägiger Inkubation fotografiert. Zwei unabhängige Experimente führten zu einem ähnlichen Ergebnis. (B-D) Nichtwirtsresistenz-Phänotyp von Col-0, *gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3*, *erp1-2* und *erp1-3* gegen *Bgh*. Die Inokulation 4-5 Wochen alter Pflanzen erfolgte mit *Bgh* Sporen, die auf Gerstenpflanzen kultiviert wurden. (B) Quantifizierung des Penetrationserfolgs von *Bgh*, 48 Stunden nach Inokulation (48 hpi). Dargestellt ist die Häufigkeit der erfolgreichen Penetration, wobei die schwarzen Balken das invasive Wachstum in Epidermiszellen angeben und die grauen Balken den Anteil penetrierter toter Zellen. In zwei unabhängigen Experimenten wurden jeweils 100 Interaktionsstellen bewertet, wobei die Autofluoreszenz als Indikator für die Zelltodreaktion diente. (C) Repräsentative Aufnahmen des makroskopischen Nichtwirtsresistenz-Phänotyps auf Blättern, 9 Tage nach Inokulation (9 dpi). Zwei unabhängige Experimente führten zu einem ähnlichen Ergebnis. (D) Hellfeld (oben)- und fluoreszenzmikroskopische (unten) Aufnahmen von Mesophyllzellen im Bereich der Interaktionsstellen mit *Bgh*, 6 Tage nach Inokulation. Infizierte Blätter wurden einer kombinierten Trypanblau-Anilinblau-Färbung unterzogen. Die Bilder repräsentieren das Ergebnis eines Vorexperimentes.

3.7.2 ADAPTIERTE PILZLICHE PATHOGENE

Komponenten der Nichtwirtsresistenz fungieren z. T. auch in der basalen Resistenz gegenüber adaptierten Phytopathogenen. So wurde z.B. gezeigt, dass *PEN2* und *PEN3* zur basalen präinvasiven Resistenz von Arabidopsis gegenüber dem Anthracnose-Pathogen *C. higginsianum* (Huser et al. 2009) und den Mehltau-Pilzen *G. cichoracearum* und *Golovinomyces orontii* beitragen (Lipka et al. 2005). Um zu untersuchen, ob *PSATI/ERP1* in die basale Resistenz von Arabidopsis involviert ist, wurden die Infektionsphänotypen von *C. higginsianum*, *G. cruciferarum* und *G. cichoracearum* auf *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen analysiert.

Die Infektion mit *C. higginsianum* führte innerhalb von 9 Tagen zur Ausprägung kleiner nekrotischer Flecken bei Col-0 und *gl1*, die bei *pen2* und *erp1-3* deutlich stärker ausgeprägt waren und bei *erp1-2* und *pen2erp1-3* von starken Blattchlorosen begleitet wurden (Abbildung 3-21 A). Die Infektion wurde in einem Vorexperiment auch mikroskopisch nach Anilinblaufärbung untersucht, wobei für *erp1-3* und *pen2erp1-3* Callose-haltige Strukturen in Mesophyllzellen beobachtet wurden, für *gl1* und *pen2* hingegen nicht (Abbildung 3-21 B). Da keine kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung durchgeführt wurde, ist keine Aussage über die Korrelation von Callose-Deposition und Zelltod möglich, jedoch weisen die deutlichen Nekrosen und Chlorosen von *pen2* und den *erp1*-Mutanten auf Zelltod hin.

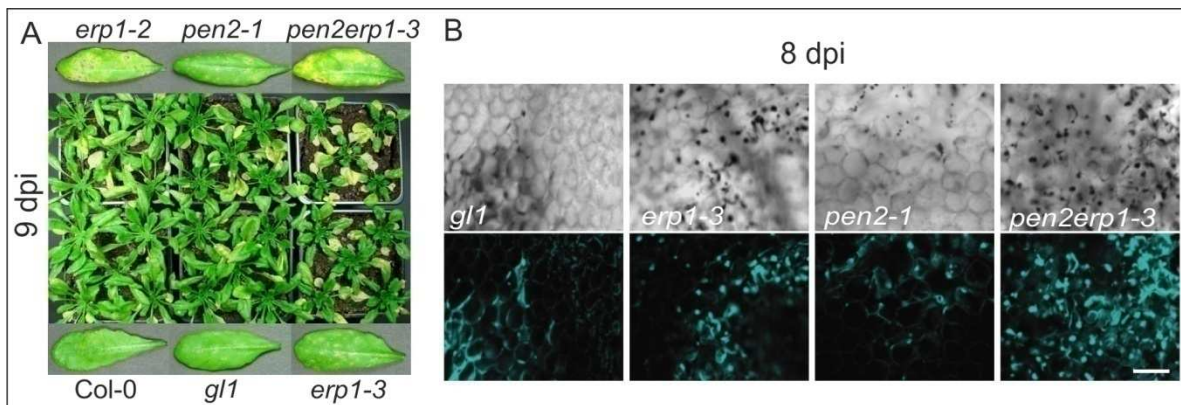


Abbildung 3-21. Effekt von Mutationen in *ERP1* auf die Anfälligkeit gegenüber *C. higginsianum*.

4-5 Wochen alte Pflanzen wurden mit einer Konidiosporen-Lösung besprüht (1×10^6 Sporen ml^{-1}).

(A) Aufnahmen des makroskopischen Infektionsphänotyps. 9 Tage nach Infektion wurden Pflanzen und einzelne Blätter fotografiert. Zwei unabhängige Experimente führten zu einem ähnlichen Ergebnis.

(B) Hellfeld (oben)- und fluoreszenzmikroskopische (unten) Aufnahmen von Mesophyllzellen infizierter Blattbereiche 8 Tage nach Inokulation. Infizierte Blätter wurden einer Anilinblau-Färbung unterzogen. Die Bilder repräsentieren das Ergebnis eines Vorexperimentes.

Die beiden Mehltau-Pilze *G. cruciferarum* und *G. cichoracearum* können unter kontrollierten Laborbedingungen Arabidopsis infizieren und ihren Lebenszyklus vollenden, wobei *G. cruciferarum* im Vergleich zu anderen adaptierten Mehltau-Pilzen auf Arabidopsis relativ wenig sporuliert (Micali et al. 2008). Die Mehltau-Pilze sind aufgrund ihrer biotrophen Lebensweise auf lebende Wirtszellen angewiesen, dementsprechend ist ein invasives Wachstum nicht mit Zelltod assoziiert. Die Infektion von suszeptiblen Arabidopsis Wildtyp-Pflanzen (z.B. Col-0 oder Ler) mit *G. cruciferarum* bzw. *G. cichoracearum* führt nicht zu sichtbaren Reaktionen, wie Chlorosen oder Nekrosen, und mikroskopisch kann lediglich die Bildung von Papillen an Penetrationsstellen beobachtet werden (Adam und Somerville 1996, Xiao et al. 1997).

Die *erp1*-Mutanten waren gegenüber *G. cruciferarum* ebenso anfällig wie die Kontroll-Linien (Abbildung 3-22 A). Die herabgesetzte Penetrationsresistenz von *pen2*-Mutanten scheint die basale Resistenz gegenüber *G. cruciferarum* nicht zu betreffen, da keine erhöhte Anfälligkeit von *pen2* oder *pen2erp1-3* beobachtet wurde. Bei allen untersuchten Linien konnte 48 Stunden nach Infektion nahezu an jeder Interaktionsstelle invasives Wachstum in Epidermiszellen beobachtet werden, wobei nur durchschnittlich 5% der penetrierten Zellen in mikroskopischen Analysen Zelltod-vermittelte

Autofluoreszenz aufwiesen (Abbildung 3-22 A). Die Bildung von Callose-haltigen Papillen unterhalb von Pilzstrukturen fand in allen Linien gleichermaßen statt (Daten nicht gezeigt). Die Ausbreitung der Infektion wurde über einen Zeitraum von 9 Tagen beobachtet. Nach ca. 7 Tagen wurde ausgedehntes Mycel auf der Blattoberfläche sichtbar und mikroskopisch konnte die Ausbildung von Konidienträgern mit Konidiosporen festgestellt werden (persönliche Mitteilung R. Fuchs).

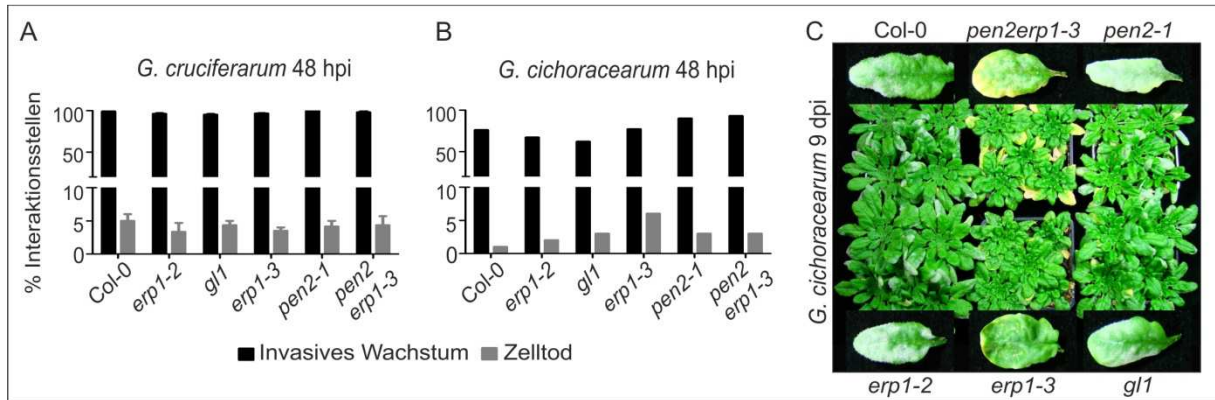


Abbildung 3-22. Effekt von Mutationen in *ERP1* auf die Anfälligkeit gegenüber *G. cruciferarum* und *G. cichoracearum*.

Die Infektion 4-5 Wochen alter Arabidopsis-Pflanzen erfolgte mit *Golovinomyces*-Sporen, die auf den entsprechenden Wirtspflanzen kultiviert wurden.

(A, B) Quantifizierung des Penetrationserfolgs von *G. cruciferarum* (A) bzw. *G. cichoracearum* (B) auf den jeweiligen Arabidopsis-Linien, 48 Stunden nach Inokulation (48 hpi). Dargestellt ist die Häufigkeit der erfolgreichen Penetration, wobei die schwarzen Balken invasives Wachstum in Epidermiszellen angeben und die grauen Balken den Anteil penetrierter Zellen mit Zelltodsymptomen. Die Infektion mit *G. cruciferarum* wurde zweimal durchgeführt und die Daten beider Experimente wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung berechnet. Die Daten der *G. cichoracearum*-Infektion repräsentieren das Ergebnis eines ersten Vorexperiments. Pro Experiment wurden jeweils 100 Interaktionsstellen bewertet, wobei die Autofluoreszenz als Indikator für die Zelltodreaktionen diente.

(C) Aufnahmen des makroskopischen Infektionsphänotyps von *G. cichoracearum* auf den jeweiligen Arabidopsis-Linien. 9 Tage nach Infektion wurden sowohl Arabidopsis-Pflanzen als auch einzelne Blätter fotografiert. Die Bilder repräsentieren das Ergebnis eines ersten Vorexperiments.

Infektionsexperimente mit *G. cichoracearum* wurden bisher erst einmal durchgeführt. In diesem Vorexperiment wurden nach 9 Tagen Chlorosen auf infizierten Blättern von *erp1-3* und *pen2erp1-3* sichtbar, nicht jedoch bei Col-0, *gl1* und *erp1-2* (Abbildung 3-22 C). Auch bei *pen2* konnten an Blatträndern Chlorosen beobachtet werden, jedoch waren die Blätter, wie auch bei Col-0, *gl1* und *erp1-2*, von Mycel bedeckt (Abbildung 3-22 C). Die *pen2*-Mutante wurde in der Literatur als stärker anfällig gegenüber *G. cichoracearum* beschrieben (Stein et al. 2006). Die starke Mycelbildung auf der Blattoberfläche von *pen2* und die Chlorosen der infizierten Blätter sind Indizien dieser erhöhten Anfälligkeit, die allerdings nach 48 hpi noch nicht deutlich wurde (Abbildung 3-22 B). Vermutlich beruht die erhöhte Anfälligkeit von *pen2* weniger auf Defekten der präinvasiven Resistenz, als auf einer Beeinträchtigung der postinvasiven Resistenz, möglicherweise aufgrund des Fehlens des durch PEN2 gebildeten Toxins (Stein et al. 2006).

Auf den chlorotischen Blättern von *pen2erp1-3* und *erp1-3* bildete sich innerhalb von 9 dpi im Vergleich zu den anderen Linien deutlich weniger Mycel, das invasive Wachstum von *G. cichoracearum* oder die Pathogen-induzierte Zelltodreaktion war jedoch nach 48 h in den *erp1*-Linien nicht verschieden zu den Kontrollpflanzen (Abbildung 3-22 B, C). Das Merkmal der Sporulation

wurde nicht erfasst, sollte aber in zukünftigen Experimenten analysiert werden, um die möglicherweise erhöhte Resistenz von *pen2erp1-3* und *erp1-3* zu verifizieren. Da die Merkmale der Blattchlorosen und verminderten Mycelbildung nicht in der T-DNA-Insertionslinie *erp1-2* beobachtet wurden, könnte die offenbar erhöhte Resistenz von *erp1-3* und *pen2erp1-3* auf einer *second site* Mutation und nicht allein auf der Mutation in *PSAT1/ERP1* beruhen.

3.7.3 BAKTERIELLE PATHOGENE – *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Um die Rolle von *ERP1* in der Nichtwirtsresistenz bzw. der basalen Resistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen zu untersuchen, wurden Blätter von *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen mit verschiedenen *P. syringae*-Stämmen infiltriert und das bakterielle Wachstum nach vier Tagen quantifiziert. *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) löst in Tomaten die bakterielle Blatt- und Fruchtfleckenkrankheit aus. Im Gegensatz zu dem auf *A. thaliana* Col-0 virulenten Stamm *Pst* DC3000 ist der Stamm *Pst* DC3000 *avrRpm1*, der das Avr-Gen *avrRpm1* aus *P. syringae* pv. *maculicola* exprimiert, avirulent. Entsprechend der Gen-für-Gen-Hypothese wird *avrRPM1* in Col-0 durch das Genprodukt des entsprechenden R-Gens *RPM1* erkannt (s. 1.1), wodurch eine hypersensitive Zelltodreaktion induziert und somit die Resistenz gegen das biotrophe Pathogen vermittelt wird (Debener et al. 1991). *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*) ist der Erreger der Fettfleckenkrankheit von Bohnen und nicht in der Lage *A. thaliana* zu befallen. Die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegenüber *Pph* ist nicht mit einer HR-ähnlichen Zelltodreaktion verbunden, induziert aber die Akkumulation von PR1-Protein und die *PMR4*-abhängige Deposition von Callose (Ham et al. 2007).

Phänotypisch konnten für keinen der drei Bakterien-Stämme deutliche Unterschiede an den Infiltrationsstellen der verschiedenen Linien festgestellt werden. Die *Pst* DC3000-Infiltrationsstellen wiesen nach 4 Tagen wässrige Läsionen auf, im Bereich der Infiltrationsstellen von *Pst* DC3000 *avrRpm1* bildeten sich Chlorosen und die Infiltration mit *Pph* führte zu keiner makroskopisch sichtbaren Reaktion auf den Blättern (Daten nicht gezeigt). *Pph*-behandelte Blätter wurden einer kombinierten Trypanblau-Anilinblau-Färbung unterzogen und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. In allen Linien wurden in großen Bereichen über die Infiltrationsstelle hinaus Callose-haltige Papillen in Epidermiszellen beobachtet. Die *erp1*-Mutanten wiesen keine deregulierte Callose-Deposition oder Zelltod in Mesophyllzellen auf (Daten nicht gezeigt).

Die makroskopischen Beobachtungen legen nahe, dass sich die *erp1*-Mutanten in ihrer Reaktion gegen die verwendeten *P. syringae*-Stämme nicht von den Kontrollpflanzen unterscheiden. Um dies zu verifizieren, wurde die Vermehrung der Bakterien in den Pflanzen analysiert. Die Inokulation der *Pst*-Stämme erfolgte mit einer über die optische Dichte (OD_{600}) ermittelten Konzentration von 1×10^5 cfu ml^{-1} . Die Anzahl der tatsächlich infiltrierten Bakterien war in allen 4 Experimenten mit weniger als 10 cfu cm^{-2} sehr gering (Abbildung 3-23 A, B), beeinträchtigte aber nicht das Bakterienwachstum im weiteren Verlauf der Experimente. Das Wachstum von *Pst* DC3000 war nach 4 Tagen in *erp1-3*, mit

$5,3 \times 10^4$ cfu cm⁻², im Vergleich zu *gll*, mit $2,3 \times 10^5$ cfu cm⁻² um ca. eine halbe Zehnerpotenz reduziert, für die übrigen Linien wurde kein signifikanter Unterschied ermittelt (Abbildung 3-23 A).

Beim avirulenten Stamm war der Anstieg des Bakterienwachstum nach 4 Tagen um durchschnittlich zwei Zehnerpotenzen geringer als beim virulenten Stamm (Abbildung 3-23 B). Unterschiede zwischen den einzelnen Linien konnten hier nicht festgestellt werden.

Die Inokulation von *Pph* erfolgte mit 1×10^8 cfu ml⁻¹, wobei durchschnittlich 1×10^3 cfu cm⁻² infiltriert wurden (Abbildung 3-23 C). Die Zahl der Bakterien vermehrte sich innerhalb von 4 Tagen um maximal 2 Zehnerpotenzen. Nach 4 Tagen war das Bakterienwachstum in *erp1-3* und *pen2erp1-3* im Vergleich zu *gll* und *pen2* leicht erhöht. Das bakterielle Wachstum in der T-DNA-Insertionslinie *erp1-2* unterschied sich nicht von dem in Col-0, was wiederum darauf hindeutet, dass die reduzierte Nichtwirtsresistenz von *erp1-3* und *pen2erp1-3* gegenüber *Pph* vielmehr auf einer *second site*-Mutation als auf dem Verlust von *PSATI/ERP1* beruht. Da auch die anscheinend gesteigerte Resistenz gegenüber *Pst* DC3000 nur für *erp1-3* beobachtet werden konnte, ist anzunehmen, dass Mutationen in *PSATI/ERP1* die Reaktion von *A. thaliana* gegenüber bakteriellen Pathogenen nicht beeinflussen.

Die Tabelle 3-1 (nächste Seite) zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse der Pathogen-Behandlungen.

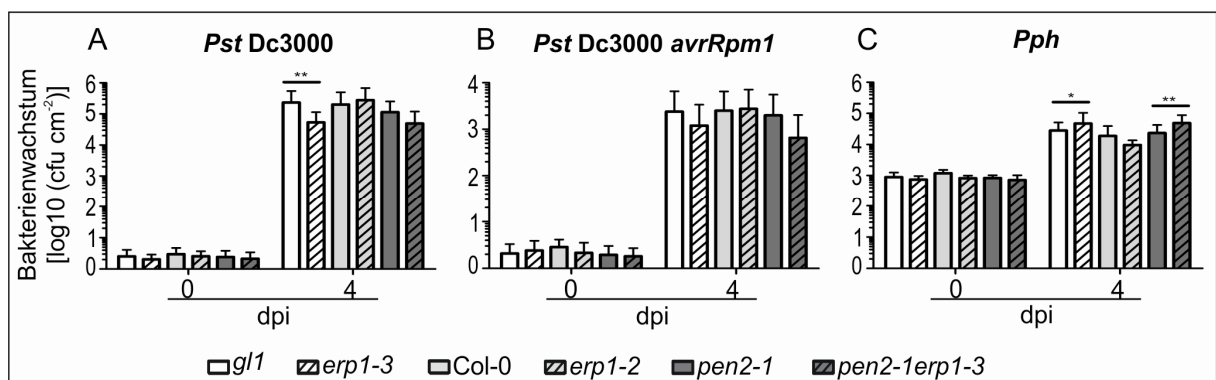


Abbildung 3-23. Effekt von Mutationen in *ERP1* auf die Reaktion gegenüber *P. syringae*

Wachstumsassay mit den *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) Stämmen DC3000 (A) und DC3000 *avrRpm1* (B) sowie mit *P. syringae* pv. *phaseolicola* (*Pph*, C). Blätter wurden mit 1×10^5 cfu ml⁻¹ (*Pst*) bzw. 1×10^8 cfu ml⁻¹ (*Pph*) infiltriert, direkt nach der Infiltration (0 dpi) und nach 4 Tagen (4 dpi) geerntet, um das bakterielle Wachstum zu ermitteln. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 4 (*Pst*, n=24) bzw. 3 (*Pph*, n=18) Experimenten. Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollpflanzen unterscheiden, wurden durch Sternchen markiert (Mann WhitneyTest; *, p<0,05; **, p<0,01). Die Kontrollpflanzen entsprechen dabei dem genetischen Hintergrund der jeweiligen *erp1*-Mutanten.

Tabelle 3-1. Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Pathogen-Assays

Pathogen	Lebensweise	Interaktion mit <i>A. thaliana</i>	Reaktion der <i>erp1</i> -Mutanten im Vergleich zu den Kontroll-Linien	Durchgeführte Experimente		
				makro	mikro	
Echter Mehltau	<i>Bgh</i>	biotroph	Nichtwirt	stärkere Zelltodreaktion und deregulierte Callose-Deposition im Mesophyll	2	1
	<i>G. cruciferarum</i>	biotroph	Wirt	keine Unterschiede	2	2
	<i>G. cichoracearum</i>	biotroph	Wirt	<i>erp1-3</i> und <i>pen2erp1-3</i> starke Chlorosen und anscheinend resistenter, nicht aber <i>erp1-2</i>	1	1
Anthraxose-Erreger	<i>C. lagenarium</i>	hemibiotroph	Nichtwirt	keine Unterschiede, keine Chlorosen, keine HR	2	-
	<i>C. higginsianum</i>	hemibiotroph	Wirt	<i>erp1</i> -Mutanten anfälliger, aber generell schwache Infektion	2	1
bakterielle Fleckenkrankheit	<i>Pst</i> DC 3000	biotroph	Wirt, virulent	<i>erp1-3</i> resistenter, nicht aber <i>erp1-2</i> und <i>pen2erp1-3</i>	4	-
	<i>Pst</i> DC 3000 <i>avrRpm1</i>	biotroph	Wirt, avirulent	keine Unterschiede	4	-
	<i>Pph</i>	biotroph	Nichtwirt	<i>erp1-3</i> und <i>pen2erp1-3</i> anfälliger, nicht aber <i>erp1-2</i>	3	1

makro/ mikro, makro- und mikroskopische Analyse der Infektion

3.8 REAKTION VON *erp1*-MUTANTEN AUF DEN BAKTERIELLEN ELICITOR FLG22

Die Erkennung und Bindung des bakteriellen PAMPs Flagellin bzw. des konservierten flg22-Peptids durch den FLS2-BAK1-Rezeptorkomplex initiiert verschiedene Abwehrreaktionen in Arabidopsis (Gomez-Gomez und Boller 2000, Chinchilla et al. 2006, Chinchilla et al. 2007). Zusätzlich wurde nach Behandlung von Arabidopsis-Keimlingen mit flg22 eine starke Inhibierung des Wurzel- und Sprosswachstums in Abhängigkeit der flg22-Konzentration beobachtet (Gomez-Gomez et al. 1999). Da FLS2, BAK1 und andere Rezeptor-ähnliche Proteine nach flg22-Perzeption in Plasmamembran-Mikrodomänen mit reduzierter Detergenzien-Löslichkeit (DRMs, s. 1.4.1) akkumulieren (Morel et al. 2006, Keinath et al. 2010), wird für Membran-Mikrodomänen eine funktionelle Bedeutung für Signalweiterleitungs-Prozesse nach PAMP-Erkennung angenommen (Mongrand et al. 2010). Aufgrund der Anreicherung von Sterolen, Sterolglycosiden und Sphingolipiden in DRMs (Laloi et al. 2007), sollte ein möglicher Einfluss der veränderten Sterolhomöostase in *erp1*-Mutanten auf DRMs und damit auf die flg22-Perzeption und Signaltransduktion getestet werden. Dafür wurde zum einen die Expression der Gene *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D* (*RBOHD*), *FLG22-INDUCED RECEPTOR-LIKE KINASE 1* (*FRK1*) und *OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE 1* (*OXI1*) und zum anderen die Inhibierung des Wurzelwachstums nach flg22-Behandlung untersucht. Das Gen *RBOHD* kodiert eine NADPH-Oxidase, die hauptsächlich in die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) nach PAMP-Erkennung involviert ist. Die Kinase *OXI1* ist downstream des ROS-Signals für die Aktivität der MAPKs *MPK3* und *MPK6* von Bedeutung (Rentel et al. 2004). Das Gen für die

Rezeptorkinase FRK1 wurde schon in anderen Studien als Reporter gen für frühe Abwehrreaktionen (30 min) nach flg22-Behandlung verwendet (Asai et al. 2002).

Für die untersuchten Gene wurde eine gesteigerte Expression nach flg22-Perzeption beschrieben, die auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit beobachtet werden konnte (Abbildung 3-24 A und B). Die Expression der jeweiligen Gene war 4 Stunden nach flg22-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen deutlich induziert, wobei keine Unterschiede zwischen Col-0 und *erp1-2* bzw. *gll* und *erp1-3* festgestellt wurden. Demnach führen Mutationen in *ERP1* nicht zu einer veränderten Expression der untersuchten flg22-responsiven Gene. Gemeinsam mit den Ergebnissen der *P. syringae*-Behandlung (s. 3.7.3) deutet dies darauf hin, dass die basale Resistenz gegenüber bakteriellen Pathogenen in *erp1*-Mutanten nicht beeinträchtigt ist.

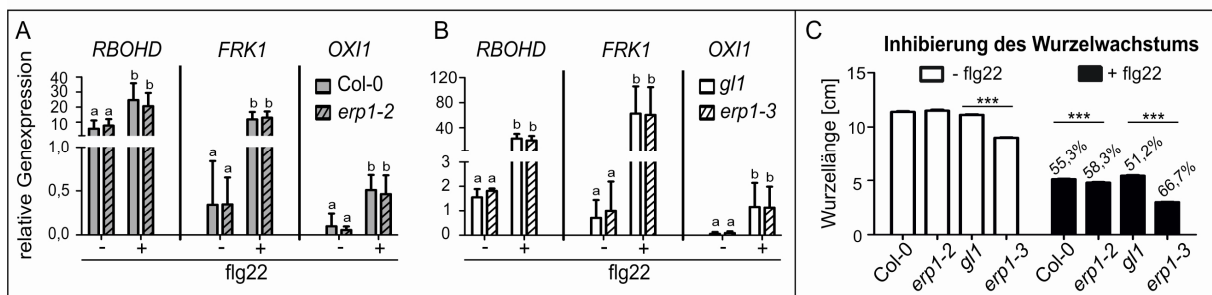


Abbildung 3-24. flg22-Behandlung führt zu einer stärkeren Inhibition des Wurzelwachstums von *erp1*-Keimlingen

(A, B) Vergleich der relativen Expression der flg22-responsiven Gene *RBOHD*, *FRK1* und *OXI1* in Col-0 und *erp1-2* (A) bzw. in *gll* und *erp1-3* (B), 4h nach Zugabe von flg22 (10µM). Die relative Expression der jeweiligen Gene wurde durch qRT-PCR ermittelt, wobei *PP2A* als Referenzgen diente. Dargestellt ist der Δ CT-Wert als Mittelwert aus 3 Experimenten mit 6 biologischen Replikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die Buchstaben kennzeichnen signifikant verschiedene Klassen der relativen Expression (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test, $p < 0,001$).

(C) Erhöhte Wurzelwachstumsinhibition bei *erp1-2* und *erp1-3* im Vergleich zu Col-0 bzw. *gll*. Die flg22-Behandlung (schwarze Balken) erfolgte über 9 Tage nach einer fünftägigen vertikalen Anzucht auf normalen ATS-Agar-Platten. Zur Bestimmung der Wurzelwachstumsinhibition wurde auch die Wurzellänge unbehandelter 14-Tage alter Keimlinge gemessen (weiße Balken). Dargestellt sind die Mittelwerte der Wurzellängen aus 3 Experimenten mit entsprechender Standardabweichung ($n = 360$). Die prozentuale Inhibition des Wurzelwachstums nach Stressbehandlung ist über den schwarzen Balken vermerkt. Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede der Wurzellänge der jeweiligen *erp1*- und Kontroll-Linie (*student's t-test*, $p < 0,001$).

Interessanterweise zeigten die *erp1*-Mutanten im Vergleich zu den Kontroll-Linien eine verstärkte Inhibition des Wurzelwachstums auf Agarplatten mit 10 µM flg22. Besonders deutlich wurde dies bei *erp1-3*, mit einer im Vergleich zu *gll* um 15% stärkeren Inhibition des Wurzelwachstums. Allerdings wurde das geringere Wurzelwachstum von *erp1-3*-Keimlingen auf Agar-Platten ohne flg22, das schon in Abschnitt 3.2.2 beschrieben worden war, auch hier beobachtet und muss bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden. Da das Wurzelwachstum von *erp1-2* auf Agarplatten ohne flg22 mit dem von Col-0 vergleichbar ist, deutet das reduzierte Wurzelwachstum von *erp1-3* und *pen2erp1-3* (s. 3.1.1) auf eine *second site* Mutation und nicht auf einen pleiotropen Effekt der Mutation in *ERP1* hin. Im Vergleich zu Col-0 war das Wurzelwachstum von *erp1-2* auf flg22-haltigen Agarplatten um 3% stärker inhibiert. Dieser Effekt konnte aufgrund der großen Stichprobenmenge aus drei unabhängigen Experimenten statistisch abgesichert werden. Demnach sind in *erp1*-Mutanten

frühe Reaktionen und Signalwege nach flg22-Perzeption nicht beeinträchtigt, die Toleranz gegenüber einer andauernden Stresssituation scheint hingegen eingeschränkt.

3.9 MICROARRAY-ANALYSEN – GENEXPRESSIONSMUSTER VON *ERP1*-MUTANTEN

In den bisher erläuterten Experimenten wurden spezifische Stoffwechselwege, Genexpressionen oder Resistenzreaktionen in *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen untersucht und miteinander verglichen. Zusätzlich sollten Microarray-Experimente einen Überblick über globale Veränderungen der basalen und *P. infestans*-induzierten Genexpression im *erp1*-Hintergrund ermöglichen. Durch Verwendung des Arabidopsis ATH1 GeneChips® von Affymetrix wurden 24000 Gene des Arabidopsis-Genoms erfaßt, deren Expression in *gll*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3* nach Behandlung mit *P. infestans* bzw. Wasser untersucht wurden. Um einen Eindruck des zeitlichen Verlaufs transkriptioneller Reaktionen zu erhalten, wurden Proben nach 6 und 12 Stunden geerntet. Die Affymetrix-Daten wurden mit Hilfe der öffentlich verfügbaren Software ROBIN statistisch ausgewertet (Lohse et al. 2010).

3.9.1 KONSTITUTIV DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE

Um den Einfluss der *erp1*-Mutation auf die basale Genexpression zu untersuchen, wurde das Expressionsprofil Wasser-behandelter *erp1*-Mutanten und Kontroll-Linien miteinander verglichen: *erp1-3* mit *gll* (*erp1-3/gll*) und *pen2erp1-3* mit *pen2* (*pen2erp1-3/pen2*). Da die Microarray-Experimente mit nur einmal rückgekreuzten Pflanzen durchgeführt wurden, konnte der Einfluß von *second site*-Mutationen auf das Expressionmuster von *erp1-3* und *pen2erp1-3* nicht ausgeschlossen werden. Um diesen Effekt zu verringern, wurden nur die Gene als spezifisch in *erp1-3* differentiell exprimiert angesehen, die sowohl in *erp1-3/gll* als auch in *pen2erp1-3/pen2* identifiziert wurden (s. Anhang 8.11). Zusätzlich wurde die Genexpression Wasser-behandelter *pen2*- und *gll*-Proben verglichen (*pen2/gll*). Da eine konstitutive Expression unabhängig vom Zeitpunkt der Ernte sein sollte, wurden nur die zu beiden Zeitpunkten (6 und 12 hpi) identifizierten Gene als signifikant und konstitutiv differentiell exprimiert beurteilt. Einen Überblick über die Gene, die entweder nach 6 oder 12 Stunden in einem oder mehreren Genotypen differentiell exprimiert wurden, gibt Anhang 8.11. Abbildung 3-25 A fasst die Gene zusammen, deren basale Expression in *pen2*- bzw. *erp1-3* im Vergleich zu *gll* verändert war. Deren relativ geringe Anzahl zeigt, dass die Mutationen in *pen2* bzw. *erp1-3* das Expressionsprofil unbehandelter Pflanzen kaum beeinflussen. Im Vergleich zu *gll* wiesen in *pen2* nur 4 Gene eine konstitutiv veränderte Expression auf: *PR1* und *At1g76960* zeigten eine erhöhte Transkriptakkumulation, während weniger Transkript von *PEN2*- und *At2g30320* detektiert wurde (Abbildung 3-25 A). Die reduzierte Transkriptakkumulation von *PEN2* geht vermutlich auf die Mutation in *pen2* zurück, welche zu einem STOP-Codon in Exon 2 des *PEN2*-Gens führt. Bisher wurde der Verlust von *PEN2* in *pen2*-Mutanten nur auf Protein-Ebene gezeigt (Lipka et al. 2005). Die Identifizierung von *PEN2* als konstitutiv differentiell exprimiertes Gen in *pen2* zeigt, dass die im

Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Vergleiche und Berechnungen für die Analyse des Genexpressionsmusters in verschiedenen genetischen Hintergründen geeignet waren.

Die erhöhte *PRI*-Transkriptakkumulation in Wasser-behandelten *pen2*-Pflanzen konnte in zuvor durchgeführten Northern-Blot-Analysen nicht detektiert werden (s. 3.6.1).

Für die Gene *NAD4* und *BON2* wurde in *pen2erp1-3* und *erp1-3* eine im Vergleich zu *pen2* bzw. *gll* verringerte Transkriptakkumulation beobachtet (Abbildung 3-25 A). *NAD4* ist eine mitochondrial kodierte Untereinheit der NADH-Dehydrogenase (Moller 2001) und *BON2* gehört zur Familie der Copine (CPN, S. Yang et al. 2006). Aufgrund der Funktion der *BON/CPN*-Genfamilie als negative Regulatoren von Zelltodreaktionen ist *BON2* ein interessantes Kandidatengens, dessen veränderte basale Expression möglicherweise zur *erp1*-spezifische Resistenzreaktion beiträgt. Allerdings zeigten die T-DNA-Insertionslinien *bon2* (SALK_056651) und *bon2-2* (SALK_116382) sowie *nad4* (SALK_144034) in zwei unabhängigen Experimenten keinen HR-Phänotyp nach Inokulation mit *P. infestans* (Daten nicht gezeigt). Durch qRT-PCR sollte die veränderte Transkriptakkumulation von *BON2* in *erp1-3* und *pen2erp1-3* überprüft werden. Da in der Zwischenzeit die Rückkreuzungen von *erp1-3* mit *gll* bzw. von *pen2erp1-3* mit *pen2* weitergeführt worden waren, wurden neben Pflanzen der ersten Rückkreuzungsgeneration (BC1) aus den Microarray-Experimenten, auch Pflanzen der dritten Generation (BC3) getestet. Zusätzlich wurden die *erp1*-Allele *erp1-4* (BC1) und *erp1-2* untersucht, die in den Microarray-Experimenten nicht vertreten waren. Die reduzierte Expression von *BON2* konnte nur für *erp1-3* und *pen2erp1-3* der BC1 bestätigt werden, alle anderen getesteten *erp1*-Linien waren mit Col-0, *gll* und *pen2* vergleichbar (Abbildung 3-25 B). Die in den Microarray-Experimenten beobachtete veränderte basale Expression von *BON2* scheint demnach auf einer *second site*-Mutation zu beruhen, die in den übrigen *erp1*-Mutanten nicht vorhanden ist und im Laufe der Rückkreuzungen aus *erp1-3* und *pen2erp1-3* verloren ging.

In *pen2* und den *erp1*-Mutanten, außer *erp1-2*, wurden nach Behandlung mit *P. infestans* eine im Vergleich zu unbehandelten Pflanze leicht erhöhte *BON2*-Transkriptmengen beobachtet. Bisher wurde für die *BON/CPN*-Genfamilie nur eine Funktion in R-Gen-vermittelten Resistenzreaktionen und der damit verbundenen Zelltodreaktion beschrieben (S. Yang et al. 2006). Die *P. infestans*-induzierte Genexpression von *BON2* in *pen2*- und *erp1*-Pflanzen deutet jedoch auch eine Funktion in der Nichtwirtsresistenz an.

Die Expression von *NAD4* wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die reduzierte Expression in *erp1-3* und *pen2erp1-3* ebenfalls auf einer Hintergrundmutation beruht.

Um die Identifizierung falsch-positiver Kandidatengene zu vermeiden, sollten künftige Microarray-Experimente mit häufiger rückgekreuztem Pflanzenmaterial durchgeführt werden, was aufgrund des Zeitrahmens in dieser Arbeit nicht möglich war.

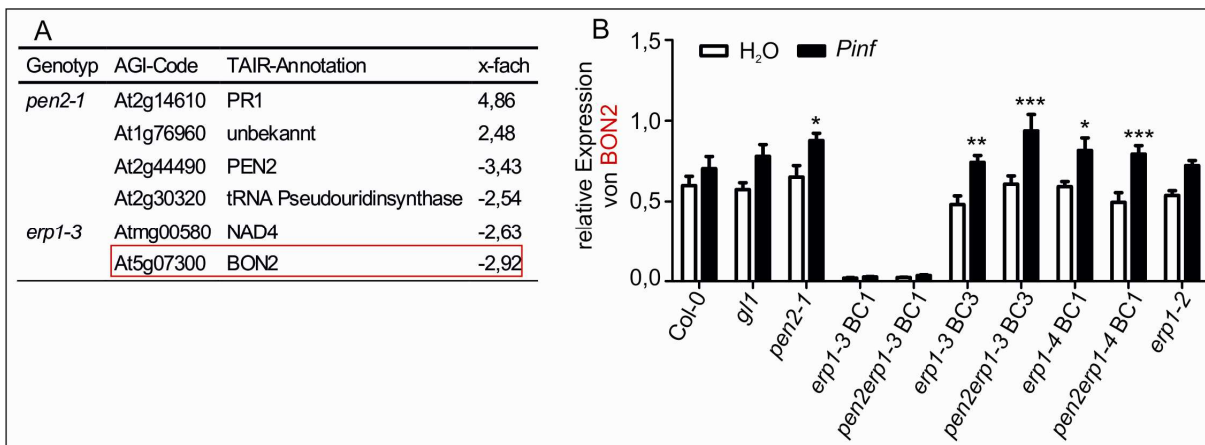


Abbildung 3-25. Die konstitutiv verminderte Transkriptakkumulation von *BON2* im *erp1-3* (BC1)-Hintergrund beruht auf einer Hintergrundmutation.

(A) Zusammenfassung der in *pen2* und *erp1-3* konstitutiv differentiell exprimierten Gene, deren Gennummer (AGI-Code) und Bezeichnung in TAIR (TAIR-Annotation).

(B) Relative Expression von *BON2* in unbehandelten Pflanzen und 6 Stunden nach *P. infestans*-Inokulation (5×10^5 Sporen ml^{-1}). Die relative Expression wurde durch qRT-PCR ermittelt, wobei *PP2A* als Referenzgen diente. Dargestellt ist der ΔCT -Wert als Mittelwert aus 3 Experimenten mit 4 biologischen Replikaten und die entsprechende Standardabweichung. Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen *P. infestans*-behandelten und -unbehandelten Pflanzen (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test, *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

3.9.2 NACH BEHANDLUNG MIT *P. INFESTANS* DIFFERENZIELL EXPRIMIERTE GENE

Die Mutanten *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* reagieren auf Behandlung mit *P. infestans* mit einer makroskopisch sichtbaren HR, die in Wildtyp-Pflanzen nicht zu beobachten ist. Dabei unterscheidet sich der HR-Phänotyp der *erp1*-Mutanten, mit Zelltod und deregulierter Callose im Mesophyll (s. 3.1.2), von dem der *pen2*-Mutante. Unter Normalbedingungen unterscheidet sich das Wachstum der *erp1*-Mutanten kaum von dem der Kontroll-Linien. Die Microarray-Experimente zeigten, dass sich dementsprechend auch das basale Genexpressionsmuster dieser Linien kaum unterscheidet (s. 3.9.1). Die Unterschiede der *P. infestans*-induzierten Nichtwirtsresistenz-Phänotypen von *gll*, *pen2*, *pen2erp1* und *erp1-3* lassen stärkere Veränderungen im Expressionsprofil nach *P. infestans*-Behandlung vermuten. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden die Expressionsprofile *P. infestans*- und Wasser-behandelter Proben jedes Genotyps miteinander verglichen. Um außerdem einen Eindruck von allgemeinen transkriptionellen Reaktionen und Genotyp-spezifischen transkriptionellen Veränderungen nach *P. infestans*-Behandlung zu erhalten, wurden die in den einzelnen Genotypen differentiell exprimierten Gene mehrfachen Vergleichen unterzogen. Abbildung 3-26 gibt die Zahl der in *gll*, *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierten Gene wieder, und die Venn-Diagramme Veranschaulichen die Überlappungen zwischen den Genotypen. In Anhang 8.12 sind für alle Vergleiche die zehn am stärksten differentiell exprimierten Gene repräsentativ aufgeführt. Im Allgemeinen ist festzustellen, dass 6 Stunden nach *P. infestans*-Behandlung in allen Genotypen mehr Gene differentiell exprimiert werden als nach 12 Stunden. *P. infestans*-induzierte Veränderungen der Genexpression scheinen

demnach vor allem zu sehr frühen Zeitpunkten nach Infektion stattzufinden. Außerdem wird deutlich, dass die herabgesetzte Penetrationsresistenz in *pen2* und *pen2erp1-3* im Vergleich zu *gll* und *erp1-3* mit einer viel höheren Anzahl differentiell exprimierter Gene korreliert ist.

Von den 765 Genen, die sechs Stunden nach Behandlung in allen Genotypen eine veränderte Genexpression aufwiesen, zeigten ca. 80% eine erhöhte und nur 20% eine verringerte Transkriptakkumulation (Abbildung 3-26 A). Verstärkt transkribiert wurden v.a. Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren oder die in bestimmten Primärstoffwechseln zur Energiegewinnung, bei Transportprozessen, in der Signalweiterleitung, für Proteinmodifikationen oder in der biotischen Stressantwort eine Rolle spielen (Abbildung 3-27). Betrachtet man Hormon-responsive Gene, so scheinen nur Gene der Ethylen-Signaltransduktion und Auxin-induzierte Gene einer differentiellen Expression nach *P. infestans*-Behandlung zu unterliegen (Abbildung 3-27). 12 Stunden nach *P. infestans*-Behandlung war die Zahl der in allen Genotypen differentiell exprimierten Gene mit 351 deutlich kleiner (Abbildung 3-26 B), doch auch hier wurde ein Großteil der Gene aktiviert, vor allem Gene für Transportprozesse und biotischen Stress (Abbildung 3-27). *PAD3*-Transkripte akkumulierten in allen 4 Genotypen nach *P. infestans*-Behandlung am stärksten (s. Anhang 8.12).

In *pen2* bzw. *pen2erp1-3* wurden 6 Stunden nach *P. infestans*-Infektion über 3800 Gene differentiell exprimiert, wobei über 60% in beiden Genotypen gleichermaßen reguliert werden, von denen für über die Hälfte (1428 Gene von insgesamt 2360) eine im Vergleich zu den Wasser-Kontrollen verringerte Transkriptakkumulation zu verzeichnen war (Abbildung 3-26 A). Einen starken Einfluss hat die *P. infestans*-Behandlung v.a. auf Prozesse des primären Stoffwechsels, auf Transkriptionsfaktoren, Proteinmodifikation sowie -abbau und Transportprozesse (Abbildung 3-27). Auch 12 Stunden nach Behandlung unterliegen Gene, die den oben genannten funktionalen Gruppen zuzuordnen sind, der stärksten Regulation (Abbildung 3-28), wobei von den ca. 1790 differentiell exprimierten Genen für 938 Gene eine verringerte Transkriptakkumulation detektiert wurde (Abbildung 3-26 B). Eines der sowohl in *pen2* als auch in *pen2erp1-3* zu beiden Zeitpunkten nach Pathogen-Behandlung am stärksten transkribierten Gene ist FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1 (*FMO1*, s. Anhang 8.12).

Trotz der in *pen2* und *pen2erp1-3* zu großen Teilen gleichen Regulation der *P. infestans*-induzierten Genexpression konnten auch Gene identifiziert werden, die nur in *pen2* bzw. *pen2erp1-3* differentiell exprimiert werden. Die 425 (6 hpi) bzw. 326 (12 hpi) spezifisch in *pen2erp1-3* regulierten Gene (Abbildung 3-26) sind dabei von besonderem Interesse, da deren veränderte Expression auf die Mutation in *erp1-3* oder aber auf *second site*-Mutationen zurückzuführen ist. In *pen2erp1-3* werden vor allem Transkriptionsfaktoren und Transportvorgänge differentiell reguliert (Abbildung 3-27 und 3-26). Gene mit Funktionen im Primärstoffwechsel werden größtenteils reprimiert (Abbildung 3-27 und 3-26). Interessant ist die relativ hohe Anzahl aktivierter Gene der abiotischen Stressantwort, wobei es sich zum größten Teil um Gene für Hitzeschock-Proteine (HSPs) handelt. Die Transkriptakkumulation von *HSP70* ist um das 14-fache erhöht (s. Anhang 8.12). Im Vergleich zu 6

hpi werden 12 Stunden nach Behandlung mehr Gene aktiviert, wobei vor allem Gene betroffen sind, deren Genprodukte für den Proteinabbau von Bedeutung sind.

In *erp1-3* werden im Vergleich zu *pen2erp1-3* viel weniger Gene *P. infestans*-abhängig differentiell exprimiert. Die Mutation in *ERP1* scheint das Genexpressionmuster nicht stark zu beeinflussen, aber in Kombination mit *pen2* eine Vielzahl transkriptioneller Änderungen zu induzieren. Die in *erp1-3* spezifisch differentiell exprimierten Gene könnten entweder auf *second site*-Mutationen beruhen, die in *pen2erp1-3* nicht vorhanden sind, oder aber auf Genen, deren Expression nur bei *PEN2*-Wildtypfunktion verändert sind. 12 Stunden nach *P. infestans*-Infektion zeigte nur *At1g78270*, das für die UDP-Glycosyltransferase 85A4 kodiert, eine erhöhte Transkriptakkumulation.

Zusammenfassend wurde in den Microarray-Experimenten zwar ein Überblick über die basale Genexpression und über globale Veränderungen der Genexpression in *gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3* nach *P. infestans*-Behandlung gewonnen, die Mechanismen, die zur Entstehung des *erp1*-spezifischen HR-Phänotyps führen, konnten jedoch nicht aufgeklärt werden.

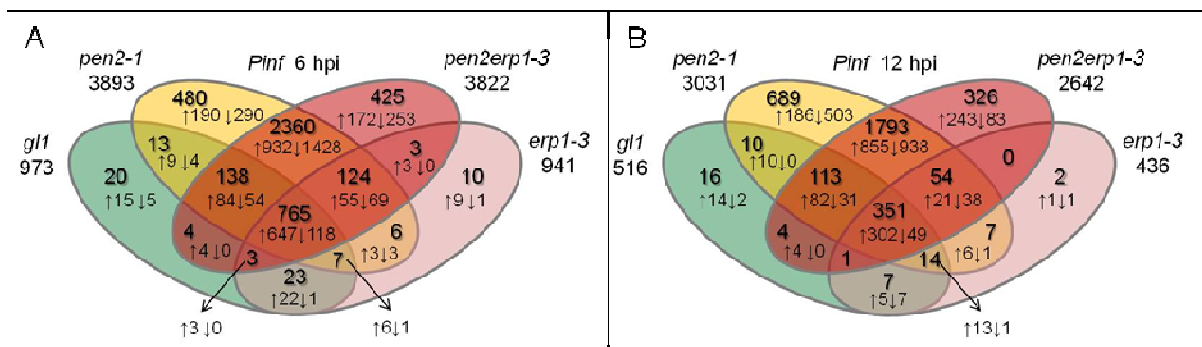


Abbildung 3-26. Nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierte Gene in *gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3*.

Das Venn-Diagramm zeigt Überlappungen differentiell exprimierter Gene in *gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3*, 6 (**A**) oder 12 (**B**) Stunden nach Behandlung mit *P. infestans* (5×10^5 Sporen ml^{-1}). Angegeben ist die Gesamtzahl der differentiell exprimierten Gene. Dabei wurden nur Gene betrachtet, deren Transkriptakkumulation im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen mindestens um das 2-fache erhöht (\uparrow) oder erniedrigt (\downarrow) waren

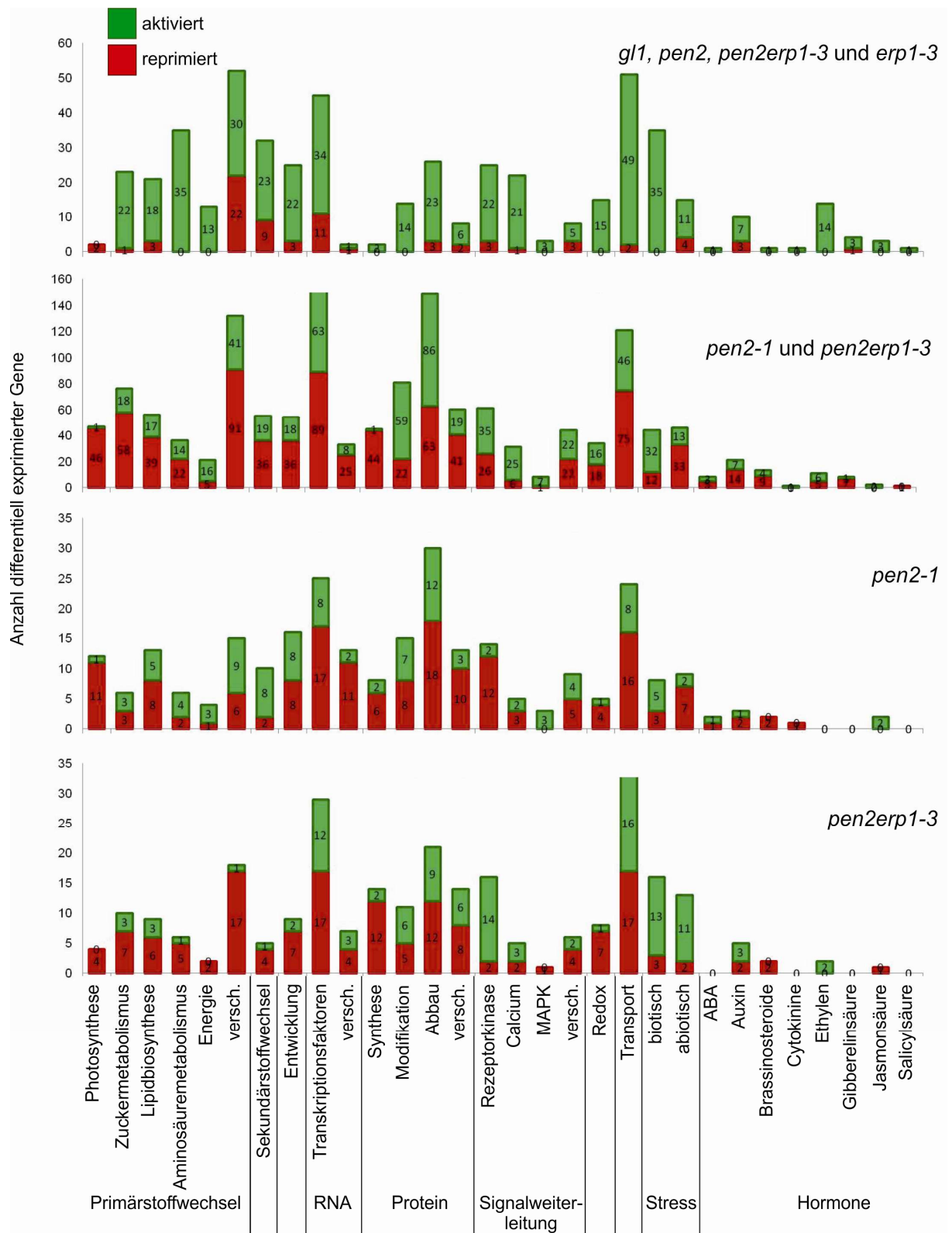


Abbildung 3-27. Differentielle Genexpression in *gl1*, *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* nach *P. infestans*-Behandlung (6 hpi).

Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die entweder in allen Genotypen (*gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3*) (1. Graph) bzw. in *pen2* und *pen2erp1-3* (2. Graph) oder ganz spezifisch in den einzelnen Mutanten *pen2* (3. Graph) bzw. *pen2erp1-3* (4. Graph) differentiell exprimiert werden. Dabei wurden nur Gene betrachtet, deren Transkriptakkumulation im Vergleich zu Wasser-behandelten Pflanzen mindestens um das 2-fache erhöht (grün) oder erniedrigt (rot) war. Die Gruppierung der Gene erfolgte entsprechend der TAIR-Einträge über die Funktion der Genprodukte. Gene unbekannter Funktion sind nicht aufgeführt.

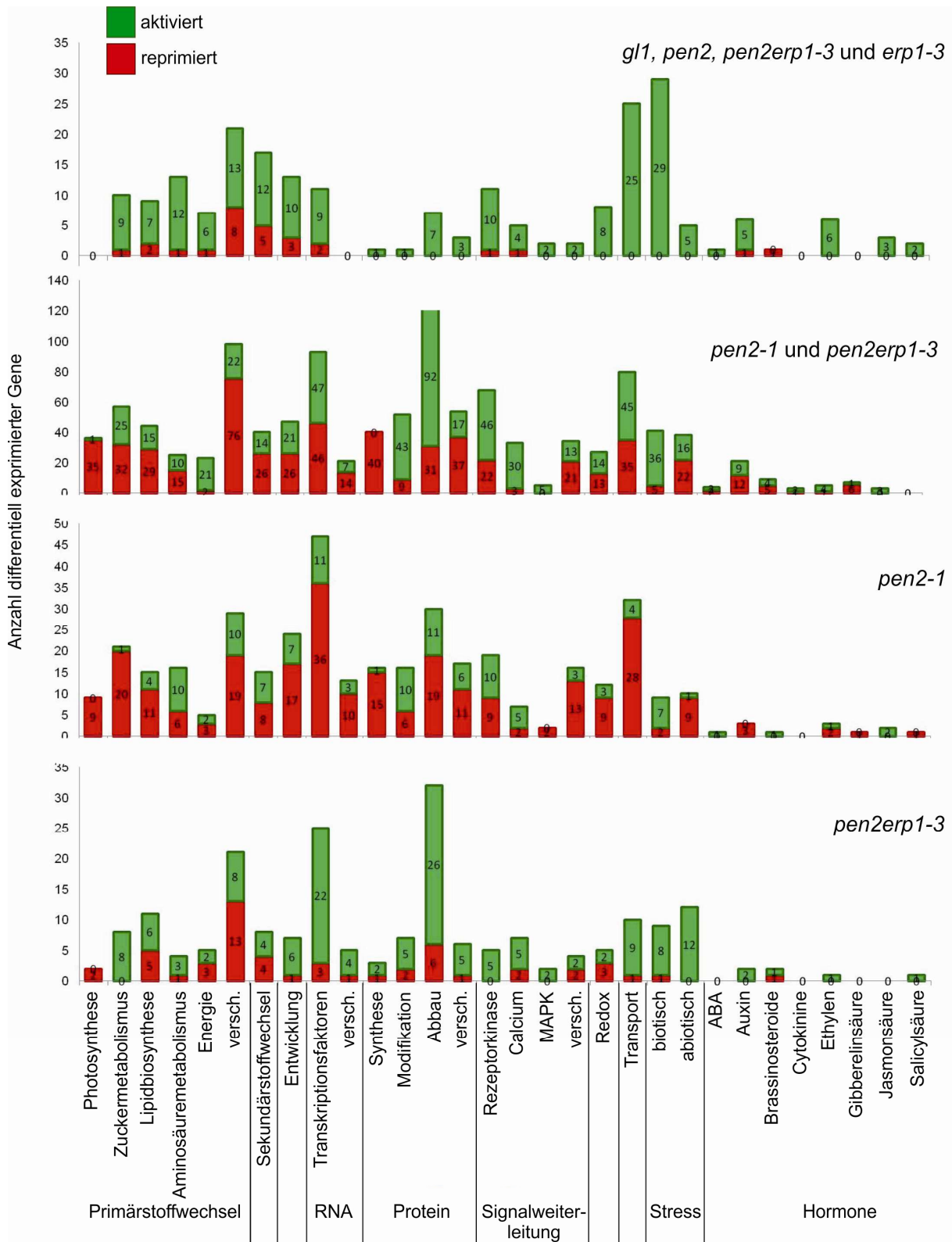


Abbildung 3-28. Differentielle Genexpression in *gl1*, *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* nach *P. infestans*-Behandlung (12 hpi).

Gezeigt ist die Anzahl der Gene, die entweder in allen Genotypen (*gl1*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3*) (1. Graph) bzw. in *pen2* und *pen2erp1-3* (2. Graph) oder ganz spezifisch in den einzelnen Mutanten *pen2* (3. Graph) bzw. *pen2erp1-3* (4. Graph) differenziell exprimiert werden. Dabei wurden nur Gene betrachtet, deren Transkriptakkumulation im Vergleich zu Wasser-behandelten Pflanzen mindestens um das 2-fache erhöht (grün) oder erniedrigt (rot) war. Die Gruppierung der Gene erfolgte entsprechend der TAIR-Einträge über die Funktion der Genprodukte. Gene unbekannter Funktion sind nicht aufgeführt.

3.10 BEDEUTUNG VON STEROLESTERN IN DEM WIRTS- PATHOGEN-SYSTEM KARTOFFEL – *P. INFESTANS*

Um die Rolle von SEs in einer Wirtspflanze von *P. infestans* zu analysieren, wurden die Sterollipide in Kartoffelblättern vor und nach Behandlung mit *P. infestans* quantifiziert und die Funktion eines AtPSAT1/ERP1-Homologes in Kartoffel untersucht. In Homologieuntersuchungen mit dem Programm WU-BLAST 2.0 der TIGR *Plant Transcript Assemblies*-Datenbank wurde der *S. tuberosum*-EST TA31107_4113 (<http://plantta.jcvi.org>) identifiziert, der auf Proteinebene eine 71%-ige Sequenzidentität zu dem C-Terminus von AtPSAT1/ERP1 aufweist (s. Anhang 8.7). Mit Hilfe des zu AtPSAT1/ERP1 homologen ESTs TA46269_4081 aus *S. lycopersicum* und der verfügbaren vollständigen Genomsequenz von Tomate wurde die Genstruktur von *StPSAT* rekonstruiert und mit der von AtPSAT1/ERP1 verglichen: Die Position von Exons und Introns ist den beiden PSAT-Genen stark konserviert (persönliche Mitteilung Dr. S. Rosahl, IPB, Halle). Um die Bedeutung von SEs in der Wirtsinteraktion zwischen Kartoffel und *P. infestans* zu untersuchen, wurden transgene Kartoffelpflanzen mit reduzierter *StPSAT*-Expression (*StPSAT*-RNAi) oder konstitutiver Expression von AtPSAT1/ERP1 (Pro35S:ERP1) bzw. *erp1-3* (Pro35S:erp1-3) generiert. Die Analyse der *P. infestans*-Biomasse und der Sterollipid-Zusammensetzung in Blättern der transgenen Kartoffel-Linien sollte klären, ob transgene Pflanzen eine veränderte Sterolhomöostase und eine veränderte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* aufweisen.

3.10.1 VERÄNDERUNGEN IM STEROLPROFIL VON *S. TUBEROSUM* DURCH *P. INFESTANS*

Die Expression von *StPSAT* und die Sterollipid-Zusammensetzung in Wildtyp-Pflanzen (WT) und *empty vector* (EV)-Kontrollen wurde 3 Tage nach Behandlung in *P. infestans*-behandeltem und -unbehandeltem Blattmaterial untersucht. Während die Behandlung mit *P. infestans* bei Arabidopsis keine Veränderung der AtPSAT1-Transkription bewirkte (s. 3.3), war die Akkumulation des *StPSAT*-Transkripts in inokulierten Kartoffelblättern im Vergleich zu unbehandelten Proben deutlich reduziert (Abbildung 3-29 A). Interessanterweise wurde in behandelten Kartoffelblättern trotz der verminderten *StPSAT*-Expression eine signifikant erhöhte SE-Menge gemessen (Abbildung 3-29 B). Die *P. infestans*-induzierte Steigerung der Sterolestersynthese war auch bei Arabidopsis beobachtet worden (s. 3.4).

Die Mengen und der Anteil der verschiedenen Sterollipide an der Gesamtheit der gemessenen Sterole in Kartoffelblättern waren im Vergleich zu Arabidopsis verschieden (Tabelle 3-2). Während in Arabidopsis-Blättern die FS den größten und die ASGs den kleinsten Anteil der Sterollipide ausmachten (s. 3.4), war in Kartoffelblättern die Menge der ASGs am höchsten, gefolgt von FS, SGs und SEs (Abbildung 3-29 B). Dabei entsprach die Menge der Sterollipide einem prozentualen Anteil von 47% ASG, 32% FS, 20% SG und 1% SE (Tabelle 3-2). Der hohe Anteil glycosylierter Sterole

(SG und ASG) in Kartoffel war bereits als typisches Merkmal der Gattung *Solanum* beschrieben worden (Dupéron et al. 1984).

Die Analyse der FS-Komposition in Kartoffelblättern zeigte, dass Sitosterol mit 53% das Hauptsterol darstellt, gefolgt von Stigmasterol, Cholesterol und Campesterol (Abbildung 3-29 B). Im Vergleich zu *Arabidopsis* machen Cholesterol und Stigmasterol in Kartoffel einen deutlich größeren und Campesterol einen geringeren Anteil der FS aus (Tabelle 3-2). Die Behandlung mit *P. infestans* führt in Kartoffel, ähnlich wie in *Arabidopsis*, zu einer gesteigerten Stigmasterol-Menge und damit zu einem erhöhten Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol im Blatt (Abbildung 3-29 B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz der Unterschiede im Sterolprofil von Kartoffel- und *Arabidopsis*-Blättern, die Behandlung mit *P. infestans* ähnliche Änderungen bewirkt: eine gesteigerte SE-Akkumulation und ein erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol.

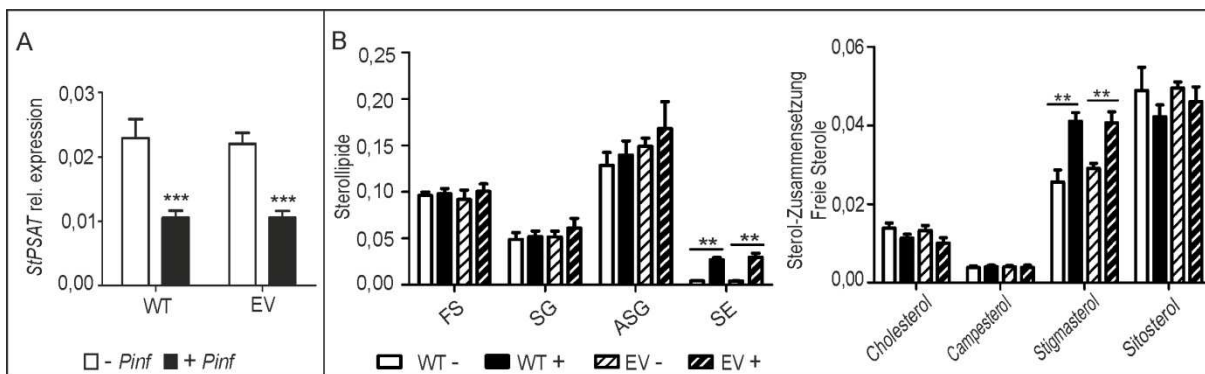


Abbildung 3-29. *P. infestans* moduliert die Expression von *StPSAT* und das Sterolprofil von Kartoffel.

3 Wochen alte Wildtyp (WT)- und *empty vector* (EV)-Pflanzen wurden mit *P. infestans* infiziert (1×10^5 Sporen ml⁻¹), und nach 3 Tagen wurden die infizierten Bereiche als Blattscheiben geerntet.

(A) Reduzierte Transkriptlevel von *StPSAT* nach *P. infestans*-Infektion. Die relative Expression von *StPSAT* wurde durch qRT-PCR ermittelt, wobei *StEF1α* als Referenzgen diente. Dargestellt ist der Δ CT-Wert als Mittelwert aus 3 Experimenten mit 6 biologischen Replikaten und die entsprechende Standardabweichung. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zwischen *P. infestans*-behandelten und -unbehandelten Pflanzen (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test, $p < 0,005$).

(B) Akkumulation von Sterolestern und Stigmasterol nach *P. infestans*-Infektion. Lipidextraktion erfolgte aus Blattscheiben behandelte (+) und unbehandelte (-) Wildtyp (WT)- und *empty vector* (EV)-Kartoffelblätter und der Gehalt an Sterollipiden und die Sterolverteilung der FS wurden mittel Q-TOF MS/MS ermittelt. Dargestellt sind die Mengen der Lipide (nmol mg⁻¹ FW) als Mittelwerte und deren Standardabweichung. Die Werte entsprechen 2 Experimenten mit jeweils 3 biologischen Replikaten. Signifikanzunterschiede zwischen unbehandelten und *P. infestans*-behandelten Pflanzen wurden durch Sternchen markiert (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test, **, $p < 0,01$).

Tabelle 3-2. Prozentualer Anteil der Sterollipide an der Gesamtheit der gemessenen Sterole und Zusammensetzung der freien Sterole in Blättern *P. infestans*-behandelter und -unbehandelter Kartoffel (*S. tuberosum*)- und Arabidopsis-Pflanzen

	<i>S. tuberosum</i> WT		<i>A. thaliana gl1</i>		<i>A. thaliana erp1-3</i>	
	H ₂ O	<i>Pinf</i>	H ₂ O	<i>Pinf</i>	H ₂ O	<i>Pinf</i>
% GS						
FS	31,50 ±0,58	26,59 ±2,82	73,74 ±1,54	64,81 ±3,24	83,40 ±1,74	78,13 ±2,33
SG	20,16 ±1,76	18,18 ±1,49	8,47 ±0,38	6,93 ±0,53	14,10 ±1,51	18,34 ±2,19
ASG	47,08 ±1,26	47,65 ±2,04	3,57 ±0,27	4,35 ±0,39	1,75 ±0,22	2,10 ±0,48
SE	1,27 ±0,05	7,58 ±1,19	14,22 ±1,26	23,91 ±4,08	0,75 ±0,09	1,43 ±0,12
% FS						
Chol	14,93 ±0,28	11,71 ±1,69	5,21 ±0,14	4,21 ±0,30	5,40 ±0,52	7,19 ±0,93
Camp	4,27 ±0,20	4,23 ±0,31	14,76 ±0,73	13,49 ±0,35	16,00 ±0,77	15,35 ±0,67
Stig	27,52 ±0,91	41,01 ±1,28	6,15 ±1,16	14,30 ±1,52	5,59 ±0,99	14,73 ±0,91
Sito	53,29 ±0,67	43,06 ±1,73	73,88 ±1,64	68,00 ±1,69	73,02 ±1,43	62,73 ±1,88

GS, Gesamtheit der Sterollipide; FS, freie Sterole; SG, Sterolglycoside; ASG, acylierte Sterolglycoside; SE, Sterolester; Chol, Cholesterol; Camp, Campesterol; Stig, Stigmasterol; Sito, Sitosterol

3.10.2 ÜBEREXPRESSION VON *AtPSAT1/ERP1* IN KARTOFFEL

Um zu untersuchen, ob die ektopische Expression von *AtPSAT1/ERP1* bzw. der verkürzten *erp1-3*-Version die Sterolhomöostase in Kartoffel und bzw. oder die Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* verändert, wurden Désirée-Pflanzen mit *Pro35S:PSAT1/ERP1*- bzw. *Pro35S:erp1-3*-Konstrukten transformiert. Die Integration der Konstrukte wurde in Southern-Blot-Analysen untersucht (Daten nicht gezeigt). Positive Transformanten wurden in Sterilkultur vermehrt und mittels Northern-Blot-Analysen auf die Transkriptakkumulation von *AtPSAT1/ERP1* bzw. *erp1-3* hin überprüft. Während in den Kontroll-Linien (WT und EV) kein *AtPSAT1/ERP1*-Transkript nachweisbar war, zeigten alle transgenen Linien, außer 4J, 3C und 3S, eine starke Akkumulation von *AtPSAT1/ERP1* bzw. *erp1-3* mRNA (Abbildung 3-30 A). Für die Analyse der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* wurde drei Tage nach Infektion die Pathogenbiomasse in Blättern von Kontroll- und transgenen Linien mittels qRT-PCR (s. 2.2.7.1) bestimmt. Insgesamt wurden zwei Infektionsexperimente durchgeführt, wobei die Infektionsstärke z. T. sehr unterschiedlich ausfiel (Fehlerbalken in Abbildung 3-30 B). Eine relativ starke Variabilität von *P. infestans*-Infektionen wurde schon in früheren Arbeiten beschrieben (Caten 1970, Constabel et al. 1993). Nach statistischer Auswertung der Biomasse-Daten wurden keine signifikanten Unterschiede im Wachstum von *P. infestans* in Blattproben von Kontrollpflanzen und transgenen Linien ersichtlich (Abbildung 3-30 B). Auch makroskopisch unterschieden sich die Läsionen im Bereich der Inokulationsstelle nicht voneinander. Unterschiede in Abhängigkeit des transformierten Konstruktes wurden ebenfalls nicht deutlich. Weder die *AtPSAT1/ERP1*- noch die *erp1-3*-exprimierenden Linien zeigten eine veränderte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans*.

Zur Analyse des Sterolprofils in unbehandelten Blattproben wurden pro Konstrukt drei unabhängige Linien (1C, 1H und 2E für Pro35S:*PSAT1/ERP1* und 3H, 3S, 4N für Pro35S:*erp1-3*) ausgewählt. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen waren in den transgenen Linien weder die Mengen der Sterollipide noch die Zusammensetzung der freien Sterole verändert (s. Anhang 8.6). Demnach führt eine konstitutive Expression von *AtPSAT1/ERP1* oder *erp1-3* in Kartoffel zu keinem erhöhten SE-Level. Möglicherweise korreliert die erhöhte Transkription nicht mit der Expression eines aktiven *AtPSAT1*-Enzyms oder endogene Enzyme des Sterolstoffwechsels in Kartoffel sind in der Lage das Gleichgewicht der Sterolhomöostase trotz *AtPSAT1/ERP1*- oder *erp1-3*-Aktivität aufrecht zu erhalten. Der Nachweis des ektopisch exprimierten Proteins mit Hilfe des spezifischen anti-*PSAT1* Antikörpers schlug leider mehrfach fehl.

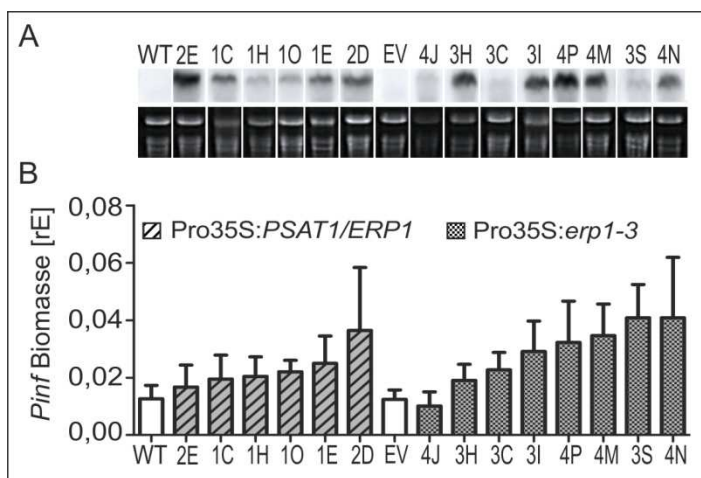


Abbildung 3-30. Die Überexpression von *AtPSAT/ERP1* bzw. *erp1-3* in Kartoffel bewirkt keine Veränderung der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans*.

(A) Northern-Blot-Analyse von 14 unabhängigen transgenen Kartoffel-Linien, die entweder mit Pro35S:*PSAT1/ERP1* (1C, 1E, 1K, 1O, 2D, 2E) oder Pro35S:*erp1-3* (3C, 3H, 3I, 3S, 4J, 4M, 4N, 4P) transformiert worden waren. Visualisierung des *PSAT1/ERP1*- bzw. *erp1-3*-Transkripts erfolgte mit einer radioaktiv markierten *PSAT1/ERP1*-cDNA-Sonde. Ethidiumbromid-Färbung der rRNA diente als Ladekontrolle.

(B) Quantifizierung des Wachstums von *P. infestans* in transgenen Kartoffelpflanzen, dem Wildtyp (WT) und einer empty vector (EV)-Kontrolle. Die Inokulationsstellen wurden 3 Tage nach Infektion (1×10^5 Sporen ml^{-1}) mit einem Korkbohrer ausgestanzt. Die *P. infestans*-Biomasse wurde durch qRT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten aus 2 Experimenten ($n = 6$ bzw. 24 für die Kontrollen) mit entsprechender Standardabweichung. rE, relative Einheiten

(EV)-Kontrolle. Die Inokulationsstellen wurden 3 Tage nach Infektion (1×10^5 Sporen ml^{-1}) mit einem Korkbohrer ausgestanzt. Die *P. infestans*-Biomasse wurde durch qRT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten aus 2 Experimenten ($n = 6$ bzw. 24 für die Kontrollen) mit entsprechender Standardabweichung. rE, relative Einheiten

3.10.3 RNAi-VERMITTELTE HERABSETZUNG DER *StPSAT*-EXPRESSION

Weil der Verlust der *PSAT1*-Aktivität in Arabidopsis zu einer veränderten Reaktion gegenüber *P. infestans* führte, sollte getestet werden, ob durch RNAi vermitteltes Stilllegen von *StPSAT* auch die Interaktion zwischen Kartoffel und *P. infestans* beeinflusst werden kann. Dafür wurden Désirée-Pflanzen mit RNAi-Konstrukten gegen *StPSAT* (s. Anhang 8.8) transformiert und die Integration der Konstrukte in Southern-Blot-Analysen überprüft (Daten nicht gezeigt). Positive Transformanten wurden in Sterilkultur vermehrt und auf herabgesetzte *StPSAT*-Expression untersucht. Hierfür wurde die Methode der qRT-PCR gewählt, da Vorexperimente zeigten, dass die Northern-Blot-Analyse zur Detektion von endogenen *StPSAT*-Transkriptmengen nicht ausreichend sensitiv und somit ungeeignet für den Nachweis reduzierter Transkriptmengen in RNAi-Pflanzen ist. Für die RNAi-Linien F5 und G1 konnte in zwei Experimenten eine signifikante Herabsetzung der *StPSAT*-Transkriptakkumulation nachgewiesen werden (Abbildung 3-31 A). Infektionsexperimente zeigten jedoch, dass dies nicht mit einem veränderten Wachstum von *P. infestans* korreliert (Abbildung 3-31 B). Die restlichen transgenen Linien A2, E4, H3 und H5 wiesen eine mit den Kontroll-Linien vergleichbare relative

Expression von *StPSAT* auf (Abbildung 3-31 A) und auch die *P. infestans*-Biomasse, die wiederum einer starken Schwankung in den zwei durchgeführten Experimenten unterlag, ist nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Kontroll-Linien oder F5 und G1 (Abbildung 3-31 B).

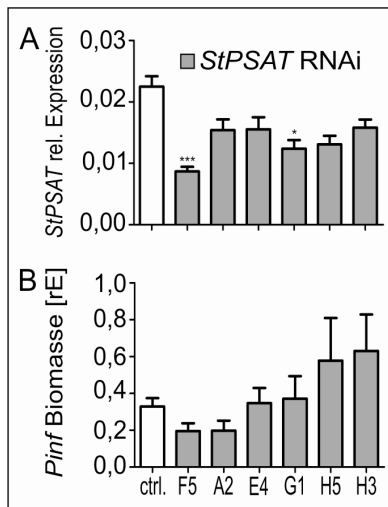


Abbildung 3-31. Das Wachstum von *P. infestans* auf *StPSAT*-RNAi Kartoffel-Linien ist nicht verändert.

(A) Relative Expression von *StPSAT* in RNAi- und Kontroll-Linien (ctrl., Wildtyp und empty vector). Die Transkriptmenge von *StPSAT* wurde durch qRT-PCR ermittelt, wobei *StEF1 α* als Referenzgen diente. Dargestellt ist der Δ CT-Wert als Mittelwert aus 2 Experimenten (n = 6 bzw. 24 für die Kontrollen) mit entsprechender Standardabweichung. Die Sternchen zeigen statistisch signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis, *** P < 0,001; * P < 0,05).

(B) Quantifizierung des Wachstums von *P. infestans* in RNAi- und Kontroll-Linien (ctrl., Wildtyp und empty vector). Die Inokulationsstellen wurden 3 Tage nach Infektion (1×10^5 Sporen ml⁻¹) mit einem Korkbohrer ausgestanzt. Die *P. infestans*-Biomasse wurde durch qRT-PCR ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Daten aus 2 Experimenten (n = 6 bzw. 24 für die Kontrollen) mit entsprechender Standardabweichung. rE, relative Einheiten

Für die Analyse der Sterolverbindungen in RNAi-Pflanzen wurden zunächst die Linien E4, F5, G1 und H5 ausgewählt. Unabhängig von der *StPSAT*-Transkriptakkumulation wurden auch hier keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen festgestellt. Der Gehalt der SEs in unbehandelten Blättern von Kontroll-Kartoffeln war generell mit ca. 1% der Gesamtsterole sehr gering, wodurch möglicherweise eine Reduktion der SE-Mengen in *StPSAT*-RNAi-Pflanzen nicht nachgewiesen werden konnte.

Da bereits im Vorfeld eine *P. infestans*-induzierte Steigerung des SE-Gehalts in Kontrollpflanzen beobachtet worden war (s. 3.10.1), sollte das Sterolprofil aller RNAi-Linien nach Behandlung mit *P. infestans* untersucht werden. Aus Zeitgründen konnte die Messung der Sterollipide nach *P. infestans*-Behandlung bisher nur einmal durchgeführt werden. Die Ergebnisse dieses Vorexperiments sind im Anhang 8.6 dargestellt. Von den sechs transgenen Linien wurden nach *P. infestans*-Infektion für die Linien A2, F5, G1 und H5 im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant erhöhte Mengen freier Sterole ermittelt, was vermutlich auf der deutlich erhöhten Akkumulation von Sitosterol und der leichten Steigerung von Stigmasterol basierte. Zusätzlich zeigten diese Linien leicht erhöhte SG-Mengen im Vergleich zu den Kontrollen. Eine signifikant erhöhte SE-Akkumulation konnte nur für die Linie H5 nachgewiesen werden, was darauf hindeutet, dass die Aktivität von *StPSAT1* oder einer anderen SE-Synthase in dieser Linie nicht beeinträchtigt ist. Da nicht nur in den Linien F5 und G1 (mit reduzierter *StPSAT1*-Expression) sondern auch in den Linien A2 und H5 (kein *StPSAT*-RNAi-Effekt nachgewiesen) *P. infestans*-induzierte Veränderungen in der Sterolhomöostase beobachtet wurden, scheinen diese Veränderungen entweder zufällig und unabhängig von der *StPSAT*-Expression zu sein, oder aber die leicht verringerte, aber nicht signifikant reduzierte *StPSAT*-Transkriptakkumulation in A2 und H5 reichte aus, um die Sterolhomöostase zu beeinflussen. Die Linien E4 und H3, die eine zu A2 und H5 sehr ähnliche *StPSAT*-Expression aufwiesen, zeigten allerdings keine Veränderungen im Sterolprofil.

4 DISKUSSION

4.1 DIE ROLLE VON *PSAT1/ERP1* IN DER NICHTWIRTSRESISTENZ VON *A. THALIANA* GEGEN *P. INFESTANS*

Die im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Mutation in *PSAT1/ERP1* führt in Kombination mit *pen2* zu einer verstärkten HR, aber auch im *PEN2*-Hintergrund prägt sich die *erp1*-Mutation mit einer HR aus, die im Vergleich zum Wildtyp stärker, im Vergleich zu *pen2* hingegen schwächer ausfällt (s. 3.2.2). Die in *pen2erp1*-Doppelmutanten beobachteten zellulären Abwehrreaktionen in Form von Zelltod und deregulierter Callose-Deposition im Mesophyll traten auch in *erp1*-Einzelmutanten auf. Zusammen mit den Daten der Spaltungsanalyse der Kartierungspopulation (Kopischke 2007) weisen diese Beobachtungen darauf hin, dass die Mutation in *PSAT1/ERP1* unabhängig von der *pen2*-Mutation die Nichtwirtsresistenzreaktion gegenüber *P. infestans* beeinflusst und zu einer im Vergleich zum Wildtyp verstärkten Zelltodreaktion führt. Die im Vergleich zu den Einzelmutanten stärkere Zelltodreaktion bzw. Callose-Deposition im Mesophyll der *pen2erp1*-Doppelmutanten legt nahe, dass die herabgesetzte Penetrationsresistenz der *pen2*-Mutante die Auswirkung des defekten *PSAT1/ERP1*-Gens auf die Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegenüber *P. infestans* verstärkt.

PSAT1/ERP1 könnte eine weitere Komponente der Penetrationsresistenz darstellen, die durch einen zu *pen2* verschiedenen Mechanismus das Eindringen von *P. infestans* erschwert, so wie dies z.B. für *PEN1* in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *Bgh* bekannt ist. *PEN1* und *PEN2* fungieren in verschiedenen Reaktionswegen der Penetrationsresistenz und der Ausfall beider Komponenten in *pen1pen2*-Doppelmutanten führt zu einem im Vergleich zu den Einzelmutanten erhöhten Penetrationserfolg von *Bgh* (Lipka et al. 2005). Im Gegensatz dazu resultiert der gleichzeitige Verlust von *PEN2* und *PEN3*, deren Aktivität im selben Reaktionsweg postuliert wird, nicht in einer stärker herabgesetzten Penetrationsresistenz (Dittgen 2005).

Möglicherweise ist *PSAT1/ERP1* aber auch in postinvasive Resistenzreaktionen involviert. *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* vermitteln die posthaustorielle Resistenz gegenüber *E. pisi* und *Bgh*, spielen aber in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* keine Rolle. Die Funktion von *PAD4* und *SAG101* scheint nicht nur in der basalen und R-Gen-vermittelten Resistenz sondern auch in der Nichtwirtsresistenz redundant zu sein, da der Ausfall jeweils einer dieser postinvasiven Abwehrkomponenten die Nichtwirtsresistenz gegenüber *Bgh* kaum beeinträchtigt (Lipka et al. 2005). In *pad4sag101*-Doppelmutanten hingegen ist das epiphytische Hyphenwachstum und die Bildung von Mikrokolonien im Vergleich zum Wildtyp und den Einzelmutanten stark erhöht, die Penetrationshäufigkeit jedoch nicht verändert (Lipka et al. 2005). Aufgrund der unbeeinträchtigten Penetrationsresistenz in *pad4sag101* findet Penetration durch *Bgh* zwar relativ selten statt, bei erfolgreicher Penetration kann das postinvasive Wachstum des Pathogens jedoch nicht effektiv verhindert werden. Dieses Beispiel zeigt, dass auch der Ausfall postinvasiver Mechanismen allein die Nichtwirtsresistenz beeinflussen kann.

Ein Ausfall beider Abwehrebeneen kann zu einer starken Beeinträchtigung der Nichtwirtsresistenz führen. Die Kombination defekter Penetrations- und postinvasiver Faktoren in *pen2pad4sag101*-Dreifachmutanten führt zur Anfälligkeit gegenüber *Bgh* (Lipka et al. 2005). Die starken Abwehrreaktionen von *pen2erp1*-Mutanten könnten dementsprechend auf einem Ausfall prä- und postinvasiver Mechanismen beruhen. Da *pen2erp1*-Pflanzen nicht anfällig gegenüber *P. infestans* sind, scheinen weitere Komponenten die Nichtwirtsresistenz aufrechtzuerhalten.

Die reduzierte Penetrationsresistenz der *pen*-Mutanten gegenüber *Bgh* wurde quantitativ durch eine erhöhte Anzahl penetrierter und toter penetrierter Epidermiszellen belegt (Collins et al. 2003, Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006). Um den Effekt der *erp1*-Mutation auf die Penetrationsresistenz zu untersuchen, sollte ebenfalls der Penetrationserfolg von *P. infestans* auf *pen2*-, *erp1*- und *pen2erp1*-Mutanten bestimmt werden. Wird durch die Mutation in *PSAT1/ERP1* die Penetrationsresistenz verringert, könnte man in *P. infestans*-infizierten *pen2*- und *erp1*-Einzelmutanten eine ähnliche Anzahl toter Epidermiszellen erwarten. Ein additiver Effekt beider Mutationen sollte dementsprechend in einer erhöhten Anzahl toter Epidermiszellen in *pen2erp1*-Doppelmutanten resultieren. Die toten Epidermiszellen wurden in Trypanblau-gefärbten Blattproben ausgezählt. Aufgrund der hohen Variabilität des *P. infestans*-induzierten HR-Phänotyps und der Zelltodreaktionen im Mesophyll, die z.T. mit einer sehr intensiven Trypanblaufärbung einhergingen, war es jedoch nicht möglich die Anzahl toter Epidermiszellen in *pen2erp1*, *erp1* oder *pen2* zweifelsfrei zu bestimmen (Daten nicht gezeigt). Außerdem war es schwierig *P. infestans*-Strukturen im infizierten Blattgewebe zu erkennen. Somit ist keine Aussage darüber möglich, ob die Penetrationsresistenz in *pen2erp1* stärker beeinträchtigt ist als in *pen2* und ob die Zelltodreaktionen durch versuchte oder erfolgreiche Penetration ausgelöst wurden. Auch die Quantifizierung der Trypanblau-Intensität im Inokulationsbereich lieferte aufgrund der hohen Variabilität der Infektionsexperimente keine zuverlässigen Daten (s. 3.2.2). Die makroskopischen Beobachtungen wurden zwar je nach eingesetzter Sporenkonzentration bestätigt, jedoch konnte keine zusätzliche Information für die Einordnung von ERP1 in die zwei verschiedenen Ebenen der Nichtwirtsresistenz gewonnen werden.

Für PEN1-, PEN2- und PEN3-GFP-Fusionsproteine wurde eine fokale Akkumulation an der Zellperipherie unterhalb der Stelle der versuchten Penetration gezeigt (Bhat et al. 2005, Lipka et al. 2005, Stein et al. 2006). Da eine Störung des Aktin-Zytoskeletts diese fokale Akkumulation verhindert und zu einer verminderten Penetrationsresistenz gegen nicht-adaptierte Mehltäupilze führt (Kobayashi et al. 1997, Miklis et al. 2007, Somerville und Underwood 2008), scheint der gerichtete Transport von Komponenten der Penetrationsresistenz zur Stelle der versuchten Penetration für deren Funktion in der Nichtwirtsresistenz von Bedeutung zu sein. Für PSAT1/ERP1-GFP konnte keine Akkumulation unterhalb der versuchten Penetrationsstelle nach Behandlung mit *P. infestans* beobachtet werden (s. 3.5.1), was möglicherweise gegen eine Rolle von PSAT1/ERP1 in der Penetrationsresistenz gegenüber *P. infestans* spricht. Auch die relativ späte Ausprägung des *erp1*-spezifischen HR-Phänotyps nach Infektion mit *P. infestans*, *Bgh* oder *G. cichoracearum* (s. 3.1.2 und 3.7) lässt eher eine Beteiligung

von PSAT1/ERP1 an den postinvasiven Mechanismen der Nichtwirts- bzw. basalen Resistenz vermuten.

4.2 EIN MÖGLICHER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN BLATTSENESENZ UND ABWEHRANTWORT

Die *erp1*-Mutanten zeigen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen eine verfrühte Blattseneszenz. Unter Kurztagbedingungen sind die ältesten Blätter 8-10 Wochen alter *erp1*-Pflanzen chlorotisch und z.T. nekrotisch, bei *g11*- und *pen2*-Pflanzen desselben Alters sind nur die Blattspitzen teilweise gelb gefärbt. (s. 3.1.1). Auch Bouvier-Navé et al. (2010) beobachteten eine verfrühte Blattseneszenz *PSAT1/ERP1*-defizienter Pflanzen, die ab dem Stadium der Blütenentwicklung unter Langtagbedingungen deutlich wurde. Sie postulierten daraufhin eine Funktion von PSAT1/ERP1 in der entwicklungspezifischen Blattalterung.

Eine frühere Induktion von Alterungsprozessen in *erp1*-Pflanzen könnte in der Interaktion mit *P. infestans* und anderen Pathogenen von Bedeutung sein, da in mehreren Studien beobachtet wurde, dass ältere Pflanzen verschiedener Spezies weniger anfällig gegenüber Pathogenen sind. Diese entwicklungspezifische Resistenz wird auch als *age-related resistance* bezeichnet und ist häufig mit der Induktion von PR-Genen und der Akkumulation von Salicylsäure verbunden (Kus et al. 2002, Develey-Riviere und Galiana 2007, Carviel et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde keine konstitutiv erhöhte Transkriptakkumulation von *PR1* in Blättern adulter *erp1*-Pflanzen beobachtet (s. 3.6.1). Allerdings konnte auch von Kus et al. (2002) keine erhöhte *PR1*-Genexpression in Blättern adulter Col-0 Pflanzen beobachtet werden, die im Vergleich zu jüngeren Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegenüber dem virulenten *Pst* DC3000 Stamm aufwiesen. Um zu untersuchen, ob andere SA-abhängige Mechanismen an der verstärkten Reaktion von *erp1*-Mutanten gegenüber *P. infestans* beteiligt sind, könnte der SA-Gehalt in Blättern adulter und junger *erp1*- und Kontrollpflanzen bestimmt werden. Die Mutanten *sid1* und *sid2* akkumulieren im Vergleich zum Wildtyp kaum SA nach Pathogenbehandlung, sind anfälliger gegenüber *P. syringae* und *P. parasitica* und in Blättern älterer Pflanzen konnte kein vermindertes Bakterienwachstum im Vergleich zu jüngeren Pflanzen nachgewiesen werden (Nawrath und Metraux 1999, Kus et al. 2002). Eine Kreuzung dieser Mutanten mit *erp1*, Infektionsexperimente mit jungen (3-4 Wochen) und alten (7-8 Wochen) *sid1erp1*- bzw. *sid2erp1*-Doppelmutanten sowie die Bestimmung des SA-Gehalts in diesen Pflanzen würde zwei verschiedene Fragestellungen klären: 1. Ist die *erp1*-spezifische Pathogenantwort SA-abhängig? und 2. Geht die *erp1*-spezifische Reaktion auf Pathogene auf Mechanismen der *age-related resistance* zurück?

Um zu überprüfen, ob die *erp1*-spezifischen Abwehrreaktionen in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* und *Bgh* sowie in der basalen Resistenz gegen *C. higginsianum* auf ein verfrühtes Einsetzen der Blattseneszenz zurückzuführen sind, sollte die Expression Seneszenz-assoziiierter Gene (SAGs) in verschiedenen Entwicklungsstadien von *erp1*- und Kontrollpflanzen analysiert werden. Da die Transkription von *SAG12* in *A. thaliana* mit zunehmendem Alter aktiviert, aber kaum durch externe

Stimuli beeinflusst wird, würde sich eine quantitative Analyse der Transkriptakkumulation dieses Gens zur Untersuchung der Blattseneszenz anbieten (Noh und Amasino 1999). *SAG13* wird in sehr frühen Stadien der entwicklungspezifischen Seneszenz aktiviert, die noch nicht durch die typischen Symptome wie z.B. Chlorosen begleitet werden (Weaver et al. 1998). Die Analyse von *SAG13* würde daher die Untersuchungen zur verfrühten Seneszenz von *erp1*-Mutanten ergänzen. Kus et al. (2002) konnten in *P. syringae*-infizierten adulten aber noch nicht seneszenten Col-0-Pflanzen die Expression von *SAG13* nachweisen, nicht aber in unbehandelten Pflanzen im selben Entwicklungsstadium. Offensichtlich führt die Infektion selbst zur Aktivierung von Seneszenzprozessen und damit verbundenen Abwehrreaktionen. Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen geht jedoch weder eine konstitutiv noch durch *P. infestans*-induzierte erhöhte Expression von SAGs hervor. Möglicherweise wurden die Analysen mit zu jungen Pflanzen durchgeführt oder aber die nach *P. infestans*-Behandlung untersuchten Zeitpunkte sind zu früh, um eine Veränderung in der Regulation von SAGs nachzuweisen. Die Annahme einer Bedeutung von *age related resistance*-Mechanismen für die *erp1*-spezifische Pathogenantwort ist rein spekulativ, könnte aber mit wenigen Experimenten, die im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Studie nicht mehr möglich waren, überprüft werden.

Einen weiteren bereits bekannten Zusammenhang zwischen Seneszenz und Abwehrreaktionen stellt das Seneszenz-assoziierte Gen *SAG101* dar. Gemeinsam mit EDS1 und PAD4 ist *SAG101* in der basalen- und R-Gen-vermittelten Resistenz, sowie für die postinvasive Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis von Bedeutung (Feys et al. 2005, Lipka et al. 2005). Zwar scheinen diese Lipase-ähnlichen Proteine in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* keine Rolle zu spielen, ein Beitrag EDS1-PAD4-SAG101-ähnlicher Komponenten zur postinvasiven Resistenz ist jedoch nicht auszuschließen.

4.3 DIE BEDEUTUNG UND ENTSTEHUNG VON CALLOSE-DEPOSITIONEN IN DER PFLANZLICHEN ABWEHRANTWORT

Die *erp1*-Mutanten unterscheiden sich von Wildtyppflanzen v.a. darin, dass nach *P. infestans*-Infektion nicht nur Resistenzreaktionen in Epidermiszellen beobachtet werden, sondern auch in Mesophyllzellen Zelltod und massive Calloseablagerungen auftreten. Die zellulären Abwehrreaktionen von Arabidopsis gegen *Bgh* beschränken sich im Allgemeinen auf die Epidermis, was vermutlich daraus resultiert, dass Mehltäupilze i.d.R. nicht in tiefere Zellschichten vordringen (Micali et al. 2008). In der Interaktion von Arabidopsis und *P. infestans* können ähnliche zelluläre Reaktionen beobachtet werden (Huitema et al. 2003). Zwar induziert *P. infestans* auch in *pen2*-Mutanten teilweise Zelltodreaktionen und Zellwandverstärkungen im Mesophyll, die *erp1*-spezifische deregulierte Callose-Deposition konnte jedoch nur in *pen2erp1*-Doppelmutanten beobachtet werden.

In Arabidopsis ist die wund- und Pathogen-induzierte Callozesynthese von der Aktivität der Glucansynthase *GSL5* abhängig (Jacobs et al. 2003). Mutationen in *GSL5* führen zum Verlust der Pathogen-induzierten Callose-Deposition, beeinträchtigen jedoch nicht die Papillenbildung (Jacobs et

al. 2003). Wie ein Screen mit *G. cichoracearum* zeigte, führt der Verlust der GSL5-Aktivität in der Mutante *pmr4* zu einer erhöhten Resistenz gegenüber dem adaptierten Mehltreiberpilz (Vogel und Somerville 2000, Jacobs et al. 2003). Diese Resistenz ist SA-abhängig und geht mit postinvasiven Zelltodreaktionen einher (Nishimura et al. 2003). Es wurde postuliert, dass nicht die GSL5-abhängige Callose sondern das GSL5-Protein selbst durch einen bisher noch unverstandenen Mechanismus als negativer Regulator der SA-abhängigen Abwehrantwort wirkt (Nishimura et al. 2003, Hückelhoven 2007).

Die Funktion der GSL5-abhängigen Callose in der Pathogenabwehr ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. In der inkompatiblen Interaktion mit *Bgh* führt die Mutation in *GSL5* zu keinem signifikant erhöhten Penetrationserfolg auf *pmr4*-Pflanzen (Jacobs et al. 2003) und die reduzierte Penetrationsresistenz von *pen2*-Mutanten geht nicht auf eine reduzierte Callose-Deposition zurück (Lipka et al. 2005). Vergleichbares wurde in der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* beobachtet (Landtag 2006, eigene Daten). Dementsprechend scheint die Pathogen-induzierte Deposition von Callose kein entscheidendes Kriterium für eine effektive Penetrationsresistenz darzustellen. Da im seltenen Fall einer erfolgreichen Penetration von Arabidopsis-Epidermiszellen durch *Bgh* alle gebildeten Haustorien vollständig von Callose-haltigen Zellwandablagerungen umschlossen wurden (Meyer et al. 2009), scheint die Callose-Deposition auch in der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz von Bedeutung zu sein.

Da in *pmr4pen2*-Pflanzen keine Callose detektiert werden konnte, in *pmr4erp1*-Pflanzen hingegen in epidermalen Papillen und Mesophyllzellen Callose nachgewiesen wurde, scheint in *erp1*-Mutanten ein von *GSL5* unabhängiger Mechanismus zur Pathogen-induzierten Akkumulation von Callose zu führen (s. 3.6.2). Neben *GSL5* wurden in Arabidopsis 11 weitere Glucansynthase-ähnliche Gene identifiziert. Nishimura et al. (2003) postulierten, dass keine andere GSL den Verlust von *GSL5* in der Pathogen-induzierten Callose-Synthese kompensieren kann. Allerdings konnte nicht nur für *GSL5* sondern auch für *GSL6* und *GSL11* eine erhöhte Transkriptakkumulation nach *Bgh* Behandlung nachgewiesen werden (Jacobs et al. 2003). Im Gegensatz dazu wird keines der *GSL*-Gene in Arabidopsis-Wildtyppflanzen nach Behandlung mit *P. infestans* differentiell exprimiert (eigene Daten und www.genevestigator.com). In *pen2*- und *pen2erp1*-Pflanzen zeigte sich allerdings nach *P. infestans*-Behandlung eine im Vergleich zu unbehandelten Pflanzen verringerte Transkriptakkumulation von *GSL12* (6 hpi) und eine erhöhte Akkumulation von *GSL6*-Transkript (12 hpi; Microarray-Daten, nicht gezeigt). *GSL12* reguliert die Plasmodesmata-Permeabilität während der Wurzelzellentwicklung und damit den Transport von Signalmolekülen zwischen benachbarten Zellen (Vaten et al. 2011). Es wäre möglich, dass die Reprimierung von *GSL12* in *pen2* und *pen2erp1* für die interzelluläre Kommunikation während der HR von Bedeutung ist. *GSL6* ist in die Callose-Deposition entlang der Äquatorialebene während der Zellteilung involviert (Hong et al. 2001). Eine duale Funktion von *GSL6* in Zellteilungsspezifischer- und Pathogen-induzierter Callosesynthese ist nicht auszuschließen, da auch *GSL5* nicht nur die Wund- und Pathogen-induzierte Callose-Deposition vermittelt, sondern auch während der Pollenentwicklung von Bedeutung ist (Jacobs et al. 2003, Enns et al. 2005). Die Funktion

von *GSL11* ist bisher noch nicht aufgeklärt. Die Callosesynthesen, welche in die *erp1*-spezifische Callosesynthese involviert sind, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Ein möglicher Ansatz wäre die Erzeugung von *erp1gslX*-Doppelmutanten. Da für einige Callosesynthesen redundante Funktionen aufgezeigt wurden, müssten eventuell *gsl*-mehrfach-Mutanten im *erp1*-Hintergrund generiert werden. Da die Expression von *GSL6* nach *Bgh* und *P. infestans*-Behandlung aktiviert wird und auch für *GSL11* eine *Bgh*-induzierte Transkriptakkumulation beobachtet wurde, erscheinen diese Enzyme als interessante Kandidaten mit möglicher Funktion in der Pathogen-induzierten deregulierten Callose-Synthese von *erp1*-Mutanten.

Die Bildung von Papillen erfolgt typischerweise direkt unterhalb der Kontaktstelle zwischen Pflanze und Pathogen im Apoplasten der pflanzlichen Zelle (Kwon et al. 2008a). In *erp1*-Mutanten wurden jedoch keine *P. infestans*-Strukturen in unmittelbarer Umgebung der deregulierten Callose-Deposition im Mesophyll beobachtet. Dementsprechend scheint die *erp1*-spezifische Zellwandauflagerung im Mesophyll keinen direkten Schutzmechanismus gegen versuchte oder erfolgreiche Penetration von *P. infestans* in diesen Zellschichten darzustellen. Da die Mesophyll-Callose nur nach Pathogenbehandlung beobachtet werden konnte und nicht konstitutiv gebildet wurde, wird deren Synthese möglicherweise durch diffusible Signale induziert, die nach der Pathogenerkennung im Rahmen der *erp1*-spezifischen HR im Mesophyll freigesetzt werden.

Als mögliches diffusibles Signal käme H_2O_2 in Frage, das während der ROS-Akkumulation nach Pathogeninfektion im Apoplasten gebildet wird und ins Zytosol und den Kern diffundieren kann (Ranf et al. 2011). Die Funktionen von ROS in der pflanzlichen Abwehr sind vielfältig: ROS können direkt antimikrobiell wirken, sind für die Verfestigung der Zellwand und während der Papillenbildung von Bedeutung, dienen als Signalmoleküle der Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen sowie der Synthese von Phytoalexinen und führen zur Induktion von Zelltodreaktionen (Torres 2010). Sie akkumulieren nicht nur direkt an der Interaktionsstelle und in der betroffenen Zelle, sondern auch in Zellen und Geweben, die entfernt von der initialen Interaktionsstelle lokalisiert sind, und führen dort ebenfalls zur Induktion von Abwehrmechanismen und einer systemischen Resistenz (Alvarez et al. 1998, Vanacker et al. 2000). In *Arabidopsis* tragen die NADPH-Oxidase *RbohD* und *RbohF* zur Akkumulation von ROS nach Pathogeninfektion bei (Torres et al. 2002). Eine Mutation in *RBOHD* geht u.a. mit einer verringerten Callose-Deposition in *flg22*-behandelten Blättern einher (Zhang et al. 2007). Möglicherweise trägt eine erhöhte Transkription oder verstärkte postranskriptionale Aktivierung von NADPH-Oxidase in *erp1*-Pflanzen zu der deregulierten Callose-Deposition nach Infektion mit *P. infestans* oder *Bgh* bei. Die öffentlich verfügbaren Expressiondaten in Genevestigator (www.genevestigator.com) zeigen in Übereinstimmung mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen, dass 6 Stunden nach *P. infestans*-Infektion eine deutliche Transkriptakkumulation von *RBOHD* zu verzeichnen ist, die innerhalb von 24 hpi wieder abnimmt. In *erp1*-Mutanten ist diese *P. infestans*-induzierte *RBOHD*-Expression im Vergleich zu den Kontrollpflanzen allerdings nicht erhöht (Daten nicht gezeigt). Die Expression von *RBOHF* ist in *P. infestans*-behandelten Pflanzen im Vergleich zu Wasser-behandelten Pflanzen unverändert

(www.genevestigator.com, eigene Daten). Diese Expressionsdaten legen nahe, dass RbohF keine Funktion in der *P. infestans*-induzierten Akkumulation von ROS hat, und, dass die deregulierte Callose-Deposition in *erp1*-Mutanten nicht auf einer erhöhten Expression der RbohD beruht. Andererseits könnte die Bildung von ROS auch auf einer posttranskriptionalen Aktivierung der NADPH-Oxidasen beruhen. So wurde z.B. gezeigt, dass die *flg22*-induzierte Phosphorylierung von RbohD für dessen Aktivität notwendig ist (Benschop et al. 2007, Nühse et al. 2007).

Da die Regulation der Rboh-Proteine in engem Zusammenhang mit dem Anstieg des zytosolischen Calcium-Spiegels nach Pathogenerkennung steht (Torres und Dangl 2005), wäre auch ein Einfluss der Calcium-abhängigen Signaltransduktion in der *erp1*-spezifischen Pathogenantwort denkbar. Um eine mögliche Beteiligung von ROS an der Entstehung der *erp1*-spezifischen Mesophyll-Callose zu untersuchen, sollten *rbohDerp1*-Doppelmutanten erzeugt und mit *P. infestans* und *Bgh* infiziert werden, um die zelluläre Reaktion zu analysieren. Außerdem könnte die ROS-Akkumulation nach Pathogeninfektion pharmakologisch inhibiert werden, z.B. mit Diphenyleniodonium (DPI), einem Inhibitor der NADPH-Oxidasen (Alvarez et al. 1998). Sollten *erp1*-Mutanten daraufhin trotzdem Callose im Mesophyll akkumulieren, steht dies in keinem Zusammenhang mit der *P. infestans*-induzierten ROS-Bildung.

Pathogen-induzierte Umlagerungen des Zytoskeletts sowie gerichtete Transport- und Sekretionsprozessen sind für die Bildung von Papillen nach Pathogeninfektion von großer Bedeutung (Hardham et al. 2007). In Arabidopsis akkumulieren der ABC-Transporter PEN3 und die Komponenten des PEN1-abhängigen Sekretionssystems innerhalb weniger Stunden nach *Bgh*-Behandlung im Bereich der versuchten Penetration (Assaad et al. 2004, Stein et al. 2006). Der Nachweis von GFP-markiertem PEN1, SNAP33 und VAMP721/722 in der Papillenstruktur im Apoplasten verdeutlicht außerdem, dass PEN1-SNAP33-Vesikel über die Plasmamembran exportiert und in die Papille integriert werden (Meyer et al. 2009). In mikroskopischen Analysen Mehлтаufizierter Gerste- und Arabidopsis-Blätter wurden häufig multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*, MVB) im Bereich von Papillenbildung und Haustorien-Einkapselungen beobachtet und es wurde postuliert, dass MVBs für den Export Abwehr-relevanter Substanzen von Bedeutung sind (An et al. 2006, Micali et al. 2008, Meyer et al. 2009). In einer früheren Arbeit konnte der Inhalt solcher MVBs mit spezifischen β -1,3-Glucan-Antikörpern markiert werden (Xu und Mendgen 1994). Auch in den *erp1*-spezifischen Callose-Depositionen im Mesophyll wurden elektronendichte Einschlüsse und Vesikel-ähnliche Strukturen beobachtet, in denen z.T. β -1,3-Glucane nachgewiesen werden konnten (s. 3.1.2). Böhlenius et al. (2010) zeigten, dass in Gerste die MVB-lokalisierte GTPase ARFA1b/1c für die Callose-Deposition und die Lokalisation von ROR2, einem PEN1-Ortholog, im Bereich der Papillenbildung nach Infektion mit Gerstenmehltau von Bedeutung ist. Es wurde postuliert, dass anstelle einer lokalen Callosesynthese ein MVB-vermittelter Transport von Callose zur Papille stattfindet, in den die Komponenten der PEN1-abhängigen Sekretion involviert sind. Möglicherweise sind ähnliche Mechanismen für die *erp1*-spezifische massive Callose-Deposition in Mesophyllzellen von Bedeutung. PEN1 spielt zwar in der Nichtwirtsresistenz von Arabidopsis gegenüber *P. infestans*

keine Rolle, aber die mit PEN1 interagierenden Proteine VAMP721 und VAMP722 vermitteln die Resistenz gegenüber einem breiten Pathogenspektrum (Kwon et al. 2008b). *erp1vamp721*- bzw. *erp1vamp722*-Doppelmutanten könnten eventuell klären, ob VAMP721/722-abhängige Vesikelfusionsprozesse auch in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* und speziell in der *erp1*-spezifischen Callose-Deposition im Mesophyll involviert sind.

Die Entstehung der *erp1*-spezifischen Pathogen-induzierten massiven Callose-Akkumulation konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht aufgeklärt werden. Die Bedeutung und Induktion von Zellwandauflagerungen und Callose-Deposition sowie von Vesikel-vermittelten Sekretions- und anderen Transportmechanismen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen wird in vielen Studien untersucht und wird vermutlich mit der Weiterentwicklung der mikroskopischen Analysverfahren immer besser verstanden werden. Basierend auf bisherigen Erkenntnissen und zukünftigen Daten könnten verschiedene Resistenzmechanismen, die im Zusammenhang mit Callose-Deposition, Papillenbildung und möglicherweise auch Sterolhomöostase stehen, in der *erp1*-spezifischen Pathogenabwehr untersucht werden, um den noch bestehenden Fragestellungen nachzugehen.

4.4 ANALYSE DER GLOBALEN GENEXPRESSION IN *erp1*-MUTANTEN

4.4.1 VERÄNDERUNGEN IN DER BASALEN GENEXPRESSION

Die Mutation in *erp1-3* führt zur Entstehung eines verfrühten STOP-Codons in der kodierenden Sequenz von *PSAT1* und resultiert theoretisch in einem am C-Terminus um 43 Aminosäuren verkürzten PSAT1/ERP1-Protein. In Eukaryoten ist ein konservierter Mechanismus bekannt, durch den Transkripte mit verfrühtem Translations-Terminations-Codon (*premature translation-termination codon*) abgebaut werden, um die Expression C-terminal verkürzter und fehlerhafter Genprodukte zu vermeiden (*nonsense-mediated mRNA decay*, Stalder und Muhlemann 2008). Der fehlende C-terminale Teil des Proteins könnte dessen Konformation und damit Aktivität, Lokalisation oder Wechselwirkung mit anderen Proteinen beeinflussen. Die Transkriptakkumulation von *AtPSAT1/ERP1* ist in der *erp1-3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp kaum verändert (s. 3.3). Allerdings konnte nicht nachgewiesen werden, ob ein verkürztes oder gar kein PSAT1/ERP1-Protein in der Pflanze exprimiert wird. Die stark herabgesetzte SE-Menge in *erp1*-Mutanten deutet zumindest auf einen Ausfall der PSAT1/ERP1-Aktivität hin.

Eine Genmutation kann sich nicht nur auf die Expression des betroffenen Gens auswirken, sondern kann auch zu einer veränderten Expression anderer Gene führen. Zum einen kann dies auf einem direkten Einfluss des betroffenen Genprodukts auf Transkriptionsabläufe begründet sein, wie dies z.B. für Transkriptionsfaktoren oder Komponenten der epigenetischen Genregulation bekannt ist (Griffiths et al. 2000). Zum anderen ist eine differenzielle Genexpression als Reaktion auf veränderte Stoffwechselprozesse oder bzw. und aufgrund eines veränderten Hormonhaushalts denkbar (Busch und Benfey 2010). Basierend auf diesen Möglichkeiten wird im Folgenden der Einfluss der *erp1-3*-Mutation in *At1g04010* (*PSAT1/ERP1*) auf die basale Genexpression in Blättern adulter Arabidopsis-Pflanzen diskutiert.

Die globale Genexpression unbehandelter Arabidopsis-Pflanzen wird durch die *erp1-3*-Mutation kaum beeinflusst (s. 3.9.1). Weder Abwehr-relevante Gene, noch in die Sterolhomöostase involvierte Gene sind in der *erp1-3*-Mutante konstitutiv differenziell exprimiert. Lediglich zwei Gene, *NAD4* und *BON2*, wiesen eine veränderte Transkriptakkumulation in den für die Microarray-Analyse verwendeten *erp1*-Mutanten auf. Allerdings scheint die Expression dieser Gene aufgrund einer *second site* Mutation im genetischen Hintergrund der *erp1-3*-Mutante verändert zu sein (s. 3.9.1).

Aceituno et al. (2008) analysierten öffentlich verfügbare Daten globaler Expressionsanalysen in Arabidopsis mit dem Ziel generelle Prinzipien der Genexpression zu extrapolieren. Die Untersuchungen erbrachten, dass vor allem Organidentität und DNA-Methylierung die Genexpression beeinflussen und nur 1,5% aller Gene einer Regulation durch externe Faktoren unterliegen. Außerdem zeigten nur die Mutanten ein relativ stark verändertes Genexpressionsmuster, die sich durch einen deutlichen Entwicklungsphänotyp vom Wildtyp unterscheiden wie z.B. die *gl1*- Mutanten, die keine oder wenige Trichome ausbilden. Dementsprechend ist sowohl die basale Genexpression als auch der Einfluss externer Faktoren auf die Genexpression stark von der Entwicklung der Pflanze und dem untersuchten Organ abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde die Genexpression in Blättern 4-5 Wochen alter und unter Kurztag-Bedingungen angezogener Arabidopsis-Pflanzen untersucht, da die Behandlung mit *P. infestans* und anderen Pathogenen standardmäßig unter diesen Bedingungen erfolgt. Möglicherweise wirkt sich die *erp1-3*-Mutation in anderen Entwicklungsstadien oder Pflanzenorganen stärker auf die globale Genexpression aus. Da *PSAT1/ERP1* auch in Samen für die Speicherung neutraler Lipide von großer Bedeutung ist und dort eine im Vergleich zu adulten Blättern erhöhte *PSAT1/ERP1*-Transkriptakkumulation nachgewiesen wurde (Bouvier-Navé et al. 2010; <http://www.bar.utoronto.ca/efp>), ist ein stärkerer Einfluss der Mutation auf die Samen-spezifische Genexpression denkbar. Des Weiteren zeigen *erp1*-Mutanten ca. 8 Wochen nach Aussaat eine im Vergleich zu Kontrollpflanzen verfrühte Blattseneszenz. Da die Blattseneszenz genetisch reguliert ist und mit einer differentiellen Expression spezifischer Gene einhergeht (Lim et al. 2007), wäre es möglich, dass *erp1*-Pflanzen ein im Vergleich zu den noch nicht seneszenten Kontrollpflanzen verändertes Genexpressionsmuster aufweisen. Um dies zu überprüfen, könnten zusätzliche Microarray-Analysen mit Blattmaterial von *erp1*- und Kontrollpflanzen in verschiedenen Entwicklungsstadien, z.B. im Alter von 6 und 8 Wochen und nach der Blütenentwicklung, durchgeführt werden. Dabei wäre darauf zu achten, dass Saatgut einer mehrfach rückgekreuzten *erp1-3*-Linie verwendet wird, um den Einfluss von Hintergrundmutationen zu minimieren. Außerdem sollte eine der beiden *PSAT1/ERP1*-T-DNA-Insertionslinien mitgeführt werden.

4.4.2 *P. INFESTANS*-INDUZIERT VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION

Außer der verfrühten Blattseneszenz zeigen *erp1*-Mutanten keine offensichtlichen Entwicklungsphänotypen und ähneln unter Normalbedingungen den Kontrollpflanzen. In der Abwehrreaktion gegenüber *P. infestans* hingegen unterscheiden sich *erp1*-Pflanzen von den Kontrollen. Im folgenden Abschnitt sollen die Veränderungen des Genexpressionsprofils betrachtet

werden, die möglicherweise zu der differentiellen Reaktion von *gll*, *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3*-Pflanzen nach Inokulation mit *P. infestans* führen.

Die in einem der Genotypen 6 bzw. 12 h nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierten Gene wurden durch den Vergleich des Genexpressionsprofils *P. infestans*- und Wasser-behandelter Pflanzen identifiziert. Um die *P. infestans*-induzierte transkriptionelle Umprogrammierung in den verschiedenen Genotypen auf Gemeinsamkeiten und Genotyp-spezifische Unterschiede zu untersuchen, wurden die nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimierten Gene der einzelnen Genotypen miteinander verglichen (s. 3.9.2).

Aus den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Microarray-Analysen ging hervor, dass die aktiven Abwehrmechanismen der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* mit Veränderungen im Genexpressionsprofil einhergehen. Insgesamt wurden allein in Col-3 *gll*-Pflanzen 973 Genen identifiziert, die nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimiert wurden (s. 3.9.2). Huitema et al. (2003) hingegen identifizierten nur 54 Gene, deren Expression in *A. thaliana* Col-3-Pflanzen 16 Stunden nach *P. infestans*-Behandlung im Vergleich zu Wasser-behandelten Pflanzen verändert war (s. Anhang 8.14). Einige dieser 54 Gene stimmen mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Genen überein (s. Anhang 8.14). Die meisten Übereinstimmungen der in beiden Untersuchungen identifizierten *P. infestans*-responsiven Gene betreffen die Gruppe der Stress- und Abwehr-relevanten Gene (s. Anhang 8.14). Die unterschiedliche Anzahl identifizierter Gene kann verschiedene Ursachen haben: Zum einen wurden in beiden Arbeiten unterschiedliche Microarrays verwendet. Während der von Huitema et al. (2003) verwendete Arabidopsis *Functional Genomics Consortium* (AFGC)-Microarray nur ca. 11000 cDNAs abdeckte, sind auf den in der vorliegenden Arbeit verwendeten ATH1 *GeneChips*® von Affymetrix 24000 Gene des Arabidopsis-Genoms vertreten. Zum anderen erfolgte die Analyse zu verschiedenen Zeitpunkten nach *P. infestans*-Behandlung und vermutlich mit unterschiedlich konzentrierten Sporensuspensionen durchgeführt wurde. Die Konzentration der verwendeten Sporensuspension ist in der Arbeit von Huitema et al. (2003) nicht genau angegeben, sie scheint zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Sporen ml^{-1} betragen zu haben.

Die Microarray-Analysen der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass eine genetische Umprogrammierung v.a. zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Infektion stattfindet und scheinbar häufig transient verläuft (s. 3.9.2). Auch eine vergleichende Analyse der globalen Genexpression in Arabidopsis nach Behandlung mit dem adaptierten Mehлтаupilz *G. cichoracearum* und dem nicht-adaptierten *Bgh* zeigte, dass v.a. zu frühen Zeitpunkten nach Infektion mit einem Nichtwirtspathogen eine starke Veränderung der Genexpression induziert wird (Zimmerli et al. 2004). Möglicherweise gingen Huitema et al. (2003) diese sehr früh nach Pathogen-Behandlung aktivierten bzw. reprimierten Gene verloren. Gleichzeitig erscheint es möglich, dass einige von den in Huitema et al. (2003) veröffentlichten Genen spezifisch zu späteren Zeitpunkten nach *P. infestans*-Behandlung aktiviert werden und daher in den Microarray-Experimenten der vorliegenden Arbeit nicht erfasst werden konnten.

In *gll*, *pen2*, *pen2erp1-3* und *erp1-3* wiesen zu beiden Zeitpunkten nach *P. infestans*-Behandlung v.a. solche Gene eine erhöhte Transkriptakkumulation auf, die Transkriptionsfaktoren kodieren oder deren Genprodukte in Transportprozesse und Mechanismen der biotischen Stressantwort involviert sind (s. 3.9.2). Außerdem wird 6 Stunden nach *P. infestans*-Behandlung verstärkt die Expression von Komponenten der Signalweiterleitung und posttranslationalen Proteinmodifikation aktiviert. Proteinmodifikationen und ein schneller *turnover* von Proteinen durch Abbau und Recycling-Prozesse stellen Regulations- und Kontrollmechanismen für die Pflanze dar. Es wurde gezeigt, dass vor allem Ubiquitinierungs-Prozesse und der proteasomale Proteinabbau für Resistenzmechanismen von großer Bedeutung sind (Trujillo und Shirasu 2010). Auch verschiedene Transportproteine, wie z.B. ATP-abhängige Protonenpumpen, ABC-Transporter und Zuckertransporter haben verschiedenen Funktionen im Rahmen der Pathogenabwehr (Crouzet et al. 2006, Talbot 2010, Elmore und Coaker 2011).

Eine nach *P. infestans*-Behandlung verringerte Akkumulation wiesen v.a. Transkripte von Genen auf, deren Genprodukte in der Photosynthese oder im Zuckermetabolismus eine Rolle spielen. Dies wird v.a. in Pflanzen mit *pen2*-Hintergrund deutlich (s. 3.9.2). Im Vergleich zu *gll*-Pflanzen werden in *pen2*- und *pen2erp1*-Mutanten nach *P. infestans*-Behandlung deutlich mehr Gene differentiell exprimiert. Möglicherweise resultiert dies aus der transkriptionellen Aktivierung postinvasiver Resistenzmechanismen, die der Aufrechterhaltung der Nichtwirtsresistenz im *pen2*-Hintergrund dienen. Dabei zeichnete sich keine *pen2*-spezifische Regulation bestimmter Signalwege ab, wie das z.B. in *pen3-1*-Mutanten beobachtet wurde, die eine verstärkte Aktivierung SA-abhängiger Signalwege nach *Bgh*-Behandlung aufwiesen (Stein et al. 2006). Die Aktivierung zusätzlicher Komponenten der Pathogenabwehr in *pen2*-Mutanten geht mit der Reprimierung von Photosyntheseprozessen und des Primärmetabolismus‘ einher. Dass sich eine verstärkte Abwehr negativ auf Fitness und Wachstum der Pflanze ausübt, wurde bereits in mehreren Studien beobachtet (Koorneef und Pieterse 2008). Dies wird v.a. bei Betrachtung von Mutanten mit konstitutiv aktiver Abwehr deutlich, wie z.B. die *accelerated cell death 6 (acd6)*-Mutante, die zwar resistent und unempfindlich gegenüber *P. syringae*-Infektion ist, aber spontane Nekrosen und einen kleineren Wuchs aufweist (Rate et al. 1999).

Ca. 80% der nach *P. infestans*-Behandlung in *gll*- bzw. *erp1-3*-Pflanzen differentiell exprimierten Gene werden auch in *pen2*- und *pen2erp1*-Pflanzen nach Pathogeninfektion differentiell reguliert. Diese Gene sind möglicherweise an der basalen Resistenz gegenüber *P. infestans* beteiligt. So wurde z.B. für *PAD3* nach *P. infestans*-Behandlung in allen 4 Genotypen eine starke Transkriptakkumulation detektiert. *PAD3* kodiert das Cytochrom-P450-Enzym Cyp71B15, welches in die Pathogen-induzierte Synthese des antimikrobiellen Phytoalexins Camalexin involviert ist (Böttcher et al. 2009). Eine erhöhte Transkription von *PAD3* kann auch nach Behandlung mit avirulenten und nicht-adaptierten *P. syringae*-Stämmen, *Botrytis cinerea* und *G. orontii* beobachtet werden (www.genevestigator.com). Dementsprechend scheint *PAD3* in der Abwehrantwort gegenüber einem breiten Pathogenspektrum aktiviert zu werden. Zwar synthetisieren *pad3*-Mutanten kaum Camalexin nach Infektion mit *Pst*

DC3000, sind aber im Gegensatz zu anderen Phytoalexin-defizienten Mutanten nicht gleichzeitig anfälliger gegenüber diesen virulenten Bakterien (Glazebrook und Ausubel 1994, Glazebrook et al. 1996). Die Synthese von Camalexin führt also nicht zwingend zu einem Vorteil für die Pflanze. Auch die Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* war in *pad3*-Mutanten nicht beeinträchtigt (persönliche Kommunikation L. Westphal, IPB Halle). Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Fähigkeit von *P. infestans* darstellen, das nach Infektion gebildete und sekretierte Camalexin zu verstoffwechseln und damit zu entgiften (Böttcher et al. 2009). Im Hinblick auf die hohe Anpassungsfähigkeit von *P. infestans* (Haas et al. 2009) scheint es möglich, dass der Oomycet diese Fähigkeit evolutiv erworben hat. In einigen kompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen stellt die Fähigkeit zur Phytoalexin-Detoxifizierung einen Virulenzfaktor dar (Coleman et al. 2011, Pedras et al. 2011).

Interessanterweise geht die Reaktion von *pen2erp1-3*-Pflanzen auf *P. infestans* mit einer erhöhten Transkription von Genen mit Funktion in der Reaktion auf abiotischen Stress einher. Dabei kodieren allein 8 der 11 (6hpi) bzw. 12 (12 hpi) Gene mit erhöhter Transkriptakkumulation Hitzeshockproteine (HSPs). Die Expression von HSP-Genen wird unter Einwirkung verschiedener Stressfaktoren induziert (Swindell et al. 2007). Auch in der Nichtwirtsresistenz scheinen HSPs teilweise von Bedeutung zu sein. Die transkriptionelle Stilllegung von Hsp70 und Hsp90 in *N. benthamiana* führt zu einer herabgesetzten Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. cichorii* und außerdem zum Ausbleiben der INF1-induzierten HR (Kanzaki et al. 2003). Es wäre interessant zu testen, ob die erhöhte Aktivierung der HSP-Gene nach *P. infestans*-Infektion auch zu einer erhöhten Thermotoleranz von *pen2erp1*-Pflanzen führt und außerdem, ob ein Ausfall dieser Gene im *pen2erp1*- oder *erp1*-Hintergrund den *P. infestans*-induzierten *erp1*-Phänotyp beeinflusst. Da die HSP-Gene spezifisch in *pen2erp1*-Pflanzen differentiell exprimiert werden, scheint hier die Kombination der *erp1*- und *pen2*-Mutation von Bedeutung zu sein.

Die *erp1-3*-Mutation allein wirkt sich kaum auf die *P. infestans*-induzierte transkriptionelle Umprogrammierung in Arabidopsis aus. Vergleicht man nach *P. infestans*-Inokulation das Expressionsprofil der *erp1-3*-Einzelmutante mit dem Expressionsprofil von *gll*, *pen2* und *pen2erp1-3* zeigen nur wenige Gene eine *erp1-3*-spezifische differentielle Genexpression. Von diesen Genen stehen keine in einem offensichtlichen und direkten Zusammenhang mit den in *erp1-3*-Mutanten beobachteten *P. infestans*-induzierten Abwehrreaktionen oder dem veränderten Sterolprofil.

Offenbar wirkt sich die Mutation in *erp1-3* vorrangig auf die Stoffwechselwege der Sterolhomöostase aus und beeinflusst kaum die globale Genexpression, auch nicht nach Pathogeninfektion, zumindest zu den hier analysierten Zeitpunkten. Möglicherweise reflektieren die wenigen *erp1-3*-spezifisch regulierten Gene, die 6 bzw. 12 Stunden nach *P. infestans*-Infektion *erp1-3*-Pflanzen identifiziert wurden, den zu diesen frühen Zeitpunkten noch nicht ausgeprägten HR-Phänotyp. Eventuell wirkt sich die Mutation in *PSATI/ERP1* erst zu späteren Zeitpunkten, zu denen auch die *erp1-3*-spezifischen Abwehrreaktionen beobachtet werden konnten, auf die *P. infestans*-induzierte differentielle Genexpression aus. Die Analyse der globalen Genexpression zu späteren Zeitpunkten nach *P.*

infestans-Infektion könnte Signalwege und Mechanismen aufzeigen, die in Folge der Mutation in *PSAT1/ERP1* zu Zelltodreaktion und Callose-Deposition in Mesophyllzellen führen. Falls diese Mechanismen jedoch generell nicht auf transkriptioneller Ebene, sondern posttranskriptional oder posttranslational reguliert werden, würden zusätzliche Microarray-Analysen keinen weiteren Einblick in die Induktion der *erp1*-spezifischen Resistenzreaktionen ermöglichen.

4.5 FUNKTION UND LOKALISATION VON PSAT1/ERP1 IN ARABIDOPSIS

Im Rahmen dieser Studie konnte *PSAT1* (*At1g04010*) als das in den *erp1-3*- und *erp1-4*-Mutanten betroffene Gen identifiziert werden, dessen Störung zu deregulierten Callose-Ablagerungen und Zelltodreaktionen im Mesophyll *P. infestans*-behandelter Pflanzen führt. *PSAT1/ERP1* kodiert die Phospholipid: Sterol-Acyltransferase 1, welche eine Acyl-CoA-unabhängige Synthese von SEs aus FS katalysiert (s. 1.4.2). Mutationen in *PSAT1/ERP1* führen zu stark reduzierten SE-Mengen in Samen und Blättern adulter Arabidopsis-Pflanzen (Banas et al. 2005, Bouvier-Navé et al. 2010, eigene Daten s. 3.4). Während in den T-DNA-Insertionslinien *erp1-1* (*psat1-1*) und *erp1-2* (*psat1-2*) noch geringe SE-Mengen in Arabidopsis-Keimlingen und Blattextrakten adulter Pflanzen gemessen werden konnten (Banas et al. 2005, Bouvier-Navé et al. 2010, eigene Daten s. 3.4), wurden in den EMS-Mutanten *erp1-3*, *pen2erp1-3* und *pen2erp1-4* nur Spuren von SEs detektiert (s. 3.4, die Sterollipide in *erp1-4* wurden nicht untersucht). In früheren Studien wurde postuliert, dass die verbleibende SE-Akkumulation in *psat1*-Mutanten auf weitere im Blatt aktive SE-Synthasen zurückgeht, z.B. ASAT1 (Bouvier-Navé et al. 2010). Die Daten der vorliegenden Studie deuten jedoch eher darauf hin, dass es sich bei den T-DNA-Linien nicht um vollständige *loss of function*-Mutanten handelt, bei den EMS-Mutanten hingegen schon. Da sowohl in den T-DNA-Insertionslinien als auch in den EMS-Mutanten *PSAT1/ERP1*-Transkript nachgewiesen werden konnte, sollte in weiterführenden Analysen die Expression des PSAT1/ERP1-Proteins und dessen Aktivität in den *psat1/erp1*-Mutanten überprüft werden. Trotz eines spezifischen Antikörpers war es im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, PSAT1/ERP1 *in planta* nachzuweisen. Banas et al. (2005) konnten die Enzymaktivität von PSAT1 nur in mikrosomalen Membranfraktionen von PSAT1-überexprimierenden transgenen Arabidopsis-Linien analysieren. Möglicherweise ist die in Blättern von Wildtyp-Pflanzen vorliegende endogene PSAT1-Konzentration zu gering, um Aktivität oder Expression nachweisen zu können. Man könnte allerdings in Anlehnung an die Analysen von Banas et al. (2005) die Sterolestersyntheseaktivität in mikrosomalen Membranfraktionen Pro35S:*PSAT1/ERP1*- und Pro35S:*erp1-3*-exprimierender transgener *erp1-3*-Linien vergleichen, um zu überprüfen, ob die Punktmutation in *PSAT1/ERP1* tatsächlich zu einem vollständigen Ausfall der Enzymaktivität führt.

SE spielen eine entscheidende Funktion in der Regulation des FS-Gehalts in der Zelle. Kommt es zur Akkumulation von FS in Mengen, die den Bedarf der Zelle übersteigen, werden vermehrt SE gebildet (Banas et al. 2005). In Tabak-Mutanten mit stark erhöhter Sterolbiosynthese war die Bildung von SEs im Vergleich zum Wildtyp induziert und die vermehrt synthetisierten SE wurden in Lipidtröpfchen gespeichert (Maillot-Vernier et al. 1991, Gondet et al. 1994). In Arabidopsis-Wildtyppflanzen wurde

nach externer Zugabe von Squalen, einem Sterolbiosynthese-Vorläufermolekül, eine erhöhte SE-Akkumulation im Blatt beobachtet, die ebenfalls mit der vermehrten Bildung von Lipidtröpfchen einherging (Bouvier-Navé et al. 2010). Für *psat1*-Mutanten war die Squalen-Behandlung lethal, vermutlich aufgrund des fehlenden Entgiftungsmechanismus‘ für akkumulierende FS-Verbindungen.

Lipidtröpfchen dienen der Speicherung neutraler Lipide, zu denen neben SEs auch Triacylglyceride (TAG) gehören. Bouvier-Navé et al. (2010) zeigten, dass die Synthese und Akkumulation von TAGs in Samen von *PSAT1*-T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zu Wildtyppflanzen unverändert ist. Der TAG-Gehalt in Blättern von *erp1*-Mutanten wurde bisher nicht untersucht. Da im Blattgewebe von *erp1*-Mutanten im Unterschied zu *PSAT1/ERP1*-Pflanzen keine Lipidtröpfchen nachgewiesen werden konnten (s. 3.4), scheint die TAG-Synthese im Blatt entweder ebenfalls durch Mutationen in *PSAT1/ERP1* beeinträchtigt zu werden, oder aber die TAG-Akkumulation im Blatt ist zu gering, um im *erp1*-Hintergrund durch Nilrot-Färbung nachgewiesen werden zu können.

Die stark reduzierte Sterolestersynthese in *erp1*-Mutanten geht mit erhöhten SG- und FS-Mengen sowie einer verringerten Akkumulation von ASGs einher (s. 3.4). Mutanten mit beeinträchtigter SG- und ASG-Synthese zeigen im Gegenzug erhöhte Mengen an FS und SEs (DeBolt et al. 2009). Dementsprechend scheint ein regulatorischer Rückkopplungsmechanismus zwischen der Synthese freier bzw. veresterter und glycosylierter Sterole zu bestehen. Die erhöhte SG-Akkumulation in *erp1*-Pflanzen könnte einen alternativen Mechanismus zur Sterolestersynthese darstellen, um aus der Membran freigesetzte oder *de novo* synthetisierte FS zu konjugieren und möglicherweise zu detoxifizieren.

Die Synthese von SGs aus FS wird durch Sterolglycosyltransferasen (SGTs) katalysiert, deren Aktivität in Mais-Koleoptilen durch negativ geladene Phospholipide stimuliert wird (Ullmann et al. 1993). Da Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylethanolamin, als Acyl-Donor für die Synthese von SEs in Wildtyppflanzen dienen, wäre es möglich, dass in *erp1*-Mutanten Phospholipide akkumulieren und dadurch die SG-Synthese induziert wird. In *Sinapis alba* werden Sterolglycosidhydrolasen, die den Abbau von SGs katalysieren, durch neutrale Lipide stimuliert und durch Phospholipide inhibiert (Kalinowska und Wojciechowski 1985). Da *Arabidopsis* auch zu den Kreuzblütengewächsen gehört, ist ein ähnlicher Mechanismus vorstellbar, der in *erp1*-Mutanten zu einem reduzierten *turn-over* und somit einer verstärkten Akkumulation von SGs führt. Ob die erhöhte SG-Akkumulation auf einer Induktion der SG-Synthese und bzw. oder einem inhibierten SG-Abbau beruht, kann anhand der im Rahmen der vorliegenden Studie erhaltenen Daten nicht geklärt werden.

Die reduzierte ASG-Menge in Blättern von *erp1*-Pflanzen deutet eine Beeinträchtigung der ASG-Synthese aufgrund der Mutation in *PSAT1/ERP1* an. Bisher konnte keine Sterolglycosid-Acyltransferase (SGAT) aus Pflanzen kloniert werden, es wurde aber gezeigt, dass die Übertragung von Acyl-Resten auf SG Acyl-CoA-unabhängig erfolgt (Grille et al. 2010). Da auch *PSAT1/ERP1* die Übertragung von Fettsäuren unabhängig von Acyl-CoA katalysiert, könnte man eine duale Funktion von *PSAT1/ERP1* in der SE- und ASG-Synthese vermuten. Ob *PSAT1* allerdings in der Lage ist Acyl-

Gruppen auch auf Hydroxyl-Gruppen von Zuckermolekülen zu übertragen wurde bisher nicht gezeigt bzw. untersucht. In den *erp1*-EMS-Mutanten ist die Akkumulation von ASGs zwar deutlich reduziert, aber nicht so stark beeinträchtigt wie die SE-Akkumulation. Folglich scheinen noch andere Enzyme in die Synthese von ASGs involviert zu sein. Möglicherweise wird auch die Aktivität der SGATs in *erp1*-Mutanten durch akkumulierende SG, FS oder Phospholipide gehemmt. Ob tatsächlich Phospholipide oder Lysophospholipide in *erp1*-Mutanten akkumulieren wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Falls dem so wäre, könnte auch eine veränderte Phospholipid-vermittelte Signalweiterleitung in *erp1*-Mutanten für die veränderte Pathogenantwort von Bedeutung sein (Laxalt und Munnik 2002).

Die subzelluläre Lokalisation von PSAT1/ERP1 wird im ER vermutet (Athenstaedt und Daum 2006), da die beiden in Hefe identifizierten SE-Synthasen Are1p und Are2p im ER lokalisiert sind (Zweytick et al. 2000b) und außerdem der Nachweis der PSAT1-Enzymaktivität in mikrosomalen Membranen eine Lokalisation im Endomembransystem der Zelle unterstützt (Banas et al. 2005). Die *in silico* Vorhersagen zur Lokalisation von PSAT1/ERP1 waren nicht eindeutig, jedoch sagten die Programme SignalP 4.0 (Petersen et al. 2011) und TargetP 1.1 (Emanuelsson et al. 2000) eine 27 Aminosäuren lange hydrophobe Sequenz am N-Terminus von PSAT1/ERP1 voraus, die möglicherweise als Signalpeptid erkannt und im sekretorischen Weg der Proteinbiosynthese prozessiert wird. Trotz der Daten früherer Studien und der *in silico*-Vorhersagen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie keine ER-Lokalisation von PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsproteinen beobachtet. An Stelle dessen wurde in PSAT1/ERP1-GFP-exprimierenden Pflanzenzellen die GFP-Fluoreszenz in kleinen sphärischen und sich bewegenden Strukturen detektiert, deren Identität im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte. Die Bewegung der fluoreszierenden Strukturen konnte in ersten Vorexperimenten durch Behandlung mit Cytochalasin A nicht aber durch Colchicin inhibiert werden (Daten nicht gezeigt), was auf eine Aktinfilament-abhängige Bewegung hindeutet. In Hefe wurde beobachtet, dass einige Enzyme des Stoffwechsels neutraler Lipide sowohl in ER-Membranen als auch, bzw. z.T. nur, in Lipidtröpfchen aktiv sind (Sorger und Daum 2002, Daum et al. 2007). Eine mögliche Lipidtröpfchen-assoziierte Lokalisation von PSAT1/ERP1-GFP konnte allerdings in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien nicht gezeigt werden (s. 3.5.1).

Auch für die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoenzymA-Reduktase (HMGR), welche die Synthese von Mevalonat katalysiert, wurde eine ER-Lokalisation vorhergesagt, *in vivo* wurde allerdings eine duale Lokalisation im ER und in zytoplasmatischen sowie vakuolären Vesikeln unbekannter Herkunft beobachtet (Leivar et al. 2005). Es wurde postuliert, dass HMGR im ER synthetisiert und in dessen Membranen eingebaut wird und dass es sich bei den Vesikel-Strukturen um ER-Segmente handelt, die dem Transport der HMGR an die Orte der Mevalonat-Synthese dienen. Um zu überprüfen, ob die grün-fluoreszierenden Strukturen in PSAT1/ERP1-GFP-exprimierenden Epidermiszellen selben Ursprungs wie die HMGR-ER-Segmente sind, könnte eine Kolo-kalisation beider Proteine getestet werden. Außerdem ist für die Lokalisation der HMGR der N-Terminus des Proteins von Bedeutung (Leivar et al. 2005). Da in Vorexperimenten mit N-terminalen YFP-PSAT1/ERP1-Fusionsproteinen

z.T. nicht mehr die zuvor beobachtete Vesikel-assoziierte Fluoreszenz auftrat (s. Anhang 8.10), ist eine ähnliche Bedeutung des N-Terminus für die PSAT1/ERP1-Lokalisation vorstellbar. Diese könnte mit Hilfe der Fluoreszenz N-terminal deletierter PSAT1/ERP1-GFP-Versionen analysiert werden. Zusätzlich könnte getestet werden, ob ein bestimmter N-terminaler Abschnitt des PSAT1/ERP1-Proteins für eine gerichtete Lokalisation von GFP in den zytoplasmatischen Vesikeln ausreicht.

Die Lokalisationsstudien wurden in dieser Arbeit mit *PSAT1/ERP1-GFP*-Fusionen durchgeführt, die unter Kontrolle des 35S-Promotors konstitutiv exprimiert wurden. Eine Überexpression von PSAT1/ERP1 führt nicht zu einer erhöhten Sterolestersynthese und entsprechende transgene Pflanzen weichen morphologisch nicht vom Wildtyp ab (Banas et al. 2005, Bouvier-Navé et al. 2010). Außerdem wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine Komplementation der *erp1*-spezifische HR in transgenen Pflanzen beobachtet (s. 3.5.1). Dennoch könnte die starke Expression und der GFP-Anhang die Lokalisation und Aktivität des Proteins verändern. Die Expression von PSAT1/ERP1-GFP unter Kontrolle des endogenen Promotors oder eine Fusion mit einem kleineren Anhang, wie z.B. einem His-Tag, und der immunhistochemische Nachweis dieses Fusionsproteins könnte in zukünftigen Lokalisationsstudien getestet werden.

Unabhängig von der Lokalisation des PSAT1/ERP1-Enzyms, bestätigten die vergleichenden Analysen freier und konjugierter Sterolverbindungen in Blättern von *erp1*- und Kontrollpflanzen in der vorliegenden Arbeit die Beobachtungen und Hypothesen früherer Studien über die Bedeutung der Sterolestersynthese für die Aufrechterhaltung der zellulären Sterolhomöostase.

4.6 MÖGLICHE KONSEQUENZEN DER VERÄNDERTEN STEROLHOMÖOSTASE IN *PSAT1/ERP1*-DEFIZIENTEN PFLANZEN

Mutationen in *PSAT1/ERP1* führen zu einer veränderten Sterolhomöostase, die Sterolbiosynthese bleibt aber offensichtlich unbeeinträchtigt (s. Anhang 8.5). Anders als viele Sterolbiosynthese-Mutanten zeigen *erp1*-Pflanzen dementsprechend auch keine auffälligen Wachstums- oder Entwicklungsphänotypen. Auch für die Hefe-Doppelmutanten *are1are2* wurden trotz signifikant reduzierter SE-Level keine offensichtlichen Wachstumsstörungen unter Standardbedingungen beobachtet. Unter Stressbedingungen und beim Erreichen der stationären Wachstumsphase wiesen sie allerdings ein reduziertes Wachstum auf (Zweytick et al. 2000b). Die Fähigkeit zur SE-Bildung scheint demnach unter normalen Wachstumsbedingungen nicht essentiell, bei veränderten Wachstumsbedingungen in Stresssituationen und bestimmten Entwicklungsphasen jedoch von Vorteil zu sein.

In den folgenden Abschnitten werden mögliche Auswirkungen der beeinträchtigten Sterolestersynthese und der damit einhergehenden veränderten Sterollipid-Zusammensetzung in *erp1*-Pflanzen im Hinblick auf die entwicklungspezifische Blattseneszenz, Membraneigenschaften und die Interaktion mit Pathogenen diskutiert.

4.6.1 DIE ROLLE VON PSAT1/ERP1 WÄHREND DER BLATTALTERUNG

Die Arbeit von Bouvier-Navé et al. (2010) und eigene Daten deuten auf eine Funktion von PSAT1/ERP1 während der Alterungsprozesse in *A. thaliana* hin. Für alle *erp1*-Mutanten wurde eine im Vergleich zu den Kontrollpflanzen früher einsetzende Blattseneszenz beobachtet. Im Abschnitt 4.2 wurde bereits ein möglicher Zusammenhang zwischen Blattseneszenz und Pathogenabwehr diskutiert; hier soll nun beleuchtet werden, warum die Mutation in *PSAT1/ERP1* zur verfrühten Blattseneszenz führen könnte.

Die Blattseneszenz entspricht dem letzten Stadium der Blattentwicklung, dessen Einsetzen zum einen durch verschiedene interne Faktoren, z.B. das Blattalter und vorherrschende Phytohormon-Level, und zum anderen durch externe abiotische und biotische Einflüsse reguliert wird (Lim et al. 2007). Dabei ist die Blattalterung kein passiver und unkoordinierter Prozess, sondern umfasst streng regulierte und vielfältige Vorgänge, die einer Umverteilung von Nährstoffen aus dem seneszenten Blatt in andere, metabolisch noch aktive, Pflanzenorgane dienen (Lim et al. 2007). In seneszenten Blättern werden Reaktionen der Kohlenstoffassimilation eingestellt und durch den Abbau von Chlorophyll und Makromolekülen ersetzt. Außerdem werden Membranen degradiert, wobei Membranproteine, Lipide, Fettsäuren und Sterole freigesetzt werden (Lim et al. 2007). Die Mengen neutraler Lipide nehmen mit fortschreitender Seneszenz im Blatt zu, ebenso wie die Transkription von *PSAT1* und *DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE 1 (DGATI)*, deren Genprodukte die Synthese von SEs und TAGs katalysieren (Kaup et al. 2002, Bouvier-Navé et al. 2010). Erhöhte SE-Gehalte wurden ebenfalls während der Fruchtreife (Whitaker 1988, 1994) und in pflanzlichen Zellkulturen bei Erreichen der stationären Wachstumsphase (Dyas et al. 1991) beobachtet. In tierischen Geweben und Hefe stellen SEs die Transportform freier Sterole dar (Dyas und Goad 1993). Es wird angenommen, dass auch in Pflanzen die Synthese neutraler Lipide dem Recycling und Transport freigesetzter Membranbestandteile dient. Dabei könnten SE nicht nur der Speicherung und späteren Bereitstellung von Sterolen dienen, sondern auch der Kompartimentierung von FS, um vorzeitige Membranschäden während der regulierten Blattalterung zu vermeiden (Bouvier-Navé et al. 2010). Dementsprechend könnte man annehmen, dass der Verlust der PSAT1/ERP1-Aktivität mit fortschreitendem Blattalter in einer erhöhten Akkumulation von FS und Acyl-Resten resultieren, die bei Erreichen einer zytotoxischen Konzentration zum früheren Absterben des Blattes führt. Zwar scheint die erhöhte SG-Synthese in *erp1*-Mutanten einen kompensativen Mechanismus für die fehlende Sterolestersynthese darzustellen, allerdings sind SG im Gegensatz zu SEs Strukturkomponenten der Membran (Grille et al. 2010) und eine erhöhte SG-Konzentration könnte eine Störungen Membran-assoziiierter Vorgänge bewirken.

Während der Blattseneszenz scheint die PSAT1/ERP1-abhängige Sterolestersynthese die Funktionsfähigkeit von Zellmembranen zu gewährleisten und die Akkumulation zytotoxischer Membranbestandteile zu verhindern.

4.6.2 EINFLUSS FREIER UND KONJUGIERTER STEROLE AUF MEMBRANEIGENSCHAFTEN UND MEMBRAN-ASSOZIIERTE REAKTIONEN

Da Phytosterole und deren glycosylierte Konjugate, nicht aber SE, Komponenten der Membran sind und als solche Fließvermögen und Durchlässigkeit der Membran regulieren (Hartmann 1998), könnte die veränderte Sterolhomöostase in *erp1*-Mutanten die Eigenschaften von Zellmembranen beeinflussen.

Je nach Temperatur und Zusammensetzung können verschiedene Phasen der Lipiddoppelschichten unterschieden werden: flüssig (*liquid-disordered*), flüssig-kristallin (*liquid-ordered*)- und gelartig (*solid ordered*) (Beck et al. 2007). Die Phasenzustände werden durch den Sättigungsgrad der Acyl-Reste der Phospholipide, den Anteil an Sterolen, Sphingolipiden sowie Membranproteinen und die Temperatur beeinflusst. Plasmamembran-Mikrodomänen (*membrane rafts*) sind dynamische Membranbereiche, die aufgrund der stark geordneten Lipidstruktur sowie der Anreicherung von Sterolen und Sphingolipiden eine geringe Detergenzien-Löslichkeit aufweisen und damit der *liquid-ordered* Phase ähneln (Simon-Plas et al. 2011). Zwar sind Membranfraktionen, die aufgrund ihrer Detergenzien-Unlöslichkeit isoliert wurden (*detergent resistant domains*, DRMs) nicht mit funktionellen *membrane rafts* gleichzusetzen, bieten aber in Kombination mit anderen *in vivo* Analyse-Methoden eine gute Möglichkeit Zusammensetzung, Struktur und akkumulierende Proteine in Abhängigkeit von externen Stressfaktoren zu untersuchen.

In *erp1*-Mutanten sind die FS im Blatt im Vergleich zu den Kontrollpflanzen leicht erhöht, was anscheinend v.a. auf einer verstärkten Akkumulation von Sitosterol und Campesterol beruht (s. 3.4 und Anhang 8.5). Für Sitosterol wurde ein stark ordnender Effekt auf Lipidseitenketten pflanzlicher Liposomen beobachtet, der mit einer effizienten Verringerung der Wasserpermeabilität synthetischer Phosphatidylcholin-Doppelschichten einherging (Schuler et al. 1991). In DRMs aus Tabakblättern und -Zellkultur wurde eine Anreicherung von Glycosylceramiden, Stigmasterol, Sitosterol und Cholesterol beobachtet (Mongrand et al. 2004). In Arabidopsis-Keimlingen und Lauch wurden neben FS und Glycosylceramiden auch vermehrt SG in DRMs nachgewiesen (Laloi et al. 2007). Die veränderte Sterolhomöostase in *erp1*-Mutanten könnte demnach die Komposition von Membran-Mikrodomänen beeinflussen. Möglicherweise führt die verstärkte Akkumulation von Sitosterol und SGs in *erp1*-Mutanten zu rigideren Zellmembranen und zu einem höheren Anteil *raft*-ähnlicher Membranphasen. Dadurch könnte zwar die Fluktuation membranständiger Proteine im Normalzustand der Zelle erschwert, aber die Stress-induzierte räumliche Assoziation von Signalproteinen in *membrane rafts* erleichtert werden. Die verstärkte Abwehrreaktion der *erp1*-Mutanten gegenüber *P. infestans* könnte somit auf einem erhöhten Reaktionspotential Membran-assoziiierter Signaltransduktionsprozesse beruhen.

Membrane rafts ermöglichen eine zeitliche und räumliche Organisation von Membranproteinen und bieten somit eine Plattform für Proteininteraktionen und die Weiterleitung perzipierter Signale (Mongrand et al. 2010, Simon-Plas et al. 2011). Dabei scheint die Assoziation von Membranproteinen

mit DRMs durch den Empfang externer Signale induziert zu werden (Simon-Plas et al. 2011). Keinath et al. (2010) beobachteten nach Behandlung von Arabidopsis-Zellkulturen mit dem bakteriellen Elicitor flg22 eine Veränderung der Proteinzusammensetzung in den DRMs, wobei v.a. RLKs, darunter FLS2, und andere Signalproteine akkumulierten. In unbehandelten Zellen lag FLS2 hingegen hauptsächlich in Detergenzien-löslichen Membranphasen vor. Proteine, die konstitutiv in DRMs nachgewiesen wurden, sind vermutlich in unbehandelten Zellen inaktiv und werden erst nach Signalperzeption und dadurch induzierte Rekrutierung und Oligomerisierung anderer Signalkomponenten aktiviert (Simon-Plas et al. 2011). Da *erp1*-Mutanten kein verändertes Wachstum auf flg22-haltigem Medium zeigen und die Expression flg22-responsiver Gene im *erp1*-Hintergrund nicht verändert ist, scheint die veränderte Sterolkomposition in *erp1*-Pflanzen zumindest die FLS2-vermittelte Signalweiterleitung nach flg22-Perzeption nicht zu beeinträchtigen. Weitere PAMPs könnten in zukünftigen Analysen getestet werden.

Die *erp1*-spezifischen zellulären Abwehrreaktionen wurde nach Infektion mit *P. infestans*, *Bgh* und *C. higginsianum*, aber nicht nach Infektion mit Bakterien, nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass die veränderte Sterolkomposition in *erp1* speziell die Abwehrreaktion gegenüber penetrierenden Pathogenen verändert. Als Ergänzung der bereits vorliegenden Daten könnte zum einen die zelluläre Reaktion und die Expression von Signalkomponenten nach Perzeption Pilz-spezifischer PAMPs, wie z.B. Chitin, in *erp1*-Mutanten untersucht werden. Zum Anderen könnte die fokale Akkumulation von Komponenten der Penetrationsresistenz nach Infektion mit penetrierenden Pathogenen über die Zeit verfolgt werden, um mögliche Veränderungen im Verlauf zellulärer Reaktionen zu beobachten.

In der kompatiblen Interaktion von Gerste mit *Bgh* wurde neben der fokalen Akkumulation von MLO-YFP, PEN1- und ROR1-GFP auch eine lokale Anreicherung von Sterolen in der Plasmamembran penetrierter Epidermiszellen nachgewiesen und mit der Pathogen-induzierten Bildung von Plasmamembran-Mikrodomänen in Verbindung gebracht (Bhat et al. 2005). Die Sterolakkumulation unterhalb von Penetrationsstellen wurde mit Hilfe des Sterol-bindenden fluoreszierenden Antibiotikums Filipin visualisiert (Martin und Konopka 2004). Auch im Rahmen dieser Studie wurde die Filipin-Fluoreszenz nach *P. infestans*-Behandlung in *erp1*- und Kontrollpflanzen untersucht, es konnte jedoch aufgrund der relativ starken Hintergrundfärbung pflanzlicher Plasmamembranen und Hyphenstrukturen keine spezifische Akkumulation im Bereich der Penetrationsstellen beobachtet werden. Des Weiteren sollte die fokale Akkumulation von PEN3-GFP im *pen3*- und *erp1pen3*-Hintergrund analysiert werden. Diese Experimente waren aufgrund starker *Silencing*-Effekte in der Kreuzungsnachkommenschaft jedoch nicht aussagekräftig.

Für das Plasmamembranprotein Remorin (REM) wurde in Tabakzellen eine DRM-assoziierte Lokalisation beobachtet, die bei gestörter Sterolbiosynthese nicht mehr vorlag (Raffaele et al. 2009). Mit Hilfe von REM-GFP-Fusionsproteinen im *erp1*- und Wildtyp-Hintergrund ließe sich überprüfen,

ob die veränderte Sterolkomposition im *erp1*-Blattgewebe die Verteilung dieses Plasmamembranproteins beeinflusst.

Mutationen in PSAT1/ERP1 scheinen nicht nur die Sterolestersynthese, sondern auch die Acylierung von SGs zu beeinträchtigen (s. 3.4). Zwar sind die ASG-Mengen in Blättern von *erp1*-Pflanzen nicht so stark reduziert wie die SE-Mengen, die im Vergleich zu den Kontrollpflanzen signifikant verringerte ASG-Akkumulation könnte dennoch die Membraneigenschaften beeinflussen. So wurde z.B. gezeigt, dass bei Phosphatmangelbedingungen in Hafer-Wurzeln ein großer Teil der Plasmamembran-Phospholipide durch Digalactosyldiacylglycerin (DGDG) ersetzt werden, während in den stark geordneten DRMs v.a. ASGs diese Funktion übernehmen (Andersson et al. 2003, Tjellstrom et al. 2010). Im Vergleich zu Galactolipiden sind ASGs offensichtlich besser geeignet den hohen Ordnungsgrad der Lipide in DRMs aufrecht zu erhalten, da sie ähnlich wie z.B. Sitosterol die Beweglichkeit der Fettsäureketten von Membranlipiden einschränken (Tjellstrom et al. 2010). Phosphatmangel führt auch in Arabidopsis zu Veränderungen in der Membranlipid-Zusammensetzung und Wewer et al. (2011) zeigten, dass in Blättern zusätzlich zu ASGs auch verstärkt SGs und SEs akkumulieren. Aufgrund des ordnenden Einflusses von ASGs auf Plasmamembran-Lipide wird für große ASG-Mengen außerdem ein negativer Effekt auf Membranen bei Kälte postuliert (Palta et al. 1993, Uemura und Steponkus 1994). Allerdings enthalten sowohl frosttolerante als auch frostanfällig Kartoffelarten große Mengen acylierter Sterolglycoside in der Membran (Palta et al. 1993) und die Arabidopsis *ugt80A2ugt80B1*-Doppelmutante zeigte sowohl bei Kälte als auch bei normalen Temperaturen ein leicht verringertes Wachstum (DeBolt et al. 2009). Ob die verminderten ASG-Mengen in *erp1*-Pflanzen zu einer erhöhten Frost- bzw. Kältetoleranz oder einem reduzierten Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen führt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Generell würde die Analyse der Reaktion von *erp1*-Mutanten auf abiotischen Stress die bisherigen Daten ergänzen und eventuell einen tieferen Einblick in die Rolle der PSAT1/ERP1-abhängigen Sterolestersynthese in der pflanzlichen Entwicklung unter Einwirkung verschiedener Stressfaktoren ermöglichen.

Die Sterollipid-Analysen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Gesamt-Lipid-Extrakten aus Arabidopsis-Blättern durchgeführt. Die bisher angenommenen und diskutierten Veränderungen der Sterollipid-Zusammensetzung in Membranen der *erp1*-Mutanten sind rein spekulativ und sollten in weiterführenden Untersuchungen mit Membranfraktionen überprüft werden.

4.6.3 PHYTOSTEROLE UND STEROLKONJUGATE IN DER PFLANZLICHEN PATHOGENABWEHR

Oomyceten der Gattungen *Phytophthora* und *Pythium* sind nicht in der Lage Sterole zu synthetisieren, da ihnen im Vergleich zu den Sterol-prototrophen Oomyceten die genetische Information für einige Schlüsselenzyme der Sterolbiosynthese, z.B. Cytochrom-P450-Enzyme der Gruppe CYP51, fehlt (Tyler et al. 2006, Gaulin et al. 2010). Bereits seit 1964 ist bekannt, dass Phytosterole das Wachstum und die Reproduktion von *Phytophthora*- und *Pythium*-Arten induzieren (Hendrix 1970). Um

Sterolverbindungen aus den Membranen der Wirtspflanze zu nutzen, sekretieren *Phytophthora*-Arten Sterol-Carrier-Proteine, die aufgrund ihrer Zelltod-induzierenden Wirkung in Tabak als Elicitine bezeichnet wurden (Ricci et al. 1989, Mikes et al. 1998). Infestin1 (INF1) wurde in *P. infestans*-als hauptsächlich sekretiertes Elicitin identifiziert (Kamoun et al. 1997b).

Die Abhängigkeit von *P. infestans* von verfügbaren Phytosterolen legte nahe, dass die veränderte Sterolhomöostase in *erp1*-Pflanzen die Interaktion mit dem Oomyceten direkt beeinflusst. Liegen in der Membran von *erp1*-Mutanten mehr FS als in Wildtyppflanzen vor, könnte dies das Wachstum von *P. infestans* begünstigen, wodurch wiederum verstärkt Abwehrreaktionen induziert werden würden. Diese Hypothese konnte im Rahmen der vorliegenden Studie jedoch nicht bestätigt werden. Zum einen wurde kein verstärktes Wachstum von *P. infestans* auf *erp1*-Pflanzen beobachtet (Daten nicht gezeigt), und zum anderen wurden die *erp1*-spezifischen Abwehrreaktionen sowohl durch Infektion mit einem INF1-defizienten *P. infestans*-Isolat als auch in der Interaktion mit *Bgh* und *C. higginsianum* induziert. Außerdem wurde nach Infektion mit *P. infestans* eine verringerte Akkumulation von FS in *erp1*- und Kontrollpflanzen beobachtet, was der Annahme einer erhöhten Sterolverfügbarkeit in *erp1*-Mutanten widerspricht. Andererseits könnte die verminderte FS-Menge in Blättern *P. infestans*-behandelter Pflanzen auf einen Verbrauch der verfügbaren Membransterole durch den Oomyceten oder die Pathogen-induzierte Synthese sekundärer Pflanzenstoffe oder von Brassinosteroiden aus FS zurückgehen. In Kartoffel wurde z.B. gezeigt, dass Glykoalkaloide vorrangig aus Cholesterol synthetisiert werden (Sitbon et al. 2003).

Interessanterweise induzierte die Infektion mit *P. infestans* sowohl in Arabidopsis als auch in Kartoffel eine verstärkte SE-Akkumulation, die anderen Klassen der konjugierten Sterole sind hingegen nicht verändert. In Arabidopsis scheint die *P. infestans*-induzierte SE-Synthese spezifisch auf die Aktivität von PSAT1/ERP1 zurückzugehen, die vermutlich posttranskriptionell nach Infektion induziert wird. Zumindest war nach Behandlung mit *P. infestans* in Arabidopsis keine erhöhte PSAT1/ERP1-Transkriptakkumulation zu beobachten (s. 3.3) und in Kartoffel war die Expression des homologen Gens *StPSAT* sogar reprimiert (s. 3.10.1).

Zur Untersuchung der Funktion von StPSAT1 in der Wirtsinteraktion von Kartoffel und *P. infestans* wurden StPSAT-RNAi-Linien erzeugt, wobei jedoch in keiner dieser Linien eine effektive Reduktion der *StPSAT1*-Transkription erzielt wurde (s. 3.10.3). Dies deutet möglicherweise auf eine essentielle Funktion des Enzyms in Kartoffel hin, die bei völligem Ausfall in einem lethalen Phänotyp resultiert.

Keine der RNAi-Linien zeigte trotz der z.T. von den Kontrollen abweichenden Sterollipid-Zusammensetzung eine veränderte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* (s. Anhang 8.6). Scheinbar ist die leicht veränderte Sterollipid-Zusammensetzung in diesen Linien für die Interaktion mit *P. infestans* nicht von Bedeutung. Auch in früheren Studien wurde kein direkter Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Sterollipide von Blättern verschiedener Kartoffel- und Tomatensorten und deren Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber *P. infestans* beobachtet (Langcake 1974, Bradford et al. 1981, 1982).

Die ektoische Expression von AtPSAT1/ERP1 in Kartoffel resultierte weder in einer veränderten Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* noch in einem konstitutiv veränderten Sterolprofil (s. 3.10.2). PSAT1/ERP1 scheint in Kartoffel nicht funktional zu sein, oder endogene Mechanismen führen zu einer Aufrechterhaltung der Sterolhomöostase in transgenen Kartoffel-Linien.

Da die *erp1*-spezifischen Abwehrreaktionen nicht ausschließlich in der Nichtwirtsinteraktion mit *P. infestans* induziert wurden und das Sterollipid-Profil in Kartoffel- und Arabidopsis-Blättern offensichtlich nicht die Virulenz von *P. infestans* beeinflusst, scheint die Sterolestersynthese eine eher grundlegende Funktion in der Reaktion auf biotischen Stress zu haben. Möglicherweise dient sie, ähnlich wie während der Blattseneszenz, der Kompartimentierung und Detoxifizierung von Sterolen und Fettsäuren, die im Rahmen eines programmierten Zelltods aus Membranen freigesetzt werden.

Wie bereits in Abschnitt 4.6.2 diskutiert wurde, wird der Phasenzustand pflanzlicher Membranen nicht nur durch den Anteil der verschiedenen Sterollipidklassen an der Gesamtheit der Sterolverbindungen sondern auch durch die verschiedenen Arten von Sterolmolekülen beeinflusst. Die Synthese der vier Hauptsterole Sitosterol, Stigmasterol, Campesterol und Cholesterol wird dabei hauptsächlich durch die Aktivität der Sterol-Methyltransferasen (SMTs) und von Enzymen der Cytochrom-P450-Familie reguliert. Die SMTs katalysieren die Alkylierung der Sterolseitenkette und regulieren damit die Menge an 24-Methyl- und 24-Ethyl-Sterolen und des unmethylierten Cholesterols (Diener et al. 2000, Schaeffer et al. 2001). In Arabidopsis und Tomate wurden mehrere Vertreter der CYP710A-Enzymfamilie als C22-Desaturasen identifiziert, wobei speziell CYP710A1 die Umwandlung von β -Sitosterol zu Stigmasterol katalysiert (Morikawa et al. 2006).

In zwei unabhängigen Studien wurde eine erhöhte *CYP710A1*-abhängige Akkumulation von Stigmasterol in Arabidopsis-Blättern nach Bakterienbefall beobachtet (Griebel und Zeier 2010, Wang et al. 2012). Dabei wurden allerdings gegensätzliche Effekte des erhöhten Stigmasterol-Gehalts auf Bakterienwachstum beobachtet: In der Studie von Griebel und Zeier (2010) wiesen *cyp710A1*-Mutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber virulenten und avirulenten *P. syringae*-Stämmen auf, die Interaktion mit einem Nichtwirts-Stamm war hingegen nicht verändert. Es wurde postuliert, dass Stigmasterol aufgrund der ungesättigten Seitenkette die Durchlässigkeit der Membran erhöht und möglicherweise Membran-assoziierte Abwehrreaktionen zu Gunsten der Bakterien beeinträchtigt. Wang et al. (2012), die u.a. mit einer anderen *cyp710A1* T-DNA-Insertionslinie als Griebel und Zeier (2010) arbeiteten, beobachteten hingegen ein stärkeres Wachstum virulenter, avirulenter und nicht-adaptierter Bakterien auf Mutanten mit verringerter Stigmasterol-Akkumulation. Da diese Mutanten z.T. auch einen erhöhten Ionen- und Nährstoffausstrom nach Pathogeninfektion zeigten, wurde spekuliert, dass eine Zunahme der Stigmasterol-Menge die Durchlässigkeit der Membran reduziert.

Ungeachtet der bisher unverstandenen Funktion, wird die *CYP710A1*-abhängige Stigmasterolbildung nicht nur durch bakterielle Pathogene sondern auch nach PAMP-Perzeption, ROS-Akkumulation und in der Interaktion mit dem nekrotrophen Pilz *B. cinerea* induziert (Griebel und Zeier 2010). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit führte auch die Behandlung mit *P. infestans* zu einem Anstieg des

Stigmasterol-Gehaltes in Arabidopsis- und Kartoffelblättern. Scheinbar stellt die Umwandlung von β -Sitosterol zu Stigmasterol einen evolutiv konservierten Mechanismus der pflanzlichen Immunantwort dar.

Möglicherweise ist die erhöhte SE-Akkumulation nach *P. infestans*-Infektion eine direkte Folge der Pathogen-induzierten Stigmasterol-Synthese. So konnte z.B. in allen untersuchten Sterollipidklassen ein erhöhter Anteil von Stigmasterol nach Pathogeninfektion beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Griebel und Zeier (2010) zeigten, dass in mikrosomalen und Plasmamembran-Fractionen ein ähnlich erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol vorliegt, wie in Gesamt-Blatt-Extrakten beobachtet wurden. Dies wiederum deutet darauf hin, dass die nach Pathogeninfektion synthetisierten Stigmasterol-Moleküle auch tatsächlich in die Membran integriert werden. Weder Griebel und Zeier (2010) noch Wang et al. (2012) untersuchten jedoch außer Sito- und Stigmasterol andere Sterolverbindungen oder den Anteil der verschiedenen Sterollipidklassen an der Gesamtsterol-Menge im Blatt oder in Membran-Fractionen.

Sollten hohe Stigmasterol-Mengen tatsächlich in einer höheren Membrandurchlässigkeit resultieren und dadurch das Pathogenwachstum begünstigen, wäre vorstellbar, dass Pflanzen im Laufe der Evolution Mechanismen entwickelt haben um dem entgegenzuwirken. Ein solcher Mechanismus wäre z.B. die Sterolestersynthese mit der Funktion zu hohe und möglicherweise schädigende Sterolkonzentrationen in der Membran zu vermeiden. Virulente Pathogene könnten wiederum die Fähigkeit erworben haben, diese Resistenzreaktion zu unterdrücken. Es wäre interessant zu testen, ob auch bakterielle Pathogene und PAMPs eine erhöhte der SE-Akkumulation hervorrufen und ob Unterschiede nach Infektion mit adaptierten und nicht-adaptierten bakteriellen sowie pilzlichen Pathogenen mit verschiedenen Lebensweisen auftreten.

Insgesamt zeigen die Daten aus der Literatur und der vorliegenden Arbeit, dass in Pflanzen infolge eines Pathogenbefalls Synthese und Konjugation der Phytosterole differentiell reguliert werden. Die Pathogen-induzierte Akkumulation bestimmter Sterolverbindungen scheint dabei keine direkte Signalfunktion in der Pathogenabwehr zu haben, sondern vielmehr der Regulation von Membraneigenschaften zu dienen. Ob die beobachteten Veränderungen den Krankheitsverlauf oder die Resistenzprägung begünstigen, konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden und hängt möglicherweise von der Lebensweise und den Ansprüchen verschiedener Pathogene ab.

4.7 MODELLVORSTELLUNG ÜBER DIE ENTWICKLUNG DES SPEZIFISCHEN NICHTWIRTSRESISTENZ-PHÄNOTYPS *PSAT1/ERP1*-DEFIZIENTER PFLANZEN

In *A. thaliana* tragen zahlreiche Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Nichtwirtsresistenz gegenüber *P. infestans* bei. Die Perzeption des Oomyceten induziert lokale Abwehrreaktionen, die mit der Akkumulation von ROS, der Expression von Komponenten der Penetrationsresistenz, gerichteten zellulären Umlagerungsprozessen, damit verbundenen Transport- und Sekretionsvorgängen sowie Zellwandverstärkungen einhergehen, mit dem Ziel die Penetration zu verhindern (Huitema et al. 2003, Nürnberger und Lipka 2005, Hardham et al. 2007, Kwon et al. 2008a). Außerdem könnten auch, in

Analogie zu anderen und besser charakterisierten Pathosystemen, ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Gehalts nach *P. infestans*-Behandlung auftreten. Im seltenen Fall der erfolgreichen Penetration werden Mechanismen der postinvasiven Resistenz aktiviert, die im Rahmen einer HR zum programmierten Zelltod der penetrierten Zelle führen, wodurch dem hemibiotrophen *P. infestans* in frühen Phasen der Entwicklung die Lebensgrundlage entzogen und so ein weiteres Wachstum auf der Nichtwirtspflanze effektiv unterbunden wird (Lipka et al. 2005).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine weitere Reaktion in der Nichtwirtsinteraktion von Arabidopsis mit *P. infestans* identifiziert: die PSAT1/ERP1-abhängige Synthese von SEs und die damit verbundene Regulation der Sterolhomöostase im Blatt.

Eine Akkumulation von SEs wurde bisher in seneszenten Organen verschiedener Pflanzenspezies, in Pflanzenzellkulturen beim Erreichen der stationären Phasen und bei Wachstum unter Phosphatmangelbedingungen beobachtet (Dyas und Goad 1993, Zweytick et al. 2000b, Bouvier-Navé et al. 2010, Wewer et al. 2011). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde erstmals eine Pathogen-induzierte SE-Akkumulation gezeigt. Die stark beeinträchtigte Sterolestersynthese in *PSAT1/ERP1*-defizienten Pflanzen geht mit einer früheren Blattseneszenz und verstärkten Zelltodreaktionen sowie deregulierten Callose-Depositionen nach Infektion mit penetrierenden Pathogenen einher.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Reaktionen, die in *erp1*-Mutanten möglicherweise zu der verfrühten Blattseneszenz und den verstärkten Abwehrreaktion führen und in *gli*-Pflanzen die Wildtyp-Situation aufrecht erhalten, sind in Abbildung 4-1 zusammengefasst.

Die Vorgänge der Blattseneszenz und der HR sind sich im Hinblick auf die Induktion und die Abläufe des programmierten Zelltods relativ ähnlich (Lim et al. 2007). Beide Prozesse involvieren die Akkumulation von ROS, veränderte Ionenströme und den Abbau von Zellbestandteilen. Außerdem könnte die PSAT1/ERP1-abhängige Sterolestersynthese in beiden Vorgängen dem Aufrechterhalten der Sterolhomöostase in Zellmembranen und somit der Vermeidung vorzeitiger Zellschädigungen dienen. Möglicherweise beruht sowohl die frühere Blattseneszenz als auch der veränderte HR-Phänotyp der *erp1*-Mutanten auf dem Verlust dieses Schutzmechanismus‘.

Die Fähigkeit FS zu acylieren und zu kompartimentieren ist in *PSAT1/ERP1*-defizienten Pflanzen im Vergleich zu Wildtyppflanzen stark herabgesetzt. Dies scheint unter Normalbedingung und bis zum Erreichen eines gewissen Alters das Wachstum und die Entwicklung der *erp1*-Pflanzen nicht zu beeinträchtigen. In Situationen in denen vermehrt FS synthetisiert oder aus der Membran freigesetzt werden, scheint der Verlust der Sterolestersynthese hingegen zu Zellschädigungen und Zelltod zu führen. Ob diese Reaktionen auf einer Signalfunktion akkumulierender Sterolverbindungen oder aber auf der veränderten Sterolhomöostase in Zellmembranen beruht, konnte im Rahmen der vorliegenden Studie nicht geklärt werden.

In tierischen Systemen spielt Cholesterol eine Rolle in der zellulären Signalweiterleitung. Proteine der HEDGEHOG (Hh) Familie sind für die normale Entwicklung von Menschen, Mäusen und Drosophila von Bedeutung (Edwards und Ericsson 1999). Erst nach der Bindung von Cholesterol an das Hh-

Protein kann die autokatalytische Spaltung erfolgen, die für die Signalweiterleitung nötig ist (Porter et al. 1996). Auch für Phytosterole ist eine Funktion als Signalkomponente denkbar. In der *fackel*-Mutante akkumulieren neuartige Sterole und Sterolbiosynthese-Zwischenprodukte, aber lediglich eine Klasse dieser untypischen Sterole (8,14-Diensterole) beeinflusste die Expression bestimmter Gene, deren Genprodukte in Prozesse der Zellvergrößerung und -teilung involviert sind (He und Gan 2002). Das Genexpressionsprofil der *erp1-3*-Mutante weicht jedoch weder konstitutiv noch nach *P. infestans*-Infektion stark von dem der Kontrollpflanzen ab. Da auch Griebel und Zeier (2010) eine direkte Signalfunktion der akkumulierenden Stigmasterol-Moleküle bezweifelten, ist anzunehmen, dass auch die *erp1*-spezifischen Phänotypen primär auf veränderten Membraneigenschaften beruhen, die wiederum andere Signalweiterleitungsprozesse beeinflussen könnten. Diese Annahme sollte allerdings in zukünftigen Untersuchungen überprüft werden. So könnte z.B. die Durchlässigkeit der Membranen unbehandelter- und *P. infestans*-behandelter *erp1*- und Kontrollpflanzen mit Hilfe von Leitfähigkeitsmessungen untersucht werden (Methode nach Dellagi et al. 1998). Außerdem könnte der pH der apoplastischen Waschflüssigkeit von *erp1*-Mutanten und Kontrollpflanzen nach Pathogeninfektion verglichen werden.

Interessanterweise kann die *erp1*-spezifische Zelltodreaktion und die damit verbundene deregulierte Callose-Deposition erst bei Verwendung relativ hoher *P. infestans*-Sporenkonzentrationen beobachtet werden. Außerdem treten diese Reaktionen nicht unmittelbar nach Pathogeninfektion auf, sondern werden erst im Verlauf der Pflanze-Pathogen-Interaktion induziert. Die *erp1*-spezifischen zellulären Reaktionen konnten erst 3 Tage nach *P. infestans*- bzw. 6 Tage nach *Bgh*-Behandlung beobachtet werden. Möglicherweise können *erp1*-Planzen bei biotischem Stress über eine gewisse Zeit oder bis zum Erreichen einer gewissen Infektionsstärke den Normalzustand der Zelle aufrechterhalten und erst wenn diese Schwellen überschritten werden, kommt es zur Ausprägung des Sterolestersynthese-Defekts. Andererseits wäre es möglich, dass erst die Infektion mit hoch konzentrierten *P. infestans*-Sporensuspensionen Zelltodreaktionen induziert und erst dann der Verlust der Sterolestersynthese andere Zellfunktionen beeinflusst.

Arabidopsis reagiert mit einer erhöhten Stigmasterol-Synthese auf die Infektion mit *P. infestans* und anderen Pathogenen (Griebel und Zeier 2010, Wang et al. 2012, eigene Daten). Ein Anstieg des Stigmasterol/Sitosterol-Verhältniss‘ konnte in Kontroll- und *erp1*-Pflanzen beobachtet werden (s. 3.4). Während aber in den Kontrollpflanzen gleichzeitig die SE-Menge nach *P. infestans*-Infektion ansteigt, ist dieser Regulationsmechanismus in *erp1*-Mutanten gestört. Es wäre demnach möglich, dass nach Pathogeninfektion freigesetzte und de novo synthetisierte FS über die Zeit akkumulieren und erst beim Erreichen einer gewissen Menge membran- oder zellschädigend wirken.

Die *erp1*-spezifische Abwehrreaktion könnte demnach auf einer zusätzlichen Beeinträchtigung der Membranzusammensetzung nach Pathogeninfektion beruhen. Es wäre vorstellbar, dass die veränderte Sterolhomöostase nicht nur zur Störung der Plasmamembran führt, sondern auch das Endomembransystem und Membranen der Mitochondrien, Plastiden sowie der Peroxisomen

beeinflusst. Chloroplasten sind Entstehungsort von Signalmolekülen, wie z.B. ROS, Stickstoffoxid und der Hormone SA und JA (Coll et al. 2011). Auch in Peroxisomen werden im Rahmen von Entgiftungsreaktionen ROS und andere Signalmoleküle gebildet (Nyathi und Baker 2006). Kommt es einer Schädigung dieser Organellen, werden diese Signalmoleküle freigesetzt und tragen zu einer Amplifikation der Pathogen-induzierten Abwehrmechanismen bei. Möglicherweise führen solche Mechanismen zu der verstärkten HR von *erp1*-Pflanzen.

Sollte in *erp1*-Mutanten die Membranpermeabilität erhöht sein, könnten die während der HR freigesetzten diffusiblen Signale, wie z.B. Ca^{2+} oder H_2O_2 , möglicherweise bis ins Mesophyll vordringen, wo sie wiederum Abwehrreaktionen induzieren, die mit Zelltodreaktionen und Callose-Synthese einhergehen. Da gezeigt wurde, dass bestimmte Membransterole auch die Aktivität von membranständigen Enzymen beeinflussen können (Carruthers und Melchior 1986, Cooke und Burden 1990, Grandmougin-Ferjani et al. 1997), wäre ein direkter Einfluss der veränderten Sterolhomöostase in *erp1*-Mutanten auf die Aktivität von Callosesynthasen denkbar. Andererseits könnten die verstärkt freigesetzten Abwehrsignale die entsprechenden Callosesynthasen auf bisher noch unbekannt Weise aktivieren.

Basierend auf diesen Hypothesen könnte die in *pen2erp1*-Mutanten im Vergleich zu *pen2*-Mutanten verstärkte HR und Callose-Deposition auf einem additiven Effekt der *pen2*-abhängigen HR, die aufgrund der herabgesetzten Penetrationsresistenz induziert wird, und den *erp1*-spezifischen Abwehrantworten, die aufgrund des Defekts in der Sterolestersynthese nach Pathogenbefall induziert werden, beruhen.

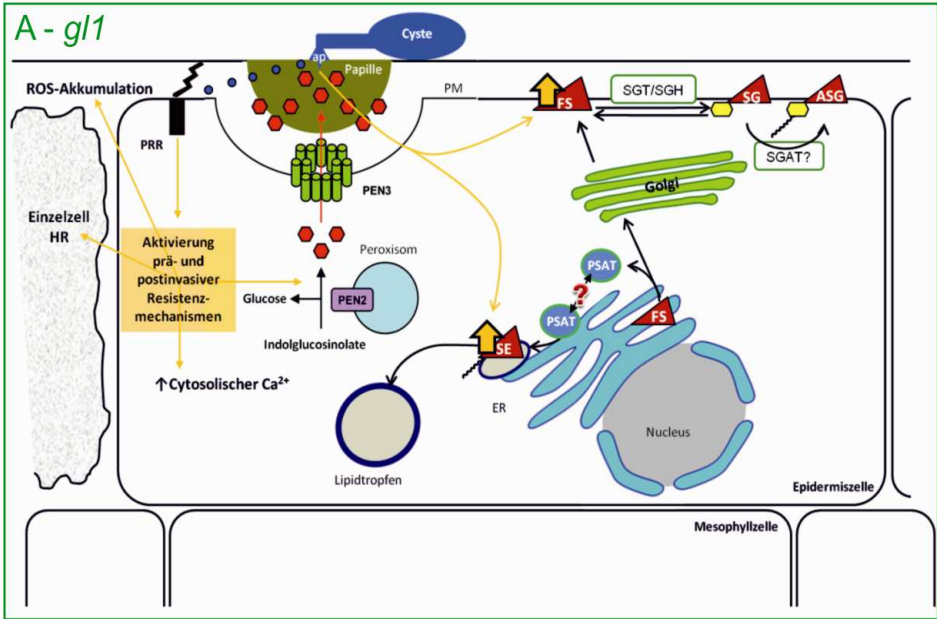
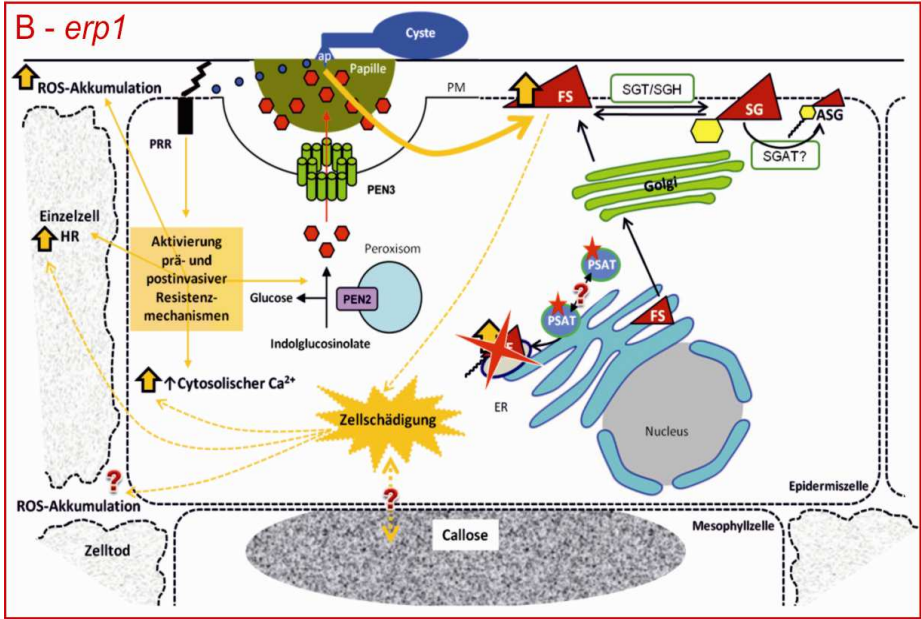


Abbildung 4-1. Modell über die Bedeutung der Sterolhomöostase in der Nichtwirtsrestistenz gegenüber *P. infestans*.
(A) In *gl1*-Pflanzen tragen die Komponenten der prä- und postinvasiven Abwehr zu Nichtwirtsrestistenz bei. *P. infestans*-induzierte Abwehrreaktionen sind durch gelbe Pfeile gekennzeichnet. Die Perzeption von *P. infestans* induziert den Einstrom von Calcium-Ionen, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und die Bildung von Papillen im Bereich der versuchten Penetration. Bei erfolgreicher Penetration kommt es zur Einzelzell-HR (graue Zellen). In *gl1*-Pflanzen werden die Reaktionen der Nichtwirtsrestistenz auf infizierten Blättern nicht sichtbar. Nach Infektion mit *P. infestans* liegt ein erhöhtes Verhältnis von Stigma- zu Sitosterol im Blatt vor. Außerdem werden nach *P. infestans*-Behandlung vermehrt Sterolester (SE) gebildet, wodurch vermutlich eine übermäßige Akkumulation freier Sterole (FS) in der Plasmamembran (PM) vermieden werden soll. Die Speicherung von SEs erfolgt in Lipidtropfen. Die Sterolestersynthese im Blatt wird v.a. durch die Phospholipid: Sterol-Acyltransferase 1 (PSAT1) katalysiert, die in vesikel-artigen Strukturen unbekannter Herkunft lokalisiert ist. Synthese und Abbau von Sterolglycosiden (SG) vermitteln Sterol-Glycosyltransferasen (SGT) und Sterolglycosidhydrolasen (SGH). Sterolglycosid-Acyltransferasen (SGAT) katalysieren die Synthese von acylierten Sterolglycosiden (ASG), sind in Pflanzen bisher aber noch unbekannt. Die Aufrechterhaltung der Sterolhomöostase bei biotischem Stress ist für die Vermeidung vorzeitiger Zellschäden von Bedeutung.



(B) In *erp1*-Pflanzen tragen dieselben Mechanismen der prä- und postinvasiven Abwehr zur Nichtwirtsrestistenz gegenüber *P. infestans* bei. Allerdings treten im Vergleich zu *gl1* verstärkt Zelltodreaktionen im Mesophyll auf (graue Zellen), die auf infizierten Blättern makroskopisch sichtbar werden. In *erp1*-Mutanten führen Mutationen in *PSAT1/ERP1* (rote Sternchen) zu einer stark beeinträchtigten Sterolestersynthese (rotes Kreuz), was mit erhöhten Mengen an FS und SGs einhergeht. Die Mengen an ASGs sind reduziert. Die im Vergleich zu *gl1*-Pflanzen veränderte Menge der Sterollipid-Klassen ist durch die Größe der roten Dreiecke symbolisiert. In *erp1*-Pflanzen konnten keine Lipidtropfen nachgewiesen werden. Die veränderte Sterolhomöostase führt möglicherweise zu einer veränderten Permeabilität von Zellmembranen (durch gestrichelte Linie gekennzeichnet) und damit zu veränderten Membran-assoziierten Reaktionen. Außerdem könnten durch Organellschäden vermehrt Signalmoleküle freigesetzt werden, die in umgrenzende Zellen diffundieren und so zu einer Verstärkung und Ausbreitung der *P. infestans*-induzierten Abwehrantwort führen. Außerdem könnte die veränderte Membranzusammensetzung frühzeitig zum Zelltod führen, wodurch wiederum Signale freigesetzt werden. Aufgrund der verstärkten Abwehrreaktionen und bzw. oder des *P. infestans*-induzierten Zelltods wird in Mesophyllzellen über bisher noch unbekannte Mechanismen eine massive PMR4/GSL5-unabhängige Callose-Deposition aktiviert.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Nichtwirtsresistenz ist die dauerhafteste und am weitesten verbreitete Form der Krankheitsresistenz von Pflanzen und basiert auf präformierten und induzierbaren Abwehrmechanismen. In der Abwehr von penetrierenden Pathogenen werden zwei Ebenen induzierbarer Nichtwirtsreaktionen unterschieden: zum einen verhindern die an der Zellperipherie aktiven Komponenten der präinvasiven Resistenz die Penetration der pflanzlichen Zelle und zum anderen tragen im Falle einer erfolgreichen Penetration die Komponenten der postinvasiven Resistenz effektiv zur Aufrechterhaltung der Nichtwirtsresistenz bei.

Arabidopsis thaliana ist keine Wirtspflanze von *Phytophthora infestans*, dem Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffel. Für die Penetrationsresistenz von *A. thaliana* gegenüber diesem hemibiotrophen Oomyceten sind die Peroxisomen-assoziierte Myrosinase PEN2 und der ABC-Transporter PEN3 erforderlich. Dabei wird angenommen, dass PEN3 u.a. den Export der durch PEN2 synthetisierten Indolderivate in den Apoplasten vermittelt. Weitere Komponenten der Penetrationsresistenz oder die Mechanismen der postinvasiven Abwehr gegenüber *P. infestans* sind bisher nicht bekannt.

Mit dem Ziel weitere in die Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegenüber *P. infestans* involvierte Gene zu identifizieren, wurde ein Screen mit remutagenisiertem *pen2*-Saatgut durchgeführt. Die 14 isolierten Mutanten zeigten nach Behandlung mit *P. infestans* einen im Vergleich zu *pen2* verstärkten Abwehrphänotyp und wurden dementsprechend als *enhanced response to Phytophthora (erp)*-Mutanten bezeichnet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die *erp1*-Mutante untersucht.

Zwei verschiedene *erp1*-Allele, *erp1-3* und *erp1-4*, prägen sich unabhängig von *pen2* mit Zelltodreaktionen und deregulierten Callose-Depositionen im Mesophyll nach *P. infestans*-Behandlung aus. Das Hauptenzym der wund- und Pathogen-induzierten Callosesynthese PMR4/GSL5 ist für die *erp1*-spezifische Callose nicht von Bedeutung. Welche anderen Enzyme und Mechanismen in die Entstehung der *erp1*-spezifischen Callose-Depositionen involviert sind, konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden.

Das *ERP1*-Gen (*At1g04010*) kodiert die Phospholipid: Sterol-Acyltransferase1 (PSAT1), welche eine Acyl-CoA-unabhängige Synthese von Sterolestern in Blättern und Samen von *Arabidopsis* katalysiert. T-DNA-Insertionslinien des *PSAT1*-Gens weisen denselben Nichtwirtsresistenz-Phänotyp wie die *erp1*-Mutanten auf.

Konstitutiv exprimiertes PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsprotein lokalisiert in zytosolischen Vesikel-ähnlichen Strukturen, die anscheinend weder Peroxisomen noch Golgi-Vesikeln entsprechen.

Mutationen in *PSAT1/ERP1* führen zu einer veränderten Sterollipid-Zusammensetzung im Blatt, mit drastisch reduzierten Sterolester-Mengen, weniger acylierten Sterolglycosiden, einem leichten Anstieg

freier Sterole und einer erhöhten Akkumulation von Sterolglycosiden. Die veränderte Sterolhomöostase in *PSAT1/ERP1*-defizienten Pflanzen führt zu einer verfrühten Blattseneszenz.

Nach Infektion mit *P. infestans* konnte in allen Genotypen ein erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol beobachtet werden, die *P. infestans*-induzierte Akkumulation von Sterolestern trat hingegen nur in Col-0, *gl1* und *pen2* nicht aber in *erp1*-Mutanten auf.

Die Infektion von *erp1*-Pflanzen mit dem nicht-adaptierten Mehltau-Erreger *Blumeria graminis f. sp. hordei* oder dem adaptierten Anthracnose-Erreger *Colletotrichum higginsianum* induzierte ähnliche massive Callose-Ablagerungen wie nach Behandlung mit *P. infestans*. Bakterielle Pathogene induzierten hingegen den *erp1*-spezifischen Phänotyp nicht.

Die Übertragung des *AtPSAT1/ERP1*-Gens in Kartoffel und die Stilllegung des homologen Gens *StPSAT* in der Wirtspflanze von *P. infestans* führte nicht zu Veränderungen der Sterollipid-Zusammensetzung in unbehandelten oder infizierten Kartoffelblättern und beeinflusste die Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* nicht. Da aber, wie in Arabidopsis, auch in Kartoffelblättern nach Infektion mit *P. infestans* erhöhte Sterolester- und Stigmasterol-Mengen gemessen wurden, scheint auch in der kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktion die Regulation der Sterolhomöostase eine Funktion zu haben.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Rolle der *PSAT1/ERP1*-abhängigen Sterolestersynthese in Arabidopsis für die Abwehr penetrierender Pathogene hin. Eine Korrelation zwischen Sterolestern und Reaktionen der Pathogenabwehr wurde bisher nicht gezeigt. Möglicherweise ist die Sterolestersynthese in Arabidopsis entscheidend für das Aufrechterhalten der Sterolzusammensetzung in Zellmembranen während der Interaktion mit filamentösen Pathogenen und anderen Stress- oder Entwicklungssituationen, in denen freie Sterole akkumulieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Aceituno, F.F., Moseyko, N., Rhee, S.Y. and Gutierrez, R.A.** (2008) The rules of gene expression in plants: organ identity and gene body methylation are key factors for regulation of gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **9**, 438.
- Adam, L., Ellwood, S., Wilson, I., Saenz, G., Xiao, S., Oliver, R.P., Turner, J.G. and Somerville, S.** (1999) Comparison of *Erysiphe cichoracearum* and *E. cruciferarum* and a survey of 360 *Arabidopsis thaliana* accessions for resistance to these two powdery mildew pathogens. *Mol Plant Micro Interact*, **12**, 1031-1043.
- Adam, L. and Somerville, S.C.** (1996) Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **9**, 341-356.
- Ah-Fong, A.M., Bormann-Chung, C.A. and Judelson, H.S.** (2008) Optimization of transgene-mediated silencing in *Phytophthora infestans* and its association with small-interfering RNAs. *Fungal Genet Biol*, **45**, 1197-1205.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer, P.J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- An, Q., Huckelhoven, R., Kogel, K.H. and van Bel, A.J.** (2006) Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cell Microbiol*, **8**, 1009-1019.
- Andersson, M.X., Stridh, M.H., Larsson, K.E., Liljenberg, C. and Sandelius, A.S.** (2003) Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol. *FEBS Lett*, **537**, 128-132.
- Asai, T., Sheen, J., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T. and Ausubel, F.M.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977-983.
- 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.** (2004) The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell*, **15**, 5118-5129.
- Athenstaedt, K. and Daum, G.** (2006) The life cycle of neutral lipids: synthesis, storage and degradation. *Cell Mol Life Sci*, **63**, 1355-1369.
- Banas, A., Carlsson, A.S., Huang, B., Lenman, M., Banas, W., Lee, M., Noiriell, A., Benveniste, P., Schaller, H., Bouvier-Nave, P. and Stymne, S.** (2005) Cellular sterol ester synthesis in plants is performed by an enzyme (phospholipid:sterol acyltransferase) different from the yeast and mammalian acyl-CoA:sterol acyltransferases. *J Biol Chem*, **280**, 34626-34634.
- Beck, J.G., Mathieu, D., Loudet, C., Buchoux, S. and Dufourc, E.J.** (2007) Plant sterols in "rafts": a better way to regulate membrane thermal shocks. *FASEB J*, **21**, 1714-1723.
- 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.** (2009) A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense. *Science*, **323**, 101-106.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M. and Menke, F.L.** (2007) Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 1198-1214.
- Bent, A.F. and Mackey, D.** (2007) Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol*, **45**, 399-436.
- Benveniste, P.** (2004) Biosynthesis and accumulation of sterols. *Annu Rev Plant Biol*, **55**, 429-457.
- Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R.** (2005) Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *PNAS*, **102**, 3135-3140.
- Böhlenius, H., Morch, S.M., Godfrey, D., Nielsen, M.E. and Thordal-Christensen, H.** (2010) The Multivesicular Body-Localized GTPase ARFA1b/1c Is Important for Callose Deposition and ROR2 Syntaxin-Dependent Preinvasive Basal Defense in Barley. *Plant Cell*, **22**, 3831-3844.
- Boissy, G., O'Donohue, M., Gaudemer, O., Perez, V., Pernollet, J.C. and Brunie, S.** (1999) The 2.1 A structure of an elicitor-ergosterol complex: a recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Sci*, **8**, 1191-1199.
- Boller, T. and He, S.Y.** (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science*, **324**, 742-744.
- Bos, J.I., Armstrong, M.R., Gilroy, E.M., Boevink, P.C., Hein, I., Taylor, R.M., Zhendong, T., Engelhardt, S., Vetukuri, R.R., Harrower, B., Dixelius, C., Bryan, G., Sadanandom, A., Whisson, S.C.,**

- Kamoun, S. and Birch, P.R.** (2010) Phytophthora infestans effector AVR3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1. *PNAS*, **107**, 9909-9914.
- Böttcher, C., Westphal, L., Schmotz, C., Prade, E., Scheel, D. and Glawischnig, E.** (2009) The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, **21**, 1830-1845.
- Boutte, Y. and Grebe, M.** (2009) Cellular processes relying on sterol function in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 705-713.
- Bouvier-Navé, P., Berna, A., Noiriél, A., Compagnon, V., Carlsson, A.S., Banas, A., Stymne, S. and Schaller, H.** (2010) Involvement of the phospholipid sterol acyltransferase1 in plant sterol homeostasis and leaf senescence. *Plant Physiol*, **152**, 107-119.
- Bouvier-Navé, P., Husselstein, T. and Benveniste, P.** (1998) Two families of sterol methyltransferases are involved in the first and the second methylation steps of plant sterol biosynthesis. *Eur J Biochem*, **256**, 88-96.
- Bradford, B., Moore, L.D. and Orcutt, D.M.** (1981) Sterol Content of 6 Tomato Cultivars Resistant or Susceptible to Phytophthora-Infestans. *Phytopathology*, **71**, 862-862.
- Bradford, B., Moore, L.D. and Orcutt, D.M.** (1982) The Free Sterol, Steryl Ester, and Steryl Glycoside Content of Tomato Cultivars Resistant and Susceptible to Phytophthora-Infestans. *Can J Bot*, **60**, 1469-1473.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. and Nurnberger, T.** (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from Phytophthora transglutaminases. *Embo J*, **21**, 6681-6688.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M. and Collmer, A.** (2003) The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000. *PNAS*, **100**, 10181-10186.
- Busch, W. and Benfey, P.N.** (2010) Information processing without brains--the power of intercellular regulators in plants. *Development*, **137**, 1215-1226.
- Carruthers, A. and Melchior, D.L.** (1986) How Bilayer Lipids Affect Membrane-Protein Activity. *Trends Biochem Sci*, **11**, 331-335.
- Carvalho Ade, O. and Gomes, V.M.** (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des*, **17**, 4270-4293.
- Carviel, J.L., Al-Daoud, F., Neumann, M., Mohammad, A., Provart, N.J., Moeder, W., Yoshioka, K. and Cameron, R.K.** (2009) Forward and reverse genetics to identify genes involved in the age-related resistance response in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Pathol*, **10**, 621-634.
- Caten, C.E.** (1970) Spontaneous Variability of Single Isolates of Phytophthora-Infestans .2. Pathogenic Variation. *Can J Bot*, **48**, 897-&.
- Chang, C.C., Huh, H.Y., Cadigan, K.M. and Chang, T.Y.** (1993) Molecular cloning and functional expression of human acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase cDNA in mutant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem*, **268**, 20747-20755.
- Chaparro-Garcia, A., Wilkinson, R.C., Gimenez-Ibanez, S., Findlay, K., Coffey, M.D., Zipfel, C., Rathjen, J.P., Kamoun, S. and Schornack, S.** (2011) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen phytophthora infestans in Nicotiana benthamiana. *PLoS One*, **6**, e16608.
- Chen, Q., Steinhauer, L., Hammerlindl, J., Keller, W. and Zou, J.** (2007) Biosynthesis of phytosterol esters: identification of a sterol o-acyltransferase in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **145**, 974-984.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G.** (2006) The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Choe, S., Dilkes, B.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Yuan, H., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E. and Feldmann, K.A.** (1999a) The Arabidopsis dwarf1 mutant is defective in the conversion of 24-methylenecholesterol to campesterol in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiol*, **119**, 897-907.

- Choe, S., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Tissier, C.P., Gregory, B.D., Ross, A.S., Tanaka, A., Yoshida, S., Tax, F.E. and Feldmann, K.A. (1999b) The Arabidopsis *dwf7/ste1* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *Plant Cell*, **11**, 207-221.
- Choe, S., Tanaka, A., Noguchi, T., Fujioka, S., Takatsuto, S., Ross, A.S., Tax, F.E., Yoshida, S. and Feldmann, K.A. (2000) Lesions in the sterol delta reductase gene of Arabidopsis cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J*, **21**, 431-443.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Clay, N.K., Adio, A.M., Denoux, C., Jander, G. and Ausubel, F.M. (2009) Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science*, **323**, 95-101.
- Clouse, S.D. (2002) Arabidopsis mutants reveal multiple roles for sterols in plant development. *Plant Cell*, **14**, 1995-2000.
- Clouse, S.D. and Sasse, J.M. (1998) BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **49**, 427-451.
- Coleman, J.J., White, G.J., Rodriguez-Carres, M. and Vanetten, H.D. (2011) An ABC transporter and a cytochrome P450 of *Nectria haematococca* MPVI are virulence factors on pea and are the major tolerance mechanisms to the phytoalexin pisatin. *Mol Plant Micro Interact*, **24**, 368-376.
- Coll, N.S., Epple, P. and Dangl, J.L. (2011) Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ*, **18**, 1247-1256.
- Collier, S.M. and Moffett, P. (2009) NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends Plant Sci*, **14**, 521-529.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C. and Schulze-Lefert, P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, **425**, 973-977.
- Constabel, C.P., Bertrand, C. and Brisson, N. (1993) Transgenic potato plants overexpressing the pathogenesis-related STH-2 gene show unaltered susceptibility to *Phytophthora infestans* and potato virus X. *Plant Mol Biol*, **22**, 775-782.
- Cooke, D.T. and Burden, R.S. (1990) Lipid Modulation of Plasma Membrane-Bound ATPases. *Physiol Plant*, **78**, 153-159.
- Crouzet, J., Trombik, T., Fraysse, A.S. and Boutry, M. (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett*, **580**, 1123-1130.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K. and Scheible, W.R. (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **139**, 5-17.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S. and Bellincampi, D. (2004) Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochim Biophys Acta*, **1696**, 237-244.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826-833.
- Daum, G., Wagner, A., Czabany, T. and Athenstaedt, K. (2007) Dynamics of neutral lipid storage and mobilization in yeast. *Biochimie*, **89**, 243-248.
- De Domenico, S., Tsesmetzis, N., Di Sansebastiano, G.P., Hughes, R.K., Casey, R. and Santino, A. (2007) Subcellular localisation of *Medicago truncatula* 9/13-hydroperoxide lyase reveals a new localisation pattern and activation mechanism for CYP74C enzymes. *BMC Plant Biol*, **7**, 58.
- Debener, T., Lehnackers, H., Arnold, M. and Dangl, J.L. (1991) Identification and molecular mapping of a single Arabidopsis thaliana locus determining resistance to a phytopathogenic *Pseudomonas syringae* isolate. *Plant J*, **1**, 289-302.
- DeBolt, S., Scheible, W.R., Schrick, K., Auer, M., Beisson, F., Bischoff, V., Bouvier-Nave, P., Carroll, A., Hematy, K., Li, Y.H., Milne, J., Nair, M., Schaller, H., Zemla, M. and Somerville, C. (2009) Mutations in UDP-Glucose: Sterol Glucosyltransferase in Arabidopsis Cause Transparent Testa Phenotype and Suberization Defect in Seeds. *Plant Physiol*, **151**, 78-87.
- Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P. and Expert, D. (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Micro Interact*, **11**, 734-742.
- Develey-Riviere, M.P. and Galiana, E. (2007) Resistance to pathogens and host developmental stage: a multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytol*, **175**, 405-416.
- Diaz, G., Melis, M., Batetta, B., Angius, F. and Falchi, A.M. (2008) Hydrophobic characterization of intracellular lipids in situ by Nile Red red/yellow emission ratio. *Micron*, **39**, 819-824.
- Diener, A.C., Li, H., Zhou, W., Whoriskey, W.J., Nes, W.D. and Fink, G.R. (2000) Sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in plants. *Plant Cell*, **12**, 853-870.
- Dittgen, J. (2005) Genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz gegenüber biotrophen Mehltäupilzen in *Arabidopsis thaliana* In *Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln*. Köln: Köln pp. 145.

- Dou, D., Kale, S.D., Wang, X., Jiang, R.H., Bruce, N.A., Arredondo, F.D., Zhang, X. and Tyler, B.M. (2008) RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell*, **20**, 1930-1947.
- Duperon, R., Thiersault, M. and Duperon, P. (1983) Sterol Compounds in Leaves of Solanaceae-Species - Predominance of Glycosidic Forms in Solanum Genus. *Cr Acad Sci Iii-Vie*, **296**, 239-242.
- Duperon, R., Thiersault, M. and Duperon, P. (1984) High-Level of Glycosylated Sterols in Species of Solanum and Sterol Changes during the Development of the Tomato. *Phytochem*, **23**, 743-746.
- Durner, J., Livaja, M., Zeidler, D. and von Rad, U. (2008) Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria-derived PAMPs harpin and lipopolysaccharide. *Immunobiology*, **213**, 161-171.
- Dyas, L. and Goad, L.J. (1993) Steryl Fatty Acyl Esters in Plants. *Phytochem*, **34**, 17-29.
- Dyas, L., Prescott, M.C., Evershed, R.P. and Goad, L.J. (1991) Steryl Esters in a Cell-Suspension Culture of Celery (*Apium-Graveolens*). *Lipids*, **26**, 536-541.
- Earley, K.W., Haag, J.R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K. and Pikaard, C.S. (2006) Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J*, **45**, 616-629.
- Edwards, P.A. and Ericsson, J. (1999) Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*, **68**, 157-185.
- Elmore, J.M. and Coaker, G. (2011) The Role of the Plasma Membrane H(+)-ATPase in Plant-Microbe Interactions. *Mol Plant*, **4**, 416-427.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. and von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol*, **300**, 1005-1016.
- Enns, L.C., Kanaoka, M.M., Torii, K.U., Comai, L., Okada, K. and Cleland, R.E. (2005) Two callose synthases, GSL1 and GSL5, play an essential and redundant role in plant and pollen development and in fertility. *Plant Mol Biol*, **58**, 333-349.
- Eschen-Lippold, L., Rothe, G., Stumpe, M., Gobel, C., Feussner, I. and Rosahl, S. (2007) Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants. *Phytochem*, **68**, 797-801.
- Estelle, M.A. and Somerville, C. (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol Gen Genet*, **206**, 200-206.
- Feltkamp, D., Baumann, E., Schmalenbach, W., Masterson, R. and Rosahl, S. (1995) Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the mas elements and correlates with high transcript levels of mas-binding factor. *Plant Sci*, **109**, 57-65.
- Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A. and Parker, J.E. (2001) Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *EMBO J*, **20**, 5400-5411.
- Feys, B.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A. and Parker, J.E. (2005) *Arabidopsis* SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 stabilizes and signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 complex in plant innate immunity. *Plant Cell*, **17**, 2601-2613.
- Fry, W. (2008) *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Mol Plant Pathol*, **9**, 385-402.
- Gan, P.H., Rafiqi, M., Ellis, J.G., Jones, D.A., Hardham, A.R. and Dodds, P.N. (2010) Lipid binding activities of flax rust AvrM and AvrL567 effectors. *Plant Signal Behav*, **5**, 1272-1275.
- Gaulin, E., Bottin, A. and Dumas, B. (2010) Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. *Plant Signal Behav*, **5**, 258-260.
- Gaulin, E., Drame, N., Lafitte, C., Torto-Alalibo, T., Martinez, Y., Ameline-Torregrosa, C., Khatib, M., Mazarguil, H., Villalba-Mateos, F., Kamoun, S., Mazars, C., Dumas, B., Bottin, A., Esquerre-Tugay, M.T. and Rickauer, M. (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell*, **18**, 1766-1777.
- Geerts, A., Feltkamp, D. and Rosahl, S. (1994) Expression of lipoxygenase in wounded tubers of *Solanum tuberosum* L. *Plant Physiol*, **105**, 269-277.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V. and Rathjen, J.P. (2009) AvrPtoB targets the LysM receptor kinase CERK1 to promote bacterial virulence on plants. *Curr Biol*, **19**, 423-429.
- Glazebrook, J. (1999) Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 280-286.
- Glazebrook, J. (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 205-227.
- Glazebrook, J. and Ausubel, F.M. (1994) Isolation of phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *PNAS*, **91**, 8955-8959.
- Glazebrook, J., Rogers, E.E. and Ausubel, F.M. (1996) Isolation of *Arabidopsis* mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics*, **143**, 973-982.
- Godfrey, D., Bohlenius, H., Pedersen, C., Zhang, Z., Emmersen, J. and Thordal-Christensen, H. (2010) Powdery mildew fungal effector candidates share N-terminal Y/F/WxC-motif. *BMC Genomics*, **11**, 317.

- Gohre, V., Spallek, T., Haweker, H., Mersmann, S., Mentzel, T., Boller, T., de Torres, M., Mansfield, J.W. and Robatzek, S. (2008) Plant pattern-recognition receptor FLS2 is directed for degradation by the bacterial ubiquitin ligase AvrPtoB. *Curr Biol*, **18**, 1824-1832.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell*, **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T. (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J*, **18**, 277-284.
- Gondet, L., Bronner, R. and Benveniste, P. (1994) Regulation of Sterol Content in Membranes by Subcellular Compartmentation of Steryl-Esters Accumulating in a Sterol-Overproducing Tobacco Mutant. *Plant Physiol*, **105**, 509-518.
- Grandmougin-Ferjani, A., Schuler-Muller, I. and Hartmann, M.A. (1997) Sterol Modulation of the Plasma Membrane H⁺-ATPase Activity from Corn Roots Reconstituted into Soybean Lipids. *Plant Physiol*, **113**, 163-174.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klessig, D.F. and Ausubel, F.M. (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, **77**, 551-563.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K. and Blatt, M.R. (2010) A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *Plant J*, **64**, 355-365.
- Griebel, T. and Zeier, J. (2010) A role for beta-sitosterol to stigmasterol conversion in plant-pathogen interactions. *Plant J*, **63**, 254-268.
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., Lewontin, R.C. and Gelbart, W.M. (2000) *An Introduction to Genetic Analysis* 7th edn. New York.
- Grille, S., Zaslowski, A., Thiele, S., Plat, J. and Warnecke, D. (2010) The functions of steryl glycosides come to those who wait: Recent advances in plants, fungi, bacteria and animals. *Prog Lipid Res*, **49**, 262-288.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J., Grunwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C.H., Huitema, E., Jeong, D.H., Jones, A.M., Jones, J.D., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kunjeti, S.G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., Maclean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzon, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R., Whisson, S.C., Judelson, H.S. and Nusbaum, C. (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, **461**, 393-398.
- Halim, V.A., Eschen-Lippold, L., Altmann, S., Birschwilks, M., Scheel, D. and Rosahl, S. (2007) Salicylic acid is important for basal defense of *Solanum tuberosum* against *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Micro Interact*, **20**, 1346-1352.
- Ham, J.H., Kim, M.G., Lee, S.Y. and Mackey, D. (2007) Layered basal defenses underlie non-host resistance of Arabidopsis to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Plant J*, **51**, 604-616.
- Hardham, A.R., Jones, D.A. and Takemoto, D. (2007) Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 342-348.
- Hartmann, M.A. (1998) Plant sterols and the membrane environment. *Trends Plant Sci*, **3**, 170-175.
- He, Y. and Gan, S. (2002) A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Cell*, **14**, 805-815.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C. and Rathjen, J.P. (2007) The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS*, **104**, 12217-12222.
- Hendrix, J.W. (1970) Sterols in Growth and Reproduction of Fungi. *Annu Rev Phytopathol*, **8**, 111-130.
- Herman, P.L. and Marks, M.D. (1989) Trichome Development in Arabidopsis thaliana. II. Isolation and Complementation of the GLABROUS1 Gene. *Plant Cell*, **1**, 1051-1055.
- Hiruma, K., Onozawa-Komori, M., Takahashi, F., Asakura, M., Bednarek, P., Okuno, T., Schulze-Lefert, P. and Takano, Y. (2010) Entry mode-dependent function of an indole glucosinolate pathway in Arabidopsis for nonhost resistance against anthracnose pathogens. *Plant Cell*, **22**, 2429-2443.
- Höfgen, R. and Willmitzer, L. (1988) Storage of competent cells for Agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9877.
- Hong, Z.L., Delauney, A.J. and Verma, D.P.S. (2001) A cell plate specific callose synthase and its interaction with phragmoplastin. *Plant Cell*, **13**, 755-768.

- Hückelhoven, R. (2007) Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, **45**, 101-127.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C.A. (2006) An endogenous peptide signal in Arabidopsis activates components of the innate immune response. *PNAS*, **103**, 10098-10103.
- Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A., Francis, D.M. and Kamoun, S. (2003) Active defense responses associated with nonhost resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Pathol*, **4**, 487-500.
- Humphry, M., Bednarek, P., Kemmerling, B., Koh, S., Stein, M., Gobel, U., Stuber, K., Pislewska-Bednarek, M., Loraine, A., Schulze-Lefert, P., Somerville, S. and Panstruga, R. (2010) A regulon conserved in monocot and dicot plants defines a functional module in antifungal plant immunity. *PNAS*, **107**, 21896-21901.
- Huser, A., Takahara, H., Schmalenbach, W. and O'Connell, R. (2009) Discovery of pathogenicity genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum*, using random insertional mutagenesis. *Mol Plant Micro Interact*, **22**, 143-156.
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, **96**, 23-28.
- Irizarry, R.A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y.D., Antonellis, K.J., Scherf, U. and Speed, T.P. (2003) Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*, **4**, 249-264.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P. and Fincher, G.B. (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell*, **15**, 2503-2513.
- Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller, T., Hedrich, R. and Becker, D. (2010) Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca²⁺-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J*, **62**, 367-378.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J*, **19**, 4004-4014.
- Joardar, V., Lindeberg, M., Jackson, R.W., Selengut, J., Dodson, R., Brinkac, L.M., Daugherty, S.C., Deboy, R., Durkin, A.S., Giglio, M.G., Madupu, R., Nelson, W.C., Rosovitz, M.J., Sullivan, S., Crabtree, J., Creasy, T., Davidsen, T., Haft, D.H., Zafar, N., Zhou, L., Halpin, R., Holley, T., Khouri, H., Feldblyum, T., White, O., Fraser, C.M., Chatterjee, A.K., Cartinhour, S., Schneider, D.J., Mansfield, J., Collmer, A. and Buell, C.R. (2005) Whole-genome sequence analysis of *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola 1448A reveals divergence among pathovars in genes involved in virulence and transposition. *J Bacteriol*, **187**, 6488-6498.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *PNAS*, **103**, 11086-11091.
- Kalde, M., Nuhse, T.S., Findlay, K. and Peck, S.C. (2007) The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1. *PNAS*, **104**, 11850-11855.
- Kale, S.D., Gu, B.A., Capelluto, D.G.S., Dou, D.L., Feldman, E., Rumore, A., Arredondo, F.D., Hanlon, R., Fudal, I., Rouxel, T., Lawrence, C.B., Shan, W.X. and Tyler, B.M. (2010) External Lipid PI3P Mediates Entry of Eukaryotic Pathogen Effectors into Plant and Animal Host Cells. *Cell*, **142**, 284-295.
- Kalinowska, M. and Wojciechowski, Z.A. (1978) Purification and some properties of steryl [beta]-d-glucoside hydrolase from *Sinapis alba* seedlings. *Phytochem*, **17**, 1533-1537.
- Kalinowska, M. and Wojciechowski, Z.A. (1985) Modulation of activities of steryl glucoside hydrolase and UDPG: Sterol glucosyltransferase from *Sinapis alba* by detergents and lipids. *Phytochem*, **25**, 45-49.
- Kamoun, S., Lindqvist, H. and Govers, F. (1997a) A novel class of elicitor-like genes from *Phytophthora infestans*. *Mol Plant Micro Interact*, **10**, 1028-1030.
- Kamoun, S. and Smart, C.D. (2005) Late blight of potato and tomato in the genomics era. *Plant Dis*, **89**, 692-699.
- Kamoun, S., van West, P., de Jong, A.J., de Groot, K.E., Vleeshouwers, V.G. and Govers, F. (1997b) A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato. *Mol Plant Micro Interact*, **10**, 13-20.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H. and Terauchi, R. (2003) Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol*, **4**, 383-391.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Takahashi, Y., Berberich, T., Ito, A., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2008) NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with *Phytophthora infestans* INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta*, **228**, 977-987.
- Katagiri, F., Thilmony, R. and He, S.Y. (2002) The Arabidopsis *Thaliana*-*Pseudomonas Syringae* Interaction. *The Arabidopsis Book*, e0039.

- Kaup, M.T., Froese, C.D. and Thompson, J.E.** (2002) A role for diacylglycerol acyltransferase during leaf senescence. *Plant Physiol*, **129**, 1616-1626.
- Kay, S., Hahn, S., Marois, E., Hause, G. and Bonas, U.** (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science*, **318**, 648-651.
- Keinath, N.F., Kierszniowska, S., Lorek, J., Bourdais, G., Kessler, S.A., Shimosato-Asano, H., Grossniklaus, U., Schulze, W.X., Robatzek, S. and Panstruga, R.** (2010) PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity. *J Biol Chem*, **285**, 39140-39149.
- Kelley, B.S., Lee, S.J., Damasceno, C.M., Chakravarthy, S., Kim, B.D., Martin, G.B. and Rose, J.K.** (2010) A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death. *Plant J*, **62**, 357-366.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J. and Dangl, J.L.** (2005) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *PNAS*, **102**, 6496-6501.
- Kim, H.U., Lee, K.R., Go, Y.S., Jung, J.H., Suh, M.C. and Kim, J.B.** (2011) Endoplasmic reticulum-located PDAT1-2 from castor bean enhances hydroxy fatty acid accumulation in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*, **52**, 983-993.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T. and Kunoh, H.** (1997) Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant J*, **11**, 525-537.
- Koch, E. and Slusarenko, A.** (1990) *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *Plant Cell*, **2**, 437-445.
- Koornneef, A. and Pieterse, C.M.J.** (2008) Cross talk in defense signaling. *Plant Physiol*, **146**, 839-844.
- Kopischke, M.** (2007) Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *enhanced response to Phytophthora I*. In *Biology*. Halle: Martin-Luther-Universität, pp. 107.
- Krol, E., Mentzel, T., Chinchilla, D., Boller, T., Felix, G., Kemmerling, B., Postel, S., Arents, M., Jeworutzki, E., Al-Rasheid, K.A., Becker, D. and Hedrich, R.** (2010) Perception of the *Arabidopsis* danger signal peptide 1 involves the pattern recognition receptor AtPEPR1 and its close homologue AtPEPR2. *J Biol Chem*, **285**, 13471-13479.
- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G.** (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, **16**, 3496-3507.
- Kus, J.V., Zaton, K., Sarkar, R. and Cameron, R.K.** (2002) Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, **14**, 479-490.
- Kwon, C., Bednarek, P. and Schulze-Lefert, P.** (2008a) Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiol*, **147**, 1575-1583.
- Kwon, C., Neu, C., Pajonk, S., Yun, H.S., Lipka, U., Humphry, M., Bau, S., Straus, M., Kwaaitaal, M., Rampelt, H., El Kasmi, F., Jurgens, G., Parker, J., Panstruga, R., Lipka, V. and Schulze-Lefert, P.** (2008b) Co-option of a default secretory pathway for plant immune responses. *Nature*, **451**, 835-840.
- Laloi, M., Perret, A.M., Chatre, L., Melser, S., Cantrel, C., Vaultier, M.N., Zachowski, A., Bathany, K., Schmitter, J.M., Vallet, M., Lessire, R., Hartmann, M.A. and Moreau, P.** (2007) Insights into the role of specific lipids in the formation and delivery of lipid microdomains to the plasma membrane of plant cells. *Plant Physiol*, **143**, 461-472.
- Landtag, J.** (2006) Untersuchung des Pathosystems *Arabidopsis thaliana* (L.) - *Phytophthora infestans* und Charakterisierung von Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp.
- Langcake, P.** (1974) Sterols in Potato Leaves and Their Effects on Growth and Sporulation of *Phytophthora infestans*. *T Brit Mycol Soc*, **63**, 573-586.
- Laxalt, A.M. and Munnik, T.** (2002) Phospholipid signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 332-338.
- Lazo, G.R., Stein, P.A. and Ludwig, R.A.** (1991) A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*. *Biotechnol*, **9**, 963-967.
- Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J.M. and Boedtker, H.** (1977) RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751.
- Leivar, P., Gonzalez, V.M., Castel, S., Trelease, R.N., Lopez-Iglesias, C., Arro, M., Boronat, A., Campos, N., Ferrer, A. and Fernandez-Busquets, X.** (2005) Subcellular localization of *Arabidopsis* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Plant Physiol*, **137**, 57-69.
- Lim, P.O., Kim, H.J. and Nam, H.G.** (2007) Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol*, **58**, 115-136.
- Lindsey, K., Pullen, M.L. and Topping, J.F.** (2003) Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends Plant Sci*, **8**, 521-525.
- 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.** (2005) Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, **310**, 1180-1183.

- Lipka, V., Kwon, C. and Panstruga, R. (2007) SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **23**, 147-174.
- Lipka, V. and Panstruga, R. (2005) Dynamic cellular responses in plant-microbe interactions. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 625-631.
- Logemann, E., Birkenbihl, R.P., Ulker, B. and Somssich, I.E. (2006) An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Meth*, **2**, 16.
- Lohse, M., Nunes-Nesi, A., Kruger, P., Nagel, A., Hannemann, J., Giorgi, F.M., Childs, L., Osorio, S., Walther, D., Selbig, J., Sreenivasulu, N., Stitt, M., Fernie, A.R. and Usadel, B. (2010) Robin: an intuitive wizard application for R-based expression microarray quality assessment and analysis. *Plant Physiol*, **153**, 642-651.
- Lu, D., Wu, S., Gao, X., Zhang, Y., Shan, L. and He, P. (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *PNAS*, **107**, 496-501.
- Lukowitz, W., Gillmor, C.S. and Scheible, W.R. (2000) Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol*, **123**, 795-805.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A. and Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell*, **108**, 743-754.
- Maillot-Vernier, P., Gondet, L., Schaller, H., Benveniste, P. and Belliard, G. (1991) Genetic study and further biochemical characterization of a tobacco mutant that overproduces sterols. *Mol Gen Genet*, **231**, 33-40.
- Mao, G., Meng, X., Liu, Y., Zheng, Z., Chen, Z. and Zhang, S. (2011) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell*, **23**, 1639-1653.
- Marks, M.D. and Feldmann, K.A. (1989) Trichome Development in Arabidopsis thaliana. I. T-DNA Tagging of the GLABROUS1 Gene. *Plant Cell*, **1**, 1043-1050.
- Marois, E., Van den Ackerveken, G. and Bonas, U. (2002) The xanthomonas type III effector protein AvrBs3 modulates plant gene expression and induces cell hypertrophy in the susceptible host. *Mol Plant Micro Interact*, **15**, 637-646.
- Martin, S.W. and Konopka, J.B. (2004) Lipid raft polarization contributes to hyphal growth in Candida albicans. *Eukaryot Cell*, **3**, 675-684.
- Meyer, D., Pajonk, S., Micali, C., O'Connell, R. and Schulze-Lefert, P. (2009) Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments. *Plant J*, **57**, 986-999.
- Micali, C., Göllner, K., Humphry, M., Consonni, C. and Panstruga, R. (2008) *The Powdery Mildew Disease of Arabidopsis: A Paradigm for the Interaction between Plants and Biotrophic Fungi*: The American Society of Plant Biologists.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Panabieres, F., Ricci, P. and Blein, J.P. (1998) Elicitins, proteinaceous elicitors of plant defense, are a new class of sterol carrier proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **245**, 133-139.
- Mikes, V., Milat, M.L., Ponchet, M., Ricci, P. and Blein, J.P. (1997) The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett*, **416**, 190-192.
- Miklis, M., Consonni, C., Bhat, R.A., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2007) Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. *Plant Physiol*, **144**, 1132-1143.
- Moller, I.M. (2001) PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **52**, 561-591.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S., Carde, J.P., Hartmann, M.A., Bonneau, M., Simon-Plas, F., Lessire, R. and Bessoule, J.J. (2004) Lipid rafts in higher plant cells - Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J Biol Chem*, **279**, 36277-36286.
- Mongrand, S., Simon-Plas, F., Stanislas, T., Bayer, E.M.F. and Lherminier, J. (2010) Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci*, **15**, 656-663.
- Morel, J., Simon-Plas, F., Claverol, S., Mongrand, S., Furt, F., Fromentin, J., Bessoule, J.J. and Blein, J.P. (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Molecular & Cellular Proteomics*, **5**, 1396-1411.
- Morikawa, T., Mizutani, M., Aoki, N., Watanabe, B., Saga, H., Saito, S., Oikawa, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Wadano, A., Sakata, K. and Ohta, D. (2006) Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in Arabidopsis and tomato. *Plant Cell*, **18**, 1008-1022.
- Mullen, R.T., Shockey, J.M., Gidda, S.K., Chapital, D.C., Kuan, J.C., Dhanoa, P.K., Bland, J.M., Rothstein, S.J. and Dyer, J.M. (2006) Tung tree DGAT1 and DGAT2 have nonredundant functions in triacylglycerol biosynthesis and are localized to different subdomains of the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, **18**, 2294-2313.

- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant*, **15**, 473-497.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. and Kimura, T.** (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J Biosci Bioeng*, **104**, 34-41.
- Nawrath, C. and Metraux, J.P.** (1999) Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell*, **11**, 1393-1404.
- Nieto, B., Fores, O., Arro, M. and Ferrer, A.** (2009) Arabidopsis 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase is regulated at the post-translational level in response to alterations of the sphingolipid and the sterol biosynthetic pathways. *Phytochemistry*, **70**, 53-59.
- Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H. and Somerville, S.C.** (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, **301**, 969-972.
- Noh, Y.S. and Amasino, R.M.** (1999) Identification of a promoter region responsible for the senescence-specific expression of SAG12. *Plant Mol Biol*, **41**, 181-194.
- Nühse, T.S., Bottrill, A.R., Jones, A.M. and Peck, S.C.** (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J*, **51**, 931-940.
- Nürnberg, T. and Lipka, V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, **6**, 000-000.
- Nyathi, Y. and Baker, A.** (2006) Plant peroxisomes as a source of signalling molecules. *Biochim Biophys*, **1763**, 1478-1495.
- O'Connell, R., Herbert, C., Sreenivasaprasad, S., Khatib, M., Esquerre-Tugaye, M.T. and Dumas, B.** (2004) A novel Arabidopsis-Colletotrichum pathosystem for the molecular dissection of plant-fungal interactions. *Mol Plant Micro Interact*, **17**, 272-282.
- Ohyama, K., Suzuki, M., Kikuchi, J., Saito, K. and Muranaka, T.** (2009) Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in Arabidopsis. *PNAS*, **106**, 725-730.
- Osbourn, A., Goss, R.J. and Field, R.A.** (2011) The saponins: polar isoprenoids with important and diverse biological activities. *Nat Prod Rep*, **28**, 1261-1268.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Panabieres, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M. and Blein, J.P.** (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2825-2834.
- Palta, J.P., Whitaker, B.D. and Weiss, L.S.** (1993) Plasma Membrane Lipids Associated with Genetic Variability in Freezing Tolerance and Cold Acclimation of Solanum Species. *Plant Physiol*, **103**, 793-803.
- Panstruga, R. and Dodds, P.N.** (2009) Terrific protein traffic: the mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science*, **324**, 748-750.
- Patterson, G.W., Hugly, S. and Harrison, D.** (1993) Sterols and Phytol Esters of Arabidopsis-Thaliana under Normal and Chilling Temperatures. *Phytochem*, **33**, 1381-1383.
- Pedras, M.S., Yaya, E.E. and Glawischnig, E.** (2011) The phytoalexins from cultivated and wild crucifers: chemistry and biology. *Nat Prod Rep*, **28**, 1381-1405.
- Peng, L., Kawagoe, Y., Hogan, P. and Delmer, D.** (2002) Sitosterol-beta-glucoside as primer for cellulose synthesis in plants. *Science*, **295**, 147-150.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M. and Broekaert, W.F.** (1996) Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Petersen, T.N., Brunak, S., von Heijne, G. and Nielsen, H.** (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods*, **8**, 785-786.
- Pitzschke, A., Schikora, A. and Hirt, H.** (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, **12**, 421-426.
- Podila, G.K., Rogers, L.M. and Kolattukudy, P.E.** (1993) Chemical Signals from Avocado Surface Wax Trigger Germination and Appressorium Formation in Colletotrichum gloeosporioides. *Plant Physiol*, **103**, 267-272.
- Porter, J.A., Young, K.E. and Beachy, P.A.** (1996) Cholesterol modification of hedgehog signaling proteins in animal development. *Science*, **274**, 255-259.
- Provart, N.J., Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R. and Wilson, G.V.** (2007) An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *Plos One*, **2**.
- Qiu, J.L., Fiil, B.K., Petersen, K., Nielsen, H.B., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., Brodersen, P., Grasser, K.D., Mattsson, O., Glazebrook, J., Mundy, J. and Petersen, M.** (2008) Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *EMBO J*, **27**, 2214-2221.

- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekeur, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J.P., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunemaitre, B., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T., Maule, A.J., Reymond, P., Simon-Plas, F., Farmer, E.E., Bessoule, J.J. and Mongrand, S. (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*, **21**, 1541-1555.
- Raffaele, S., Farrer, R.A., Cano, L.M., Studholme, D.J., MacLean, D., Thines, M., Jiang, R.H.Y., Zody, M.C., Kunjeti, S.G., Donofrio, N.M., Meyers, B.C., Nusbaum, C. and Kamoun, S. (2010) Genome Evolution Following Host Jumps in the Irish Potato Famine Pathogen Lineage. *Science*, **330**, 1540-1543.
- Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J. and Scheel, D. (2011) Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J*.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S. and Greenberg, J.T. (1999) The gain-of-function Arabidopsis *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth. *Plant Cell*, **11**, 1695-1708.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H. and Knight, M.R. (2004) OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in Arabidopsis. *Nature*, **427**, 858-861.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, **183**, 555-563.
- Robert-Seilaniantz, A., Navarro, L., Bari, R. and Jones, J.D. (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 372-379.
- Rogne, S., Skretting, G., Larsen, F., Myklebost, O., Mevag, B., Carlson, L.A., Holmquist, L., Gjone, E. and Prydz, H. (1987) The isolation and characterisation of a cDNA clone for human lecithin:cholesterol acyl transferase and its use to analyse the genes in patients with LCAT deficiency and fish eye disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **148**, 161-169.
- Roux, M., Schwessinger, B., Albrecht, C., Chinchilla, D., Jones, A., Holton, N., Malinovsky, F.G., Tor, M., de Vries, S. and Zipfel, C. (2011) The arabidopsis leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to Hemibiotrophic and Biotrophic pathogens. *Plant Cell*, **23**, 2440-2455.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A laboratory manual* New York.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2006) SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins. *Cold Spring Harb Protoc*, **2006**, pdb.prot4540.
- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P. and Schaller, H. (2001) The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *Plant J*, **25**, 605-615.
- Schaller, H. (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol Biochem*, **42**, 465-476.
- Schlauch, N.L., Scheideler, M., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N.C., Vingron, M., Slusarenko, A.J. and Hoheisel, J.D. (2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in Arabidopsis thaliana using cDNA arrays. *J Biol Chem*, **277**, 10555-10561.
- Schmelzer, E. (2002) Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends Plant Sci*, **7**, 411-415.
- Schmidt, A., Grimm, R., Schmidt, J., Scheel, D., Strack, D. and Rosahl, S. (1999) Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-CoA:tyramine N-(hydroxycinnamoyl)transferase. *J Biol Chem*, **274**, 4273-4280.
- Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*, **3**, 1101-1108.
- Schornack, S., van Damme, M., Bozkurt, T.O., Cano, L.M., Smoker, M., Thines, M., Gaulin, E., Kamoun, S. and Huitema, E. (2010) Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus. *PNAS*, **107**, 17421-17426.
- Schrack, K., Mayer, U., Horrichs, A., Kuhnt, C., Bellini, C., Dangl, J., Schmidt, J. and Jurgens, G. (2000) FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in Arabidopsis embryogenesis. *Genes Dev*, **14**, 1471-1484.
- Schuler, I., Milon, A., Nakatani, Y., Ourisson, G., Albrecht, A.M., Benveniste, P. and Hartman, M.A. (1991) Differential effects of plant sterols on water permeability and on acyl chain ordering of soybean phosphatidylcholine bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6926-6930.
- Schulze, B., Mentzel, T., Jehle, A.K., Mueller, K., Beeler, S., Boller, T., Felix, G. and Chinchilla, D. (2010) Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *J Biol Chem*, **285**, 9444-9451.
- Sharma, P.C., Ito, A., Shimizu, T., Terauchi, R., Kamoun, S. and Saitoh, H. (2003) Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Genet Genomics*, **269**, 583-591.

- Shimada, C., Lipka, V., O'Connell, R., Okuno, T., Schulze-Lefert, P. and Takano, Y.** (2006) Nonhost resistance in Arabidopsis-Colletotrichum interactions acts at the cell periphery and requires actin filament function. *Mol Plant Micro Interact*, **19**, 270-279.
- Si-Ammour, A., Mauch-Mani, B. and Mauch, F.** (2003) Quantification of induced resistance against Phytophthora species expressing GFP as a vital marker: beta-aminobutyric acid but not BTH protects potato and Arabidopsis from infection. *Mol Plant Pathol*, **4**, 237-248.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.A. and Parrilli, M.** (2005) The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of Xanthomonas campestris. *J Biol Chem*, **280**, 33660-33668.
- Simon-Plas, F., Perraki, A., Bayer, E., Gerbeau-Pissot, P. and Mongrand, S.** (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr Opin Plant Biol*, **14**, 642-649.
- Sitbon, F., Arnqvist, L., Dutta, P.C. and Jonsson, L.** (2003) Reduction of cholesterol and glycoalkaloid levels in transgenic potato plants by overexpression of a type 1 sterol methyltransferase cDNA. *Plant Physiol*, **131**, 1792-1799.
- Somerville, S.C. and Underwood, W.** (2008) Focal accumulation of defences at sites of fungal pathogen attack. *J Exp Bot*, **59**, 3501-3508.
- Sorger, D. and Daum, G.** (2002) Synthesis of triacylglycerols by the acyl-coenzyme A:diacyl-glycerol acyltransferase Dga1p in lipid particles of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J Bacteriol*, **184**, 519-524.
- Spurr, A.R.** (1969) A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J Ultrastruct Res*, **26**, 31-43.
- Stahl, U., Carlsson, A.S., Lenman, M., Dahlqvist, A., Huang, B., Banas, W., Banas, A. and Stymne, S.** (2004) Cloning and functional characterization of a phospholipid:diacylglycerol acyltransferase from Arabidopsis. *Plant Physiol*, **135**, 1324-1335.
- Stalder, L. and Muhlemann, O.** (2008) The meaning of nonsense. *Trends Cell Biol*, **18**, 315-321.
- Stein, M., Dittgen, J., Sanchez-Rodriguez, C., Hou, B.H., Molina, A., Schulze-Lefert, P., Lipka, V. and Somerville, S.** (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell*, **18**, 731-746.
- Stermer, B.A., Bianchini, G.M. and Korth, K.L.** (1994) Regulation of HMG-CoA reductase activity in plants. *J Lipid Res*, **35**, 1133-1140.
- Sun, W., Dunning, F.M., Pfund, C., Weingarten, R. and Bent, A.F.** (2006) Within-species flagellin polymorphism in Xanthomonas campestris pv campestris and its impact on elicitation of Arabidopsis FLAGELLIN SENSING2-dependent defenses. *Plant Cell*, **18**, 764-779.
- Swindell, W.R., Huebner, M. and Weber, A.P.** (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*, **8**, 125.
- Takemoto, D., Hardham, A.R. and Jones, D.A.** (2005) Differences in cell death induction by phytophthora elicitors are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of nicotiana and cultivars of Brassica rapa and Raphanus sativus. *Plant Physiol*, **138**, 1491-1504.
- Talbot, N.J.** (2010) Living the Sweet Life: How Does a Plant Pathogenic Fungus Acquire Sugar from Plants? *PLoS Biol*, **8**.
- Tampakaki, A.P., Fadoulglou, V.E., Gazi, A.D., Panopoulos, N.J. and Kokkinidis, M.** (2004) Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol*, **6**, 805-816.
- Tanner, W., Malinsky, J. and Opekarová, M.** (2011) In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts. *Plant Cell*, **23**, 1191-1193.
- Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K. and Broekaert, W.F.** (1999) Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of Arabidopsis thaliana to the fungus Alternaria brassicicola. *Plant J*, **19**, 163-171.
- Thomma, B.P., Nurnberger, T. and Joosten, M.H.** (2011) Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *Plant Cell*, **23**, 4-15.
- Thordal-Christensen, H.** (2003) Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 351-357.
- Tjellstrom, H., Hellgren, L.I., Wieslander, A. and Sandelius, A.S.** (2010) Lipid asymmetry in plant plasma membranes: phosphate deficiency-induced phospholipid replacement is restricted to the cytosolic leaflet. *FASEB J*, **24**, 1128-1138.
- Torres, M.A.** (2010) ROS in biotic interactions. *Physiol Plant*, **138**, 414-429.
- Torres, M.A. and Dangl, J.L.** (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 397-403.
- Torres, M.A., Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2002) Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *PNAS*, **99**, 517-522.
- Trujillo, M. and Shirasu, K.** (2010) Ubiquitination in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **13**, 402-408.

- Tsuda, K. and Katagiri, F.** (2010) Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **13**, 459-465.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. and Boore, J.L.** (2006) Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **313**, 1261-1266.
- Uemura, M. and Steponkus, P.L.** (1994) A Contrast of the Plasma Membrane Lipid Composition of Oat and Rye Leaves in Relation to Freezing Tolerance. *Plant Physiol*, **104**, 479-496.
- Ullmann, P., Ury, A., Rimmele, D., Benveniste, P. and Bouvier-Nave, P.** (1993) UDP-glucose sterol beta-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic properties and lipid dependence. *Biochimie*, **75**, 713-723.
- Uppalapati, S.R., Ayoubi, P., Weng, H., Palmer, D.A., Mitchell, R.E., Jones, W. and Bender, C.L.** (2005) The phytotoxin coronatine and methyl jasmonate impact multiple phytohormone pathways in tomato. *Plant J*, **42**, 201-217.
- Uppalapati, S.R., Ishiga, Y., Wangdi, T., Kunkel, B.N., Anand, A., Mysore, K.S. and Bender, C.L.** (2007) The phytotoxin coronatine contributes to pathogen fitness and is required for suppression of salicylic acid accumulation in tomato inoculated with *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Mol Plant Micro Interact*, **20**, 955-965.
- Van den Ackerveken, G., Marois, E. and Bonas, U.** (1996) Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell. *Cell*, **87**, 1307-1316.
- van Esse, H.P., Bolton, M.D., Stergiopoulos, I., de Wit, P.J. and Thomma, B.P.** (2007) The chitin-binding *Cladosporium fulvum* effector protein Avr4 is a virulence factor. *Mol Plant Micro Interact*, **20**, 1092-1101.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. and Foyer, C.H.** (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiol*, **123**, 1289-1300.
- Vaten, A., Dettmer, J., Wu, S., Stierhof, Y.D., Miyashima, S., Yadav, S.R., Roberts, C.J., Campilho, A., Bulone, V., Lichtenberger, R., Lehesranta, S., Mahonen, A.P., Kim, J.Y., Jokitalo, E., Sauer, N., Scheres, B., Nakajima, K., Carlsbecker, A., Gallagher, K.L. and Helariutta, Y.** (2011) Callose biosynthesis regulates symplastic trafficking during root development. *Dev Cell*, **21**, 1144-1155.
- Vogel, J. and Somerville, S.** (2000) Isolation and characterization of powdery mildew-resistant *Arabidopsis* mutants. *PNAS*, **97**, 1897-1902.
- Wan, J., Zhang, X.C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S.Y., Stacey, M.G. and Stacey, G.** (2008) A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*.
- Wang, K., Senthil-Kumar, M., Ryu, C.M., Kang, L. and Mysore, K.S.** (2012) Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. *Plant Physiol*.
- Warnecke, D.C., Baltrusch, M., Buck, F., Wolter, F.P. and Heinz, E.** (1997) UDP-glucose:sterol glucosyltransferase: cloning and functional expression in *Escherichia coli*. *Plant Mol Biol*, **35**, 597-603.
- Weaver, L.M., Gan, S.S., Quirino, B. and Amasino, R.M.** (1998) A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol*, **37**, 455-469.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2002) *Arabidopsis: A Laboratory Manual*.
- Weigel, D. and Glazebrook, J.** (2006) Transformation of *Agrobacterium* Using the Freeze-Thaw Method. *Cold Spring Harb Protoc*, **2006**, pdb.prot4666.
- Weigel, D., Ossowski, S., Schneeberger, K., Clark, R.M., Lanz, C. and Warthmann, N.** (2008) Sequencing of natural strains of *Arabidopsis thaliana* with short reads. *Genome Res*, **18**, 2024-2033.
- Wesley, S.V., Helliwell, C.A., Smith, N.A., Wang, M.B., Rouse, D.T., Liu, Q., Gooding, P.S., Singh, S.P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P.A., Robinson, S.P., Gleave, A.P., Green, A.G. and Waterhouse, P.M.** (2001) Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant J*, **27**, 581-590.
- Westphal, L., Scheel, D. and Rosahl, S.** (2008) The coi1-16 mutant harbors a second site mutation rendering PEN2 nonfunctional. *Plant Cell*, **20**, 824-826.
- Wewer, V., Dombrink, I., vom Dorp, K. and Dormann, P.** (2011) Quantification of sterol lipids in plants by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Lipid Res*, **52**, 1039-1054.

- Whalen, M.C., Innes, R.W., Bent, A.F. and Staskawicz, B.J. (1991) Identification of *Pseudomonas syringae* pathogens of *Arabidopsis* and a bacterial locus determining avirulence on both *Arabidopsis* and soybean. *Plant Cell*, **3**, 49-59.
- Whisson, S.C., Boevink, P.C., Moleleki, L., Avrova, A.O., Morales, J.G., Gilroy, E.M., Armstrong, M.R., Grouffaud, S., van West, P., Chapman, S., Hein, I., Toth, I.K., Pritchard, L. and Birch, P.R.J. (2007) A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, **450**, 115-+.
- Whitaker, B.D. (1988) Changes in the Steryl Lipid-Content and Composition of Tomato Fruit during Ripening. *Phytochemistry*, **27**, 3411-3416.
- Whitaker, B.D. (1994) Lipid Changes in Mature-Green Tomatoes during Ripening, during Chilling, and after Rewarming Subsequent to Chilling. *J Am Soc Hortic Sci*, **119**, 994-999.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Gotz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A. and Nurnberger, T. (2011) *Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *PNAS*, **108**, 19824-19829.
- Xiao, S., Ellwood, S., Findlay, K., Oliver, R.P. and Turner, J.G. (1997) Characterization of three loci controlling resistance of *Arabidopsis thaliana* accession Ms-0 to two powdery mildew diseases. *Plant J*, **12**, 757-768.
- Xu, H.X. and Mendgen, K. (1994) Endocytosis of 1,3-Beta-Glucans by Broad Bean Cells at the Penetration Site of the Cowpea Rust Fungus (Haploid Stage). *Planta*, **195**, 282-290.
- Yang, H., Bard, M., Bruner, D.A., Gleeson, A., Deckelbaum, R.J., Aljinovic, G., Pohl, T.M., Rothstein, R. and Sturley, S.L. (1996) Sterol esterification in yeast: a two-gene process. *Science*, **272**, 1353-1356.
- Yang, S., Yang, H., Grisafi, P., Sanchatjate, S., Fink, G.R., Sun, Q. and Hua, J. (2006) The BON/CPN gene family represses cell death and promotes cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J*, **45**, 166-179.
- Yoo, S.D., Cho, Y.H. and Sheen, J. (2007) *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, **2**, 1565-1572.
- Yun, B.W., Atkinson, H.A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N.D., Pallas, J.A. and Loake, G.J. (2003) Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant J*, **34**, 768-777.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., Chen, S., Tang, X. and Zhou, J.M. (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, **1**, 175-185.
- Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P. and Somerville, S. (2004) Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J*, **40**, 633-646.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W. (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*, **136**, 2621-2632.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T. and Felix, G. (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749-760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764-767.
- Zweytick, D., Athenstaedt, K. and Daum, G. (2000a) Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. *Biochim Biophys Acta*, **1469**, 101-120.
- Zweytick, D., Leitner, E., Kohlwein, S.D., Yu, C., Rothblatt, J. and Daum, G. (2000b) Contribution of Are1p and Are2p to steryl ester synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, **267**, 1075-1082.

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1-1.	Modell pflanzlicher Resistenzmechanismen.....	1
Abbildung 1-2.	Haustorien filamentöser Pathogene – Nährstoffaufnahme und Effektorsekretion.	3
Abbildung 1-3.	Schematische Darstellung der Pathogen-induzierten Akkumulation von Komponenten der Nichtwirtsresistenz in Mikrodomänen der Plasmamembran unterhalb der Angriffsstelle.....	10
Abbildung 1-4.	Infektionszyklus von <i>P. infestans</i> und Symptome auf suszeptiblen Kartoffelpflanzen.	12
Abbildung 1-5.	Sterolbiosynthese und Sterolbiosynthese-Mutanten in Arabidopsis.	15
Abbildung 1-6.	Freie Sterole und Sterolkonjugate.....	17
Abbildung 3-1.	Morphologie der <i>pen2erp1</i> -Mutante auf ATS-Platten und Erde im Vergleich zu <i>gll</i> - und <i>pen2</i> -Pflanzen	42
Abbildung 3-2.	Frühere Blattseneszenz adulter <i>pen2erp1</i> -Pflanzen im Vergleich zu <i>gll</i> und <i>pen2</i>	43
Abbildung 3-3.	<i>P. infestans</i> -Inokulation induziert in <i>pen2erp1</i> eine verstärkte Zelltodreaktion und Callose-Ablagerungen im Mesophyll.	45
Abbildung 3-4.	Elektronenmikroskopische Aufnahmen der <i>P. infestans</i> -induzierten Callose-Depositionen im Mesophyll von <i>pen2erp1</i>	46
Abbildung 3-5.	Allel-spezifische CAPS-Marker für <i>erp1</i> und <i>pen2</i>	47
Abbildung 3-6.	Die Mutation in <i>pen2erp1</i> betrifft das Gen <i>PSAT1</i> (<i>At1g04010</i>).....	48
Abbildung 3-7.	Nichtwirtsresistenz-Phänotyp verschiedener <i>erp1</i> -Allele nach Inokulation mit <i>P. infestans</i>	51
Abbildung 3-8.	Komplementationsanalysen bestätigen <i>PSAT1</i> als in <i>erp1-3</i> betroffenes Kandidatengen	52
Abbildung 3-9.	Punktmutationen und T-DNA-Insertionen in <i>ERP1</i> führen nicht zu einem Verlust des Transkripts.	54
Abbildung 3-10.	Spezifischer anti-PSAT1-Antikörper detektiert rekombinantes ERP1- und <i>erp1-3</i> -Protein...55	
Abbildung 3-11.	Veränderte Sterollipid-Zusammensetzung und fehlende Nilrot-Fluoreszenz von Lipidtröpfchen in <i>erp1</i> -Mutanten.	57
Abbildung 3-12.	Einfluss von <i>P. infestans</i> auf das Sterolprofil von <i>gll</i> und <i>erp1-3</i>	58
Abbildung 3-13.	Erhöhtes Verhältnis von Stigmasterol zu Sitosterol in <i>P. infestans</i> -behandelten Arabidopsis-Blättern.	59
Abbildung 3-14.	Lokalisation des PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsproteins in transgenen Arabidopsis-Linien.....	61
Abbildung 3-15.	PSAT1/ERP1-GFP ist nicht mit zytosolischen Lipidtröpfchen assoziiert	62
Abbildung 3-16.	PSAT1/ERP1-GFP ist nicht in Peroxisomen oder dem Golgi-Apparat lokalisiert	63
Abbildung 3-17.	Keine erhöhte <i>PDF1.2</i> - und <i>PRI</i> -Transkriptakkumulation in <i>P. infestans</i> -behandelten und -unbehandelten <i>erp1</i> -Mutanten.	65
Abbildung 3-18.	<i>GSL5/PMR4</i> ist essentiell für die Wund-induzierte, aber nicht für die <i>P. infestans</i> -induzierte Callose-Deposition in <i>erp1</i> -Pflanzen	67
Abbildung 3-19.	Die Expression von Infestin 1 (INF1) durch <i>P. infestans</i> beeinflusst weder die Wirtsinteraktion mit Kartoffel noch die Nichtwirtsinteraktion mit Arabidopsis	69
Abbildung 3-20.	Effekt von Mutationen in <i>ERP1</i> auf die Nichtwirtsresistenz gegen <i>Bgh</i> und <i>C. lagenarium</i>	71
Abbildung 3-21.	Effekt von Mutationen in <i>ERP1</i> auf die Anfälligkeit gegenüber <i>C. higginsianum</i>	72
Abbildung 3-22.	Effekt von Mutationen in <i>ERP1</i> auf die Anfälligkeit gegenüber <i>G. cruciferarum</i> und <i>G. cichoracearum</i>	73
Abbildung 3-23.	Effekt von Mutationen in <i>ERP1</i> auf die Reaktion gegenüber <i>P. syringae</i>	75
Abbildung 3-24.	flg22-Behandlung führt zu einer stärkeren Inhibierung des Wurzelwachstums von <i>erp1</i> -Keimlingen	77
Abbildung 3-25.	Die Konstitutive Reprimierung der <i>BON2</i> -Expression im <i>erp1-3</i> (BC1)-Hintergrund beruht auf einer Hintergrundmutation.....	80
Abbildung 3-26.	Nach <i>P. infestans</i> -Behandlung differentiell exprimierte Gene in <i>gll</i> , <i>pen2</i> , <i>pen2erp1-3</i> und <i>erp1-3</i>	82
Abbildung 3-27.	Differentielle Genexpression in <i>gll</i> , <i>pen2</i> , <i>erp1-3</i> und <i>pen2erp1-3</i> nach <i>P. infestans</i> -Behandlung (6 hpi).	83
Abbildung 3-28.	Differentielle Genexpression in <i>gll</i> , <i>pen2</i> , <i>erp1-3</i> und <i>pen2erp1-3</i> nach <i>P. infestans</i> -Behandlung (12 hpi).	84
Abbildung 3-29.	<i>P. infestans</i> moduliert die Expression von <i>StPSAT</i> und das Sterolprofil von Kartoffel.....	86
Abbildung 3-30.	Die Überexpression von <i>AtPSAT/ERP1</i> bzw. <i>erp1-3</i> in Kartoffel bewirkt keine Veränderung der Anfälligkeit gegenüber <i>P. infestans</i>	88
Abbildung 3-31.	Das Wachstum von <i>P. infestans</i> auf <i>StPSAT</i> -RNAi Kartoffel-Linien ist nicht verändert.....	89
Abbildung 4-1.	Modell über die Bedeutung der Sterolhomöostase in der Nichtwirtsrestistenz gegenüber <i>P. infestans</i>	117

8 ANHANG

8.1 AUFLISTUNG DER IN DER VORLIEGENDEN STUDIE VERWENDETEN PRIMER

Primer Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz in 5'→3' Orientierung	Anwendung	Fragmente (bp)	AT (°C)
PSAT-qRT2-neu-F PSAT-qRT2-neu-R	TAAAGGTCACGCTCTTCCAA GCGAATTCGAAATCAGTAACG	PR1PR2: Nachweis der T-DNA-Insertion in SALK_037289 (erp1-1)	gen. 1081, CDS 519	55
PSAT-qRT1-neu-F PSAT-qRT1-neu-R	TCTGCTAGTTCACGGGCTGT TGGCGGCCCTTCTATAGTATT	PR3PR4: Nachweis der T-DNA-Insertion in SALK_117091 (erp1-2)	gen. 968, CDS 503	55
erp11-SNP-CDS-F erp11-SNP-CDS-R	TGTCCATACACTCCGTTGGA GCTCCAACAGCGAAATAAGC	CDNA Sequenzierung, Nachweis der Punktmutation in erp1-4	CDS 505	55
erp1-SNP-CDS-F erp1-SNP-CDS-R	TCATTTACTCTCTTGGTGCAA GCAGATGTGTTCTCAATCTACA	CDNA Sequenzierung, Nachweis der Punktmutation in erp1-3	CDS 515	55
PSAT_FCD_F (mit CACC) PSAT-FCD-F (ohne CACC) PSAT-FCD-R-Neu	CACCATGGGAGCGAATTCGAAATCAGTAAC ATGGGAGCGAATTCGAAATCAGTAAC TTATATGTACTGGAGAAGCATATTAGCAGATGTG	pENTR Klonierung Amplifikation des offenen PSAT Leserasters	gen. 4426, CDS 1902	55
PSATerp1-STP (rev) PSATCol-STP (rev)	GTAGCAATCCGCATCTCTAAGTGG TATGTACTGGAGAAGCATATTAGCAGATGTG	Klonierung mit C-terminaler Fusion	gen. 4423, CDS 1899	55
4010-CAPS-Neu-F 4010-CAPS-Neu-R	CAACTTTGTCCTAAGTGAACATCC CATGACATTCAGCCTGGTG	<i>erp1-3</i> CAPS Marker, Verdau: <i>Bse</i> NI	gen. 353, nach Spaltung 203 + 150 (WT)	58
PMR4-CAPS-F PMR4-CAPS-R	TTACCAGCCCAACCAATTTTC AGATCAGGGACATGGGACAG	<i>pmr4-1</i> CAPS Marker, Verdau: <i>Eae</i> I	gen. 799, nach Spaltung 482 + 317 (WT)	58
PEN2B-F PEN2B-R	GCATCTCTCAATCACGCATT TCCCTTTTGCCATCTGTTTT	<i>pen2</i> CAPS Marker, Verdau: <i>Bsp</i> PI oder <i>Alw</i> I	gen. 1250, nach Spaltung 500 + 300 + 250 (WT) bzw. 800 + 250 (<i>pen2</i>)	58
CAPSerp1-11-F CAPSerp1-11-R	GCTGTTTTAAGTGTATGGTGCT TTTCAAAGGAAAATCCAGTGA	<i>erp1-4</i> CAPS Marker, Verdau: <i>Bst</i> XI	gen. 876, nach Spaltung 572 + 304 (WT)	58

PR, Primer; bp, Basenpaare; AT, *Annealing* Temperatur; rev, *reverse*; gen., genomische Sequenz; CDS, *coding sequence*; WT, Wildtyp

8.2 SONDEN UND PRIMER FÜR QRT-PCR ANALYSEN

Gen-bezeichnung	Genbank Nr.	Sonden Nr. (Katalog Nr.) ¹	Forward und Reverse Primer
<i>PP2A</i>	At1G13320 ²	#29 (04687612001)	5'-GACCGGAGCCAAGTACTAGGAC-3' 5'-AAAACCTTGGTAACTTTTCCAGCA-3'
<i>RbohD</i>	At5G47910 ²	#83 (04689062001)	5'-TTTTGACATGGTGGACAAAGA-3' 5'-GAGCTTGTTCGAGCAAGCACT-3'
<i>FRK1</i>	At2G19190 ²	#33 (04687663001)	5'-GAGACTATTTGGCAGGTAAAAGGT-3' 5'-AGGAGGCTTACAACCATTGTG-3'
<i>OXII</i>	At3G25250 ²	#119 (04693531001)	5'-GGACGGTCACGATTTTGC-3' 5'-GCGTCGCTCCATACAACAT-3'
<i>PSAT1/ERP1</i>	At1g04010 ²	#35 (04687680001)	5'-CATGCTTATTTGCTGTTGG-3' 5'-CGAGCAGTTCCTCAGAAAC-3'
<i>StEF1α</i>	AB061263 ²	#162 (04694490001)	5'-CACTGCCAGGTCATCATC-3' 5'-GTCGAGCACTGGTGCATATC-3'
<i>StPSAT</i>	TA31107_4113 ³	#20 (04686934001)	5'-CGATGAGCATGAACTTAAATCAA-3' 5'-GATAAACCTCATTCCCTCGAATC-3'

¹ ROCHE Universal ProbeLibrary (www.roche-applied-science.com); ² Arabidopsis Genome initiative and EMBL/GenBank; ³ TIGR Plant Transcript Assemblies Database

8.3 SEQUENZIERUNG VON *PSAT1/ERP1*-CDNA-FRAGMENTEN AUS *erp1-3* UND *erp1-4*

Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt der Sequenz, die mit Hilfe spezifischer Primer mittels One-Step-RT-PCR aus *erp1-3* und *erp1-4* RNA amplifiziert wurde. Die PCR-Produkte wurden nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarose-Gel eluiert und in den Vektor PCR2.1 kloniert. Die Plasmid-DNA von jeweils 2 Klonen pro Konstrukt wurde mit M13-uni Sequenzier-Primern sequenziert. Für *erp1-3* und *erp1-4* konnten die SNPs an entsprechender Position der *PSAT1 cDNA* bestätigt werden (rote Box). Das Sequenzalignment erfolgte mit dem Internettool ClustalW (s. 2.1.7).

erp1-3:

```

1_erp1-3      TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
2_erp1-3      TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
4_pen2erp1-3  TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
6_pen2erp1-3  TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
13_g11       TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
14_pen2      TGCGGATTGCTACTGAGATTACGGGAAAGCCTGTTGTGCTTGGCAAGAATACTGTGAATA
*****

```

erp1-4:

```

8_erp1-4      GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
9_erp1-4      GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
10_pen2erp1-4 GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
11_pen2erp1-4 GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
15_g11       GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
16_pen2      GAGTTTGGTATAGAAGCAAATGCAATTGTCGCTGTTCATACGATTGAAGATTGTCACCA
*****

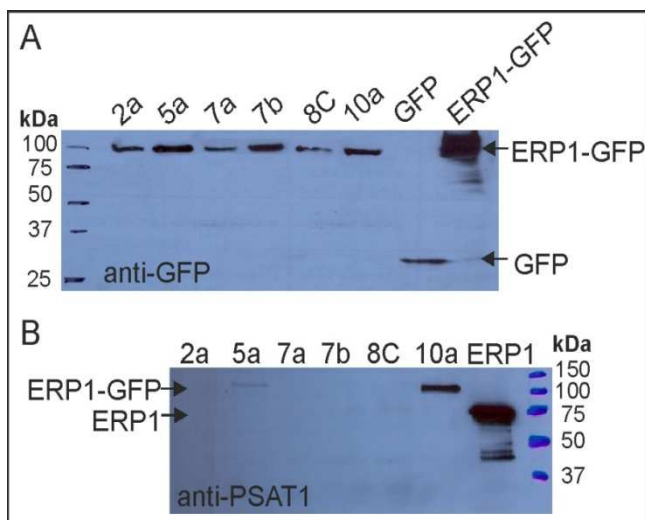
```


8.4 ANTI-PSAT1/ERP1 PEPTID-ANTIKÖRPER VON EUROGENTEC

AK PSAT-1 **CDEEEYQSKYSGWPT**AK PSAT-2 **CPVFNPLTPWERPPIK**

ERP1 (633 Aminosäuren)

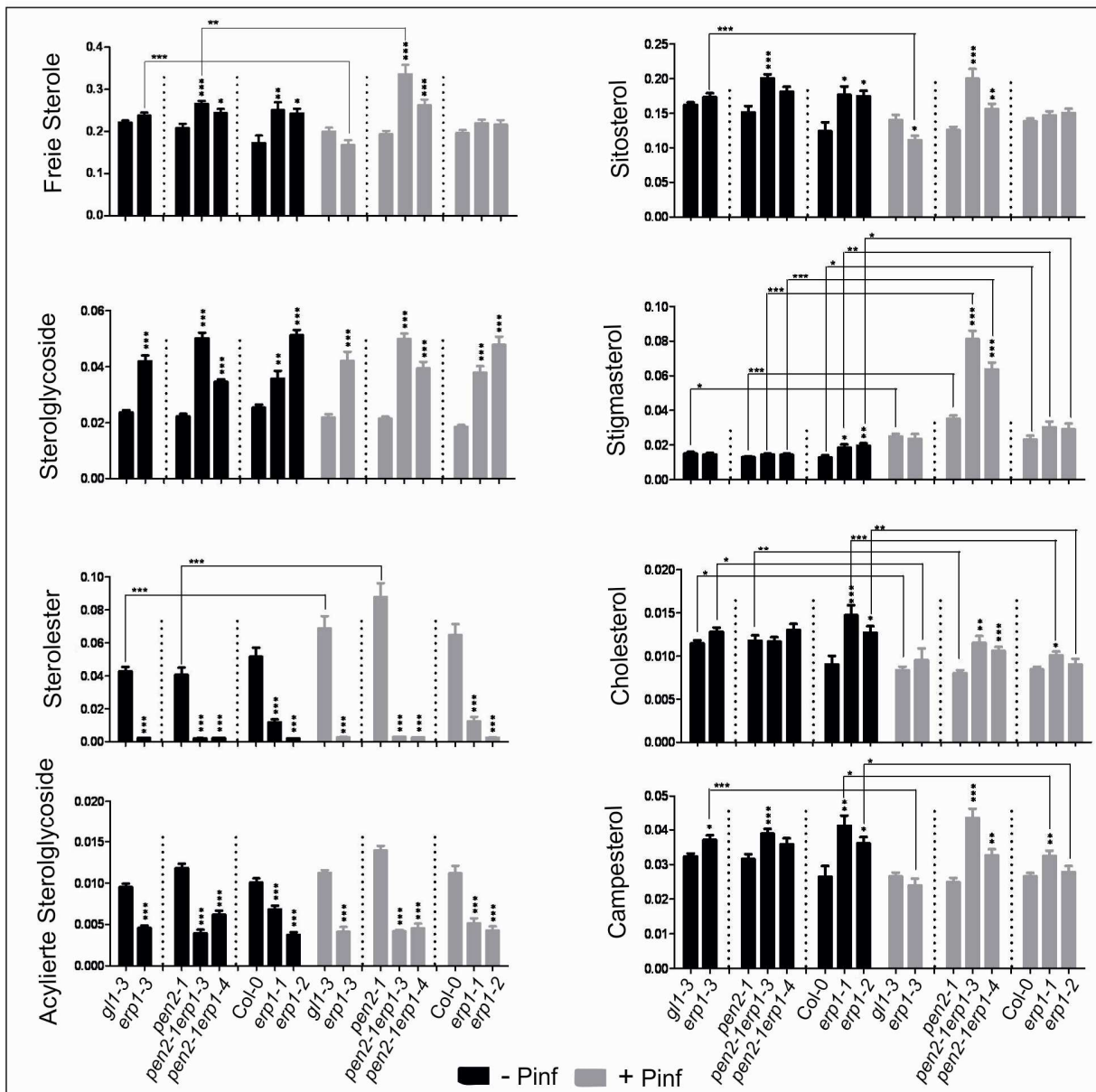
MGANSKSVTASFTVIAVFFLICGGRTAVEDETEFHGDYSKLSGIIIPGFASTQLRAWSILDCPYTPLDFNPL
 DLVWLDTTKLLSAVNCWFKCMVLDPNQTDHPECKSRPDSGLSAITELDPGYITGPLSTVWKEWLKW
 CVEFGIEANAIVAPYDWRLSPTKLEERDLYFHKLKLTFTETALKLRGGPSIVFAHSMGNVFRYFLEWL
 RLEIAPKHLYLKWLDQHIHAYFAVGAPLLGSVEAIKSTLSGVTFGPLVSEGTARLLSNSFASLWLMPSFK
 NCKGDNTFWTHFSGGAACKDKRVYH**CDEEEYQSKYSGWPT**NIINIEIPSTSVTETALVNMTSMECGLPT
 LLSFTARELADGTLFKAIEDYDPDSKRMLHQLKLYHDD**CPVFNPLTPWERPPIK**NVFCIYGAHLKTEVG
 YYFAPSGKPYPDNWIITDIYETEGSLVSRSGTVVDGNAGPITGDETVPYHLSLWCKNWLGPKNITMAP
 QPEHDGSDVHVELNVDHEHGSDIANMTKAPRVKYITFYEDSESIPGKRTAVWELDKTNHRNIVRSPVL
 MRELWLQMWHDIQPGAQSKFVTKAKRGPLRDADCY**WDY**GKACCAWQEYCEYRYSFGDVHLGQSCR
 LRNTSANMLLQYI

**Abbildung 8-1**

Gesamtprotein-Extrakte aus Blättern von Pro35S:PSAT1/ERP1-GFP-exprimierenden transgenen Arabidopsis Linien (T1 Generation) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (10%iges Polyacrylamid-Gel). Die Detektion des PSAT1/ERP1-GFP-Fusionsproteins erfolgte in **(A)** mit einem anti-GFP Antikörper (Invitrogen, #A11122) und in **(B)** mit dem anti-PSAT1 Antikörper PSAT-2. Als Positivkontrollen dienten in **(A)** in *E. coli* rekombinant exprimiertes PSAT1/ERP1-GFP (ca. 100 kDa) und in Tabak rekombinant exprimiertes GFP (ca. 30k Da). In **(B)** diente rekombinant in *E. coli* exprimiertes PSAT1/ERP1 (ca. 70k Da) als Kontrolle.

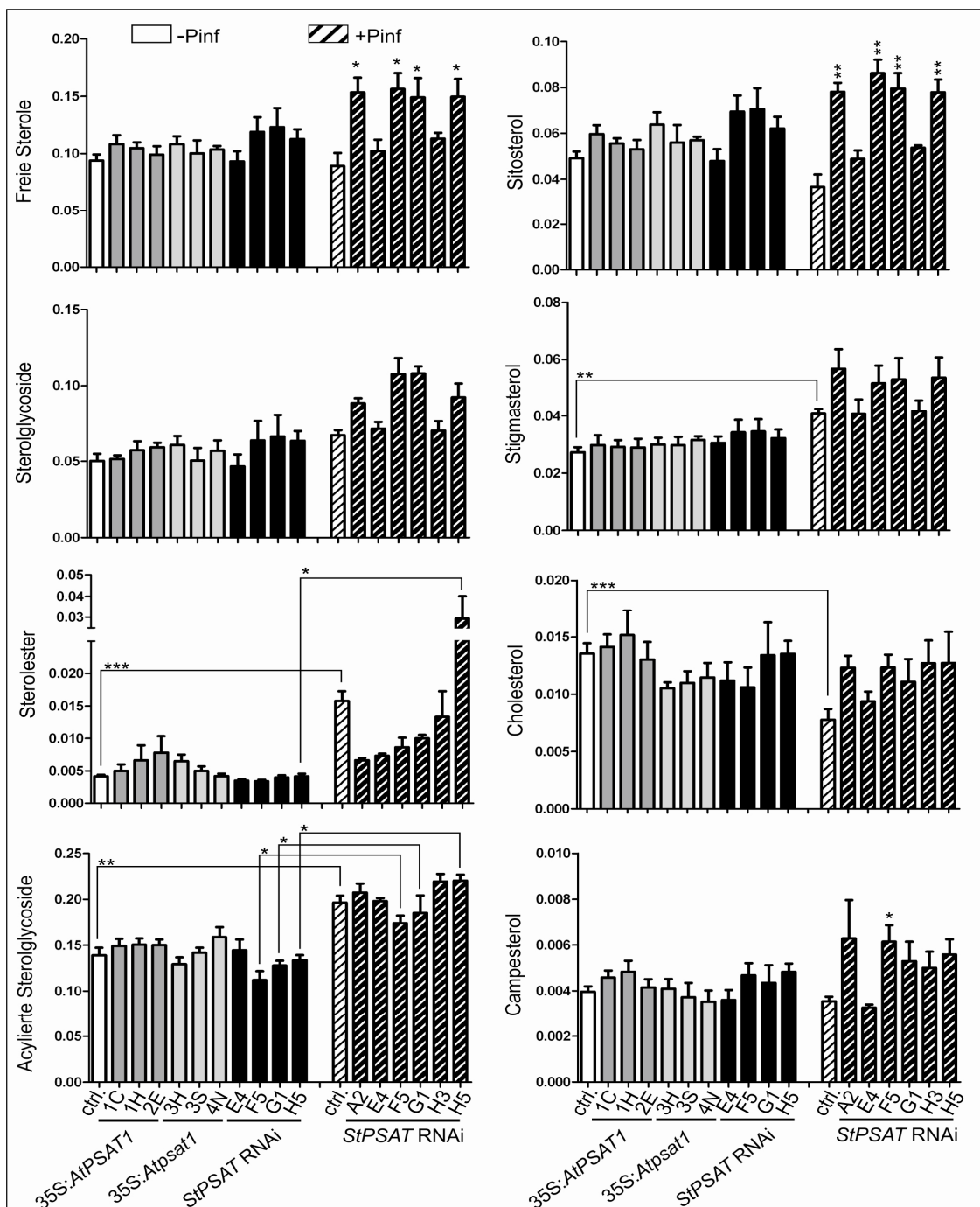
8.5 STEROLPROFIL *P. INFESTANS*-BEHANDELTER UND -UNBEHANDELTER ARABIDOPSIS *erp1*-MUTANTEN UND DER ENTSPRECHENDEN KONTROLLEN

Dargestellt sind Mittelwerte der Mengen (nmol mg⁻¹ FW) der verschiedenen Sterollipid-Klassen und freier Sterole. Die Extraktion der Lipide erfolgte 3 Tage nach Tropfeninokulation mit *P. infestans* (+Pinf, 5x10⁵ Sporen ml⁻¹) bzw. Sprühen mit Wasser (-Pinf). Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollpflanzen unterscheiden, unabhängig von der Behandlung, wurden durch vertikal angeordnete Sternchen markiert (Mann Whitney Test). Signifikanzunterschiede zwischen unbehandelten und *P. infestans*-behandelten Pflanzen innerhalb eines Genotyps (durch Klammer verbunden) wurden durch horizontal angeordnete Sternchen markiert (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; 2 unabhängige Experimente, n=10



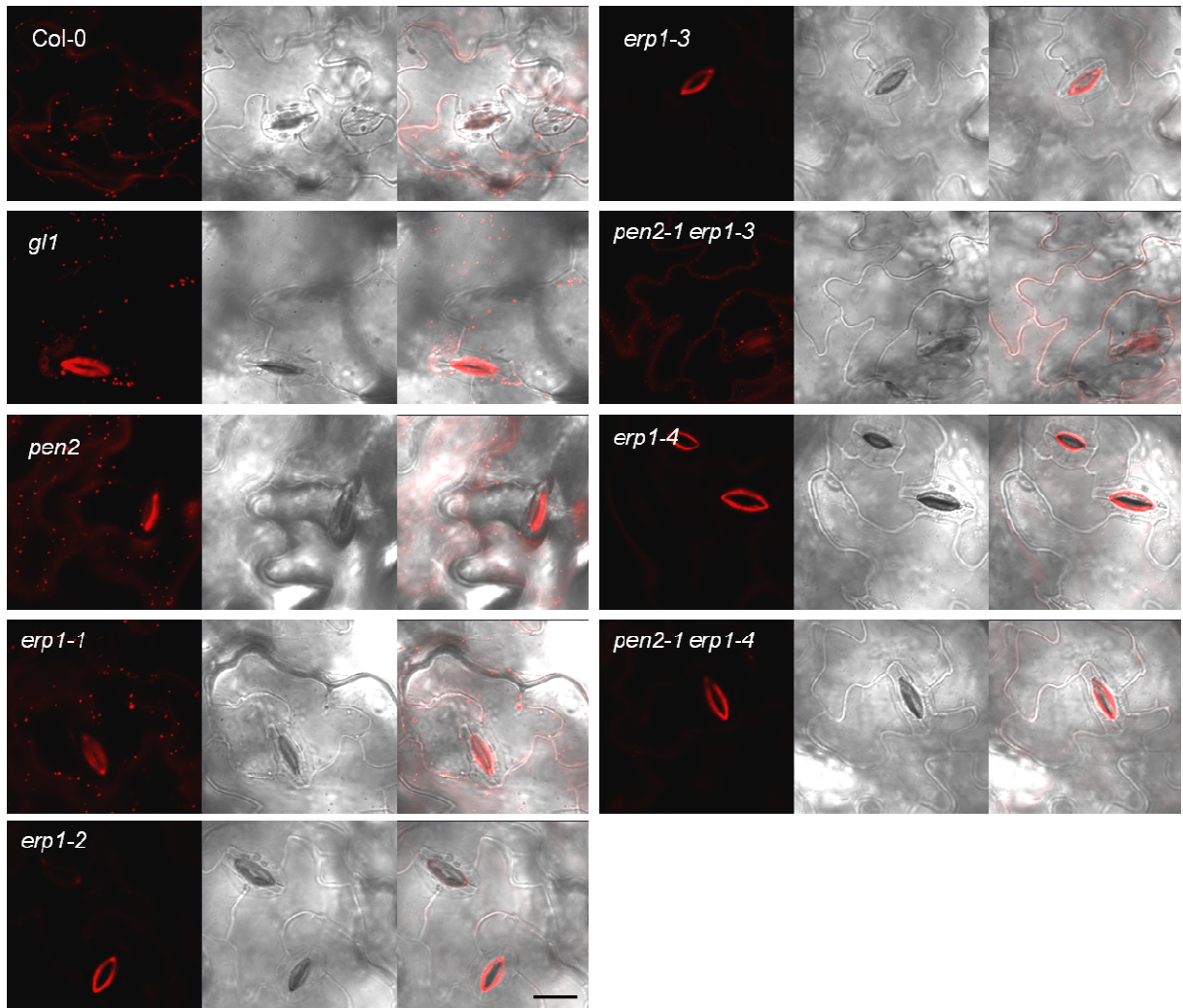
8.6 STEROLPROFIL TRANSGENER KARTOFFEL-LINIEN

Dargestellt sind Mittelwerte der Mengen (nmol mg⁻¹ FW) der verschiedenen Sterollipid-Klassen und freier Sterole. Die Extraktion der Lipide erfolgte 3 Tage nach Tropfeninokulation mit *P. infestans* (+Pinf, 5×10^5 Sporen ml⁻¹) bzw. Sprühen mit Wasser (-Pinf). Werte, die sich signifikant von denen der entsprechenden Kontrollpflanzen unterscheiden, unabhängig von der Behandlung, wurden durch vertikal angeordnete Sternchen markiert (Mann Whitney Test). Signifikanzunterschiede zwischen unbehandelten und *P. infestans*-behandelten Pflanzen innerhalb eines Genotyps (durch Klammer verbunden) wurden durch horizontal angeordnete Sternchen markiert (Zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni's *post-hoc* Test). Die Sterol-Messung in RNAi-Linien nach *P. infestans* Behandlung wurde nur einmal durchgeführt (n=3, bzw. 6 für die Kontrollen), alle anderen Daten entsprechen 2 unabhängigen Experimenten (n=6, bzw. 12 für die Kontrollen). ctrl., Kontrollen (*empty vector* und Wildtyp). *, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001.



8.9 NILROT-FÄRBUNG ZUM NACHWEIS DER NEUTRALLIPID-AKKUMULATION IN LIPIDTRÖPFCHEN

Nilrot-Färbung von Blattscheiben 5 Wochen alter Arabidopsis-Pflanzen. Gezeigt sind Lichtbildaufnahmen, Nilrot-Fluoreszenz zwischen 550-600nm der im Lichtbild abgebildeten Zellstrukturen (Nilrot) und die Überlagerung beider Kanäle (DIC + Nilrot). Maßstab = 10µm

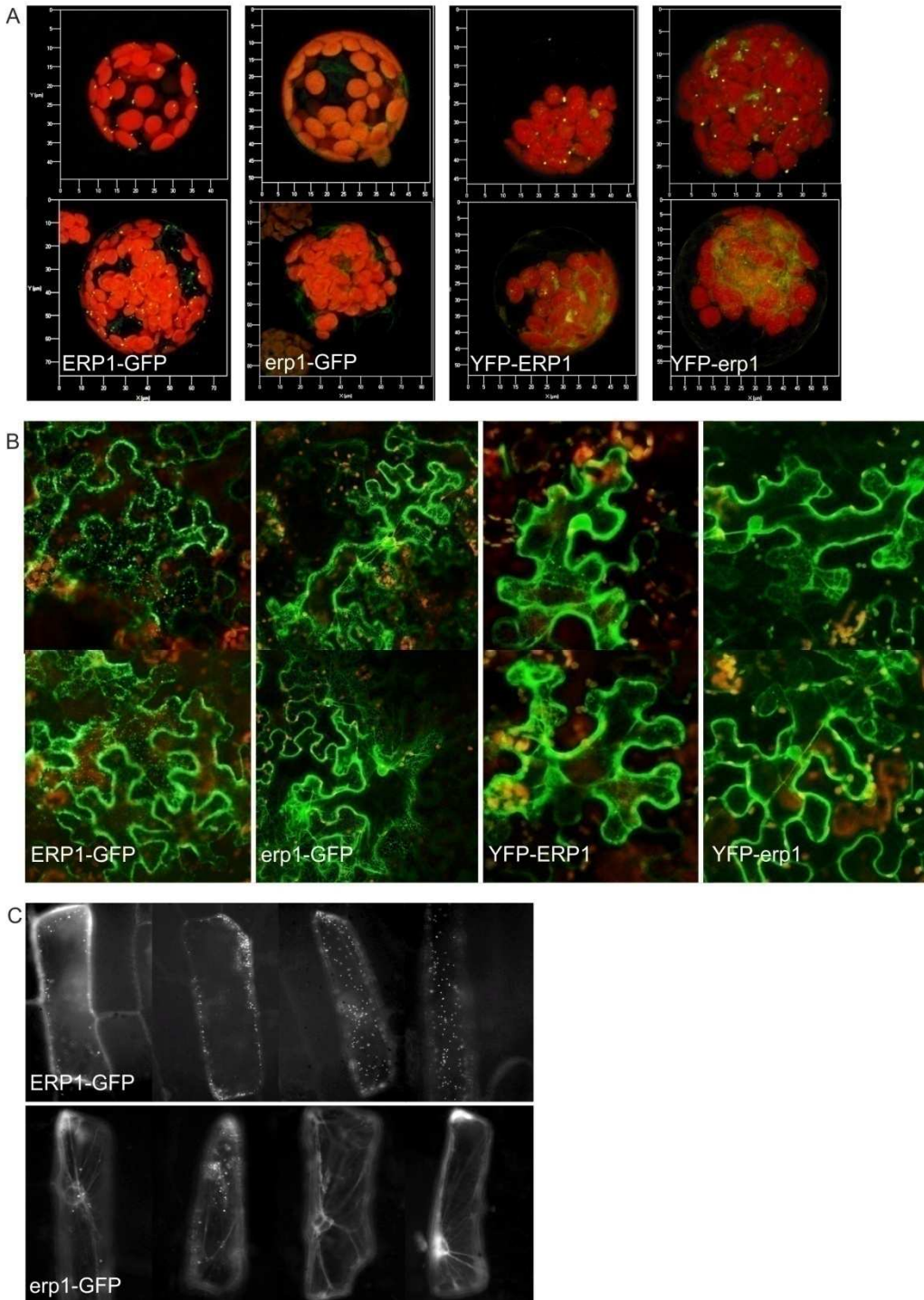


8.10 SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON PSAT1/ERP1- BZW. erp1-3-GFP-FUSIONSPROTEINEN IN TRANSIENTEN EXPRESSIONSYSTEMEN

(A) Arabidopsis-Protoplasten nach Transfektion mit *Pro35S:PSAT1/ERP1-GFP* oder *Pro35S:erp1-3-GFP* bzw. *Pro35S:YFP-PSAT1/ERP1* oder *Pro35S:YFP-erp1-3*. Dargestellt sind Maximalprojektionen eines Bildstapels (z-stack) von 40 Einzelbildern. Gezeigt sind jeweils 2 exemplarische Protoplasten-z-stacks.

(B) Epidermiszellen von Tabakblättern 3 Tage nach Transformation mit *Pro35S:PSAT1/ERP1-GFP* oder *Pro35S:erp1-3-GFP* bzw. *Pro35S:YFP-PSAT1/ERP1* oder *Pro35S:YFP-erp1-3*. Maßstab = 50µm

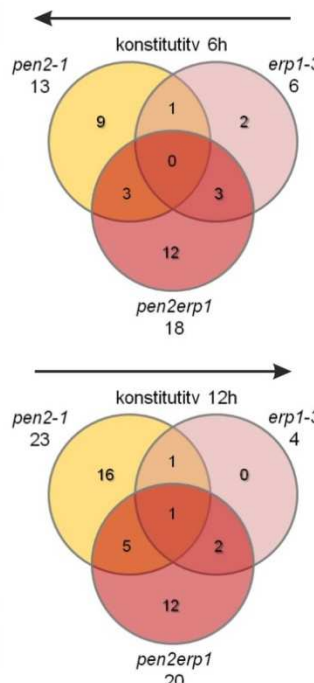
(C) Transiente Expression von *Pro35S:PSAT1/ERP1-GFP* bzw. *Pro35S:erp1-3-GFP* in Zwiebelepidermiszellen. Maßstab = 50µm



8.11 KONSTITUTIV DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE

Konstitutiv differentiell exprimierte Gene wurden in Proben ermittelt, die 6 bzw. 12 Stunden nach Wasser-behandlung geerntet wurden. Rot umrahmt sind die Gene, die zu beiden Zeitpunkten konstitutiv differentiell exprimiert wurden. Die Venn-Diagramme zeigen die Überlappungen der in *pen2*, *erp1-3* und *pen2erp1-3* konstitutiv differenziell exprimierten Gene, die in der Tabelle links (6 hpi) und rechts (12 hpi) von den Diagrammen aufgelistet sind.

konstitutiv differentiell exprimierte Gene (6 hpi)				konstitutiv differentiell exprimierte Gene (12 hpi)			
Vergleich	AGI-Code	TAIR Annotation	x-fach	Vergleich	AGI-Code	TAIR Annotation	x-fach
(1) <i>pen2/ gl1</i>	at2g44490	PEN2	-3.43	(1) <i>pen2/ gl1</i>	at2g30320	tRNA pseudouridine svnthase	-3.89
	at2g30320	tRNA pseudouridine svnthase	-2.54		at2g44490	PEN2	-3.15
	at1g06080	ADS1	2.03		at1g80440	kelch repeat F-box protein	-2.49
	at5g10760	aspartyl protease	2.04		at5g38870	transposable element	-2.29
	at1g75040	PR5	2.30		at2g05580	unknown	-2.09
	at4g23140	CRK6	2.43		at1g78410	VO motif protein	-2.06
	at1g76960	unknown	2.48		at1g21120	O-methyltransferase	-2.00
	at3g57260	PR-2	3.53		at3g11010	AtRLP34	2.06
	at2g14610	PR1	4.86		at5g64120	peroxidase	2.07
	(2) <i>erp1/ gl1</i>	at2g07718	cytochrome b		-2.11	at1g68600	unknown
	at2g07671	ATPase, C subunit	2.22	at3g44860	FAMT	2.16	
(3) <i>pen2erp1/ pen2</i>	atce00690	PSBT	-2.73	at5g04950	NAS1	2.17	
	atmg01360	COX1	-2.26	at5g06870	PGIP2	2.21	
	atcg00590	ORF31	-2.22	at1g76960	unknown	2.33	
	at4g33666	unknown	-2.20	at4g12490	LTP	3.62	
	at4g19430	unknown	-2.07	at2g14610	PR1	5.16	
	at5g12050	unknown	-2.22	(2) <i>erp1/ gl1</i>	-	-	
	at4g03060	AOP	2.00	(3) <i>pen2erp1/ pen2</i>	at2g40610	ATEXPA8	-2.48
	at4g12030	bile acid:sodium symporter	2.15	at5g23240	DNAJ heat shock protein	-2.25	
	at1g16410	CYP79F1	2.15	at1g74670	gibberellin-responsive protein	-2.25	
	at3g19710	BCAT4	2.51	at4g25810	XTR6	2.02	
	at5g23020	IMS2	2.59	at1g75040	PR5	2.09	
	at3g15720	polvgalacturonase (pectinase)	2.75	at1g21250	WAK1	2.09	
	(1) und (3)	at2g28450	zinc finger (CCCH-type)	-2.75	at2g07671	H ⁺ -transporting two-sector ATPase	2.10
	at3g30720	OOS	-2.33	at4g23140	CRK6	2.18	
	at5g10140	FLC	3.59	at3g56400	WRKY70	2.24	
(1) und (2)	at5g16140	pentidyl-tRNA hydrolase	-3.60	at2g14560	LURP1	2.50	
(2) und (3)	atmg00580	NAD4	-2.63	at5g03350	legume lectin protein	2.65	
	at5g07300	BON2	-2.92	at5g24530	DMR6	2.70	
	atmg01370	ORF111D	3.32	(1) und (3)	at5g10760	aspartyl protease	2.57
(1), (2) und (3)	-	-	-	at5g10140	FLC	4.25	
				at3g57260	PR-2	2.25	
				at3g30720	OOS	-2.09	
				at2g28450	zinc finger (CCCH-type) protein	-3.52	
				(1) und (2)	at5g16140	pentidyl-tRNA hydrolase	-2.18
				(2) und (3)	atmg00580	NAD4	-2.06
					at5g07300	BON2	-2.05
				(1), (2) und (3)	atmg01370	ORF111D	2.02



8.12 6 STUNDEN NACH *P. INFESTANS*-BEHANDLUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE

Auswahl von jeweils 10 Genen, die in Microarray-Experimenten nach *P. infestans*-Behandlung (6 hpi) im Vergleich zu den Wasser-Kontrollen in den entsprechenden Genotypen (linke Spalte) differentiell exprimiert wurden. Aufgeführt sind die fünf am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene, deren AGI-Code sowie die Bezeichnung und Funktion (nach TAIR).

	AGI-Code	TAIR Annotation	Funktion	x-fach
<i>gl1, pen2, pen2erp1-3, erp1-3</i>	at3g49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)	Entwicklung	125,91
	at3g26830	PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3)	Cytochrome P450	120,68
	at1g26380	FAD-binding domain protein	unbekannt	74,47
	at3g22600	lipid transfer protein (LTP)	Samenspeicher	55,99
	at4g16260	hydrolyzing O-glycosyl compounds	β -1,3-Glucanhydrolases	51,09
	at1g20190	ATEXPA11 (EXPANSIN 11)	Zellwandmodi.	-4,56
	at5g46690	bHLH071 (beta HLH protein 71)	Transkr. Regulation	-4,24
	at5g55620	unbekannt	unbekannt	-3,49
	at5g58310	MES18 (METHYL ESTERASE 18)	unbekannt	-3,31
	at3g12610	DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100)	DNA-Reperatur	-3,14
<i>pen2 und pen2erp1-3</i>	at1g32350	AOX1D (alternative oxidase 1D)	ATP synthese	108,39
	at1g19250	FMO1 (FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1)	Oxidasen	100,53
	at1g33960	AIG1 (AVRRPT2-INDUCED GENE 1)	biotischer Stress	75,16
	at1g61810	BGLU45 (BETA-GLUCOSIDASE 45)	Glucosidasen	69,37
	at2g24850	TAT3 (TYROSINE AMINOTRANSFERASE 3)	unbekannt	61,67
	at2g40610	ATEXPA8 (EXPANSIN A8)	Zellwandmodi.	-8,39
	at4g38860	auxin-responsive protein	Auxin-responsiv	-6,26
	at3g45970	ATEXLA1 (EXPANSIN-LIKE A1)	Zellwandmodi.	-6,06
	at1g20030	pathogenesis-related thaumatin	biotischer Stress	-5,56
	at4g03210	XTH9 (XYLOGLUCAN ENDOTRANGLUCOSYLASE/HYDROLASE 9)	Zellwandmodi.	-5,53
<i>pen2</i>	at4g29700	type I phosphodiesterase	Nukleotide	3,39
	at1g23800	ALDH2B7; 3-chloroallyl aldehyde dehydrogenase	Gärung	3,35
	at5g41080	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	Lipidabbau	3,35
	at5g52400	CYP715A1	Cytochrome	3,16
	at4g15620	integral membrane family protein	unbekannt	2,98
	at5g12050	unbekannt	unbekannt	-3,70
	at5g15770	AtGNA1	N-Acetylierung	-3,27
	at3g46610	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein	unbekannt	-3,19
	atcg00690	photosystem II 5 kD protein subunit PSII-T	Lichtreaktion	-3,11
	at4g22756	SMO1-2 (STEROL C4-METHYL OXIDASE 1-2)	Lipidstoffwechsel	-3,08
<i>pen2erp1-3</i>	at3g12580	HSP70	abiotischer Stress	14,35
	at2g44080	ARL (ARGOS-LIKE)	unbekannt	13,56
	at4g17245	zinc finger (C3HC4-type RING finger)	Proteinabbau (Ubiqu. E3)	4,86
	at2g38940	ATPT2 (PHOSPHATE TRANSPORTER 2)	Phosphattransport	4,44
	at5g05340	peroxidase	Peroxidase	4,36
	at5g24150	SQP1; squalene monooxygenase	Hormone (BR)	-5,50
	at3g15720	glycoside hydrolase	Zellwandabbau	-4,62
	at1g51090	heavy-metal-associated domain-containing protein	unbekannt	-4,39

Fortsetzung

	AGI-Code	TAIR Annotation	Funktion	x-fach
	at2g01150	RHA2B (RING-H2 FINGER PROTEIN 2B)	Proteinabbau (Ubiqu. E3)	-3,78
	at2g18300	(bHLH) family protein	Transkr. Regulation	-3,47
	at2g39725	unbekannt	unbekannt	2,10
<i>pen2erp1-3 und erp1-3</i>	at5g18170	GDH1 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 1)	N-Metabolismus	2,14
	at1g78820, at1g78830	mannose-binding lectin family protein	Myrosinase	2,27
	at2g44480	BGLU17 (BETA GLUCOSIDASE 17)	Glucosidase	2,49
	at4g32940	GAMMA-VPE (GAMMA VACUOLAR PROCESSING ENZYME)	Proteintransport	2,44
	at1g58420	unbekannt	unbekannt	2,17
	at1g20160	unbekannt	unbekannt	2,16
<i>erp1-3</i>	at5g59780	MYB59 (MYB DOMAIN PROTEIN 59)	Transkr. Regulation	2,13
	at1g07040	unbekannt	unbekannt	2,07
	at2g20950	unbekannt	unbekannt	2,06
	at1g31820	amino acid permease family protein	Aminosäuretransport	2,06
	at3g23920	BAM1 (BETA-AMYLASE 1)	Kohlenstoffwechsel	2,01
	at3g15680	zinc finger (Ran-binding)	G-Protein Signaltransduktion	-2,12

8.13 12 STUNDEN NACH *P. INFESTANS*-BEHANDLUNG DIFFERENTIELL EXPRIMIERTE GENE

Auswahl von jeweils 10 Genen, die in Microarray-Experimenten nach *P. infestans*-Behandlung (12 hpi) im Vergleich zu den Wasser-Kontrollen in den entsprechenden Genotypen (linke Spalte) differentiell exprimiert wurden. Aufgeführt sind die fünf am stärksten induzierten bzw. reprimierten Gene, deren AGI-Code sowie die Bezeichnung und Funktion (nach TAIR).

	AGI-Code	TAIR Annotation	Funktion	x-fach
<i>gll, pen2, pen2erp1-3, erp1-3</i>	at3g22600	lipid transfer protein (LTP) family protein	unbekannt	103,95
	at3g26830	PAD3 (PHYTOALEXIN DEFICIENT 3)	Cytochrome P450	65,92
	at4g08770	peroxidase	unbekannt	68,76
	at3g49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)	Entwicklung	67,89
	at2g30770	CYP71A13	Cytochrome P450	63,65
	at5g08640	FLS (FLAVONOL SYNTHASE)	Sekundärmetabol.	-13,61
	at5g05270	chalcone-flavanone isomerase	Sekundärmetabol.	-8,68
	at4g12880	plastocyanin-like domain-containing protein	unbekannt	-8,48
	at5g48880	PKT2 (PEROXISOMAL 3-KETO-ACYL-COA THIOLASE 2)	Aminosäuren	-7,80
	at4g30610	BRS1 (BRI1 SUPPRESSOR 1)	Hormone (BR)	-7,46
<i>pen2 und pen2erp1-3</i>	at1g19250	FMO1 (FLAVIN-DEPENDENT MONOOXYGENASE 1)	unbekannt	90,95
	at1g33960	AIG1 (AVRRPT2-INDUCED GENE 1)	biotischer Stress	77,95
	at3g13610	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase	unbekannt	42,80
	at3g11340	UDP-glucuronosyl/UDP-glucosyl transferase	unbekannt	38,62
	at1g17170	ATGSTU24 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 24)	unbekannt	34,79
	at1g65060	4CL3; 4-coumarate-CoA ligase	Sekundärmetabol.	-7,73
	at1g23205	invertase/pectin methylesterase inhibitor	unbekannt	-7,18
	at1g74670	gibberellin-responsive protein	Hormone (GA)	-6,47
	at1g60590	polygalacturonase, putative	Zellwandabbau	-6,21
	at5g20630	GER3 (GERMIN 3)	abiotischer Stress	-5,94
<i>pen2</i>	at2g02990	RNS1 (RIBONUCLEASE 1)	RNA-Prozessierung	4,13
	at2g23270	unbekannt	unbekannt	3,87
	at1g28390	protein kinase family protein	Signaltransduktion	3,86
	at1g06620	2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Redoxstatus	3,55
	at4g23140	CRK6 (CYSTEINE-RICH RLK 6)	Signaltransduktion	3,29
	at2g23000	scpl10 (serine carboxypeptidase-like 10)	Proteinabbau	-7,11
	at5g06790	unbekannt	unbekannt	-3,56
	at5g14410	unbekannt	unbekannt	-3,31
	at5g12050	unbekannt	unbekannt	-3,28
	at1g21910	AP2 domain-containing transcription factor	Transkr. Regulation	-3,09
<i>pen2erp1-3</i>	at1g05680	UDP-glucosyl transferase family protein	unbekannt	16,48
	at2g47000	ABC4 (ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B4)	Transport	11,06
	at2g21640	oxidative stress response	unbekannt	6,88
	at1g03660	unbekannt	unbekannt	6,83
	at3g60140	DIN2 (DARK INDUCIBLE 2)	Entwicklung	6,65
	at1g35140	PHI-1 (PHOSPHATE-INDUCED 1)	Signaltransduktion	-5,03
	at5g17220	ATGSTF12 (GLUTATHIONE S-TRANSFERASE PHI 12)	unbekannt	-4,21
	at5g48490	lipid transfer protein (LTP) family protein	Samenspeicher	-3,99

Fortsetzung

	AGI-Code	TAIR Annotation	Funktion	x-fach
	at5g49330	AtMYB111	Transkr. Regulation	-3,38
	at3g58120	ATBZIP61	Transkr. Regulation	-3,13
<i>pen2erp1-3 und erp1-3</i> keine Überlappung				
<i>erp1-3</i>	at1g78270	AtUGT85A4 (UDP-glucosyl transferase 85A4)	unbekannt	2,07
	at1g18360	hydrolase, alpha/beta fold family protein	unbekannt	-2,14

8.14 *P. INFESTANS*-INDUZIERTE DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION IM VERGLEICH

Vergleich der in Huitema et al. (2003) und der vorliegenden Arbeit identifizierten Gene, die in Col-3 (Huitema et al. 2003) bzw. *gll* nach *P. infestans*-Behandlung differentiell exprimiert werden. Die in beiden Arbeiten als differentiell exprimierte Gene sind rot gekennzeichnet. Die Einordnung der Gene verschiedene funktionale Gruppen wurde aus der Arbeit von Huitema et al. (2003) übernommen.

mögliche Funktion	AGI Code	Huitema, et al. (2003)		vorliegende Studie	
		16 hpi (x-fach)	Replika 1	Replikat 2	6 hpi (x-fach)
Stress/Abwehr					
leucine-rich repeats protein	At5g25350	3,02	4,05	-	-
catalase 3	At1g20620	2,02	3,00	-	3,01
peroxidase	At2g37130	2,08	4,03	2,56	3,65
glutathione transferase	At2g30860	2,04	2,06	-	2,21
glutathione transferase	At4g02520	2,02	2,07	10,48	12,34
family II lipase EXL3	At1g75900	2,03	2,06	-	2,41
lipoxygenase AtLOX2	At3g45140	-1,80	-2,30	2,25	2,41
thaumatin-like protein	At1g75030	-1,30	-1,30	-	-
Zellwandmodifikation					
xylosidase	At5g49360	2,04	3,01	-	-
xylosidase	At5g64570	2,09	4,01	-	-
β-galactosidase	At5g56870	2,05	4,07	3,81	-
galactosidase	At3g13750	2,01	2,07	-	-
Entwicklung					
ethylene response sensor ERS	At2g40940	2,05	3,06	-	-
SEN1	At4g35770	2,02	3,00	3,24	4,03
dormancy-associated protein	At1g28330	2,04	2,07	-	-
auxin-regulated protein	At2g33830	2,04	2,08	-	-
cytochrome P450 CYP83B1	At4g31500	2,09	4,02	3,02	2,89
late embryogenesis abundant nodulin-like protein	At4g02380	5,00	6,02	14,22	3,40
	At5g14120	2,00	3,01	-	-
Metabolismus					
amino transferase	At1g10070	3,04	3,05	23,79	5,43
keto-acid dehydrogenase	At1g21400	3,07	3,06	3,32	-
tetrahydrofolate synthetase	At1g50480	2,03	2,08	-	2,14
acetolactate synthase	At2g31810	2,08	2,07	-	-

Fortsetzung

mögliche Funktion	AGI Code	Huitema, et al. (2003)		vorliegende Studie	
		16 hpi (x-fach)	3,01	6 hpi (x-fach)	12 hpi (x-fach)
Metabolismus					
phytochelatin synthase AtPCS1	At5g44070	2,02	3,01	-	-
formate dehydrogenase FDH	At5g14780	2,01	3,00	-	2,11
aldehyde dehydrogenase	At1g54100	2,02	2,09	3,40	2,04
triosephosphate isomerase	At2g21170	2,01	2,02	-	-
molybdopterin synthase	At5g55130	2,05	2,01	-	-
glucose transporter	At1g11260	2,05	2,02	-	-
Transkription					
AP2 domain protein RAP2.3	At3g16770	1,02	1,03	-	-
transcription regulator protein	At3g48530	1,02	1,03	-	-
Andere					
RNA binding protein AtGRP7	At2g21660	1,02	1,02	-	-
putative patatin	At2g26560	1,02	1,05	5,64	11,98
similar to ubiquitin	At1g26270	2,08	1,02	-	-
villin 3 fragment	At3g57410	2,07	2,08	-	-
putative myosin heavy chain	At2g32240	3,05	4,07	3,92	2,25
elongation factor 1-alpha	At1g07940	2,05	2,05	-	-
60S ribosomal protein L7A	At3g62870	1,09	3,04	-	-
Unbekannt					
unknown ORF	At1g31580	2,09	1,02	-	-
expressed protein	At5g57655	1,01	3,12	-	-
expressed protein	At2g36320	2,10	1,03	-	-
expressed protein	At3g01290	2,66	4,24	5,25	2,88
expressed protein	At3g15450	1,01	1,02	-	-
expressed protein	At1g21680	2,05	1,03	-	-
unknown protein	At2g30600	2,04	1,02	-	-
unknown protein	At1g73960	1,02	1,03	-	-
unknown protein	At1g78110	2,08	1,02	-	-
conserved hypothetical protein	At3g24860	2,05	1,03	-	-
hypothetical protein	At4g16110	1,03	1,01	-	-
hypothetical protein	At3g49590	2,07	1,02	-	-
putative protein	At4g17900	1,02	1,03	-	-
putative protein	At4g24690	2,05	1,03	-	-
putative protein	At5g53160	1,02	1,04	-	-

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel, der mir die Möglichkeit gab, meine Forschung in seiner Abteilung fortzuführen und meine Promotionsarbeit am IPB anzufertigen. Außerdem danke ich ihm für die Übernahme des ersten Gutachtens und die Unterstützung während meiner Zeit am IPB. Sie haben immer an mich geglaubt!

Prof. Dr. Holger Deising danke ich für die freundliche Übernahme des zweiten Gutachtens.

Frau Prof. Dr. Ulla Bonas möchte ich für Ihre Rolle als Vorstand der Prüfungskommission danken und in diesem Zusammenhang gilt mein Dank auch den anderen Mitgliedern der Prüfungskommission.

Bedanken möchte ich mich außerdem herzlich bei Frau Dr. Sabine Rosahl und Frau Dr. Lore Westphal für die umfassende tolle Betreuung, die entgegengebrachte Zeit, Anregung und Motivation, sowie für die vielen Ratschläge und die mitunter nötige Geduld.

Die Arbeit in der Gruppe „Induzierte Pathogenabwehr“ und der Abteilung „Stress- und Entwicklungsbiologie“ fand, dank der hilfsbereiten Kollegen und Freunde, die nie müde wurden meine Fragen zu beantworten und sich an konstruktiven Diskussionen zu beteiligen, in einer sehr inspirierenden Umgebung statt. Auch abteilungsübergreifend fand am IPB ein reger Ideen-Austausch statt, mein besonderer Dank gilt hierbei vor allem Kati Mielke und Robert Klein, die genau wie ich etwas bewegen wollten.

Ohne die Kooperation mit Forschern außerhalb des IPBs wären viele wichtige Erkenntnisse nicht möglich gewesen: Prof. Dr. Felix Mauch stellte das GFP-exprimierende *P. infestans* – Isolat zur Verfügung, Dr. Gerd Hause ermöglichte tiefe Einblicke in infizierte Zellen mit Hilfe des Elektronenmikroskops, Prof. Dr. Volker Lipka und Dr. Rene Fuchs analysierten die Interaktion mit biotrophen Mehltaupilzen, Prof. Dr. Peter Dörmann und Dipl. Biochemikerin Vera Wewer lieferten das *know-how* und die Technik zur Analyse der Blatt-Sterole. Prof. Dr. Peter Dörmann übernahm außerdem freundlicherweise das dritte Gutachten meiner Promotionsschrift.

Nicht zu letzt, sondern eigentlich allen voran, danke ich meiner Familie von ganzem Herzen für die liebevolle Unterstützung während meiner „Ausbildung“ zur promovierten Biologin. Ich hoffe es hat sich gelohnt! ☺

DANKESCHÖN!!!

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Arbeiten entnommene Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), April 2012



Michaela Kopischke

LEBENS LAUFPersönliche Informationen

Name Michaela Kopischke
 Geburtsdatum 14. August 1983 in Erfurt
 Geschlecht weiblich
 Nationalität deutsch
 Anschrift Adolf-Ellissen-Weg 16, 37077 Göttingen (ab 15. Mai 2012)

Schulbildung

1993 – 2001 Lessingschule Kamenz (Städtisches Gymnasium)
 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
 Gesamtnote : gut (1,8)

Hochschulstudium

2001 – 2007 Studiengang Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
 Abschluss: Diplom-Biologin
 Hauptfächer: Genetik und Pflanzenphysiologie
 Nebenfächer: Phytopathologie und Biochemie

2006 – 2007 Anfertigung der Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr, unter der Betreuung von Dr. L. Westphal und Prof. Dr. D. Scheel
 Thema der Diplomarbeit: Charakterisierung der *Arabidopsis thaliana*-Mutante enhanced response to *Phytophthora infestans* 1

2007 – 2012 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie, Arbeitsgruppe Induzierte Pathogenabwehr, unter Betreuung von Dr. S. Rosahl und Prof. Dr. D. Scheel.
 Titel der Dissertation: Isolierung und Charakterisierung des *ERP1*-Gens aus *Arabidopsis thaliana* im Rahmen von Untersuchungen zur Nichtwirtsresistenz gegenüber *Phytophthora infestans*

Publikationen

Kopischke M, Westphal L, Schneeberger K, Clark R, Ossowski S, Wewer V, Fuchs R, Landtag J, Hause G, Dörmann P, Lipka V, Weigel D, Schulze-Lefert P, Scheel D, Rosahl S. (2013) Impaired sterol ester synthesis alters the response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora infestans*. *Plant J*, **73** (3), 456-468

Halle (Saale), April 2012



Michaela Kopischke