

Chemische Abwehr an der Zellperipherie von *Arabidopsis thaliana*

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Andreas Matern

geb. am 25.04.1984 in Apolda

Gutachter:

1. Prof. Dierk Scheel, Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie- MLU Halle Wittenberg
2. Prof. Ingo Heilmann, MLU Halle Wittenberg
3. Prof. Markus Geisler, Université de Fribourg

Verteidigungsdatum 09.05.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Nichtwirts Resistenz	4
1.1.1 <i>Phytophthora infestans</i> und <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2 Sekundärmetabolismus in der Abwehr	9
1.3 Zielstellung.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien	13
2.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2.1 verwendete Linien.....	13
2.2.2 Oberflächensterilisierung	13
2.2.3 Anilinblau-Färbung	14
2.2.4 Messung der Ca ²⁺ Konzentrationen in <i>pMAQ2</i> Keimlingen	14
2.3 <i>Phytophthora infestans</i>	14
2.3.1 Mycelwachstumsassy	15
2.3.2 Inokulation von <i>A. thaliana</i>	15
2.3.3 Trypanblau-Färbung inokulierter Blätter	15
2.4 Nukleinsäuren.....	15
2.4.1 DNA Methoden.....	15
2.4.2 RNA Methoden	15
2.4.3 cDNA-Synthese und qRT -PCR	16
2.5 Massenspektrometrie	17
2.5.1 Probenvorbereitung	17
2.5.1.1 Aufarbeitung Tropfen	17
2.5.1.2 Aufarbeitung Blattmaterial.....	17
2.5.1.3 Messmethode.....	18
2.5.1.4 Auswertung	19
2.6 Synthese von 4-Methoxy-Indol-3-methanol und –methylcystein.....	19
2.6.1 4-Methoxy-Indol-3-methanol.....	19
2.6.2 4-Methoxy-Indol-3-methylcystein.....	19
3. Ergebnisse.....	21

3.1	Die Interaktion zwischen <i>A. thaliana</i> und <i>P. infestans</i>	21
3.1.1	<i>P. infestans</i> induzierte Genaktivierung in <i>A. thaliana</i>	22
3.1.2	Identifizierung von Sekundärmetaboliten in <i>A. thaliana</i> nach <i>P. infestans</i> Behandlung in extrazellulären Inokulationstropfen sowie Blattmaterial	24
3.1.3	Sekundärmetaboliten in Tropfen	24
3.1.4	Identifizierung und Quantifizierung PEN2 und PEN3-abhängiger extrazellulärer Sekundärmetaboliten.....	26
3.1.5	Quantifizierung abwehrrelevanter Metaboliten mittels Massenspektrometrie in Inokulationstropfen und inokuliertem Blattmaterial.....	28
3.2	Zeitlicher Verlauf der Akkumulation von Sekundärmetaboliten auf der Blattoberfläche 33	
3.2.1	Zeitlicher Verlauf der Sekretion von Metaboliten in Reaktion auf <i>P. infestans</i>	33
3.2.2	Zeitlicher Verlauf der Akkumulation von Metaboliten im Blatt in Reaktion auf <i>P. infestans</i>	34
3.3	Funktion der Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys.....	35
3.3.1	Inhibierung des <i>P. infestans</i> Wachstums.....	36
3.3.2	Induzierung von Abwehrreaktionen durch 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys.....	37
3.3.3	Komplementierung des flg22 induzierten Callose Phänotyps in <i>pen3-1</i> Mutanten 38	
4.	Diskussion.....	41
4.1	Die Synthese von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in <i>A. thaliana</i>	41
4.2	PEN3-abhängiger Transport von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys.....	44
4.3	Funktionsanalyse von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys.....	46
4.4	Zusammenfassung.....	50
5.	Literaturverzeichnis.....	51
6.	Anhang.....	58
6.1	Quantifizierung von Sekundärmetaboliten in Inokulationstropfen und methanolischen Blattextrakten.....	58
6.2	Zeitverlaufs-Kinetiken von Sekundärmetaboliten in Inokulationstropfen und methanolischen Blattextrakten.....	62
6.3	Konzentrationsabhängigkeit der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte durch 4-MeI3M.....	65
6.4	R-Skript	66
	Danksagung	67
	Eidesstaatliche Erklärung	68
	Lebenslauf	69
	Publikationen:.....	70

Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABC	ATP-binding cassette
Avr	Avirulenz
<i>B. cinerea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis f.sp. hordei</i>
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	copy DNA
Col	Columbia
DAMP	damage associated molecular pattern
DNA	desoxyribonucleic acid
dpi	days post infection
<i>E. pisi</i>	<i>Erysiphe pisi</i>
EDS	enhanced disease susceptibility
EMS	Ethylmethansulfonat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERP	enhanced response to Phytophthora
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i>
ETI	effector triggered immunity
ETS	effector triggered susceptibility
f. sp.	forma specialis
FLS	flagellin-sensitive
g	Gramm
<i>G. cichoracearum</i>	<i>Golovinomyces cichoracearum</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
gl	glabrous
GSL	glucan synthase-like
h	Stunde
hpi	hours post infection
HR	hypersensitive response
IPB	Institut für Pflanzenbiochemie
LRR	leucine rich repeat

MAMP	<i>microbial associated molecular pattern</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
min.	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>P. syringae</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
PAD	<i>phytoalexin deficient</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDR	<i>pleiotropic drug resistance</i>
PEN	<i>penetration</i>
PMR	<i>powdery mildew resistant</i>
PR	<i>pathogenesis related</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
PSAT	Phospholipid: Sterol-Acyltransferase
PTI	<i>PAMP triggered immunity</i>
pv.	<i>pathovar</i>
R	Resistenz
RLK	<i>receptor like kinase</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SA	<i>salicylic acid</i>
SAG	<i>senescence-associated gene</i>
SNARE	<i>N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor</i>
u.a.	unter anderem
ÜN	Übernacht
v.a.	vor allem
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des PAMP/MAMP induzierten zellulären Signaltransduktionsweg in Pflanzenzellen nach flg22 Behandlung.	2
Abbildung 2: Das zigzag Modell nach Jones & Dangl (2006).	3
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von <i>P. infestans</i> auf Blättern einer Wirtspflanze.	6
Abbildung 4: Übersicht von Tryptophan abgeleiteten Sekundärmetaboliten.	10
Abbildung 5: Zelltodphänotyp von <i>A. thaliana</i> Mutanten nach Inokulation mit <i>P. infestans</i>	22
Abbildung 6: <i>P. infestans</i> induzierte Geneaktivierung in <i>gl1</i> und <i>pen2</i>	23
Abbildung 7: Identifizierung von 4-MeO13Cys und 4-MeO13M.	27
Abbildung 8: Quantifizierung von 4-Methoxyindol-3-methanol und 4-Methoxyindol-3-methylcystein in Inokulationstropfen.	28
Abbildung 9: Quantifizierung abwehrrelevanter indolischer Metaboliten in Inokulationstropfen.	29
Abbildung 10: Quantifizierung weiterer abwehrrelevanter Metaboliten in Inokulationstropfen.	31
Abbildung 11: Quantifizierung abwehrrelevanter Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.	32
Abbildung 12: Quantifizierung von Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen über die Zeit.	34
Abbildung 13.: Quantifizierung potentieller Vorstufen-Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.	35
Abbildung 14: Inhibierung des Mycelwachstums von <i>P. infestans</i> in vitro.	36
Abbildung 15: Analyse der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte.	37
Abbildung 16: Prozentuale Callosebildung auf <i>A. thaliana</i> Blättern nach flg22 Elicitierung.	39
Abbildung 17: Vorgeschlagene Synthese von 4-MeO13M und 4-MeO13Cys.	42
Abbildung 18: Modellvorstellung der Synthese und des Exports von 4-MeO13M und 4-MeO13Cys als Reaktion auf <i>P. infestans</i> Behandlung.	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und Taq-man Sonden.	16
Tabelle 2: Analyse Daten von Verbindungen die mittels UPLC/ESI-QToF MS in <i>P. infestans</i> Sporensuspension, nach 24 h Inkubation auf <i>A. thaliana</i> Col-0 Wildtyp Blättern, detektiert wurden.	25
Tabelle 3 Analyse Daten von Verbindungen die mittels UPLC/ESI-QToF MS in <i>P. infestans</i> Sporensuspension, nach 24 h Inkubation auf <i>A. thaliana</i> Mutante <i>pen2</i> Blättern, zusätzlich zu Tab. 2 detektiert wurden.	26

1. Einleitung

Pflanzenpathogene wie Bakterien, Pilze und Oomyceten können Pflanzenkrankheiten verursachen, die zu hohen Ernteverlusten bei Nutzpflanzen führen. Dabei verwenden Pathogene verschiedene Strategien um Pflanzen zu befallen, die Abwehr zu überwinden und ihren Lebenszyklus zu vervollständigen.

Pflanzliche Abwehr besteht zum einen aus physikalischen Barrieren, wie der stark hydrophoben Kutikula und der Zellwand, und zum anderen aus induzierbaren Abwehrmechanismen. Induzierte Abwehr beruht auf der Erkennung von Pathogen/Mikroben assoziierten molekularen Mustern, sogenannter PAMPs beziehungsweise MAMPs (*pathogen/ microbe associated molecular patterns*). Diese Muster können hochkonservierte Domänen von Proteinen sein, die von der Pflanze als fremd über Muster erkennende Rezeptoren, PRRs (*pattern recognition receptors*), erkannt werden. Bekannte PAMPs sind zum Beispiel Bestandteile des bakteriellen Flagellins, des Elongationsfaktors EF-Tu oder von Lipopolysacchariden (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2004; Silipo *et al.*, 2005). Durch Erkennung von PAMPs werden MAP-Kinase-Kaskaden aktiviert, die sich aus einer MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) einer MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) und abschließend aus einer MAP Kinase (MAPK) zusammensetzen und mittels Phosphorylierung des jeweilig stromabwärts gerichteten Substrats das Signal weiter leiten (Abb. 1). Substrate der MAPKs, wie WRKY Transkriptionsfaktoren, werden aktiviert was in Abwehrgen-Expression resultieren kann (Lee *et al.*, 2015). Am Beispiel von Chitin aus pilzlichen Zellwänden konnte hierfür erstmals ein direkter Linker zwischen PRR und MAPKKK entdeckt werden (Yamada *et al.*, 2016). Chitin wird als PAMP mittels extrazellulären Lysin-Motiven (LysM) von PRRs wie CERK1 (*chitin elicitor receptor kinase 1*) im Komplex mit LYK5 (*LysM- receptor like kinase 5*) erkannt (Liu *et al.*, 2012). Hierbei handelt es sich um PRRs mit Kinase Domäne. Sie werden als Rezeptor ähnliche Kinasen (RLK-*receptor like kinases*) klassifiziert. Die CERK1 assoziierte zytoplasmatische Kinase PBL27 interagiert mit der Mitogen aktivierten Kinase Kinase Kinase MAPKKK5 und startet so eine Phosphorylierungskaskade von MAPKs (Yamada *et al.*, 2016). Neben MAPK Aktivierung werden durch PAMP-Perzeption auch Ionenflüsse an der Zellmembran aktiviert, die Einfluss auf Calcium-Ionen (Ca^{2+}) vermittelte Signalwege haben können. Dies kann zur Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) führen sowie Einfluss auf Calcium abhängige Protein-Kinasen (CDPKs, *calcium dependent protein kinases*) und deren Interaktionspartner haben (Lee *et al.*, 2015) (Abb. 1). Die

Aktivierung von CDPKs kann ebenfalls zur Abwehrgen-Expression oder aber auch direkt zur Stimulierung der ROS-Bildung führen (Romeis, 2001; Lee *et al.*, 2015).

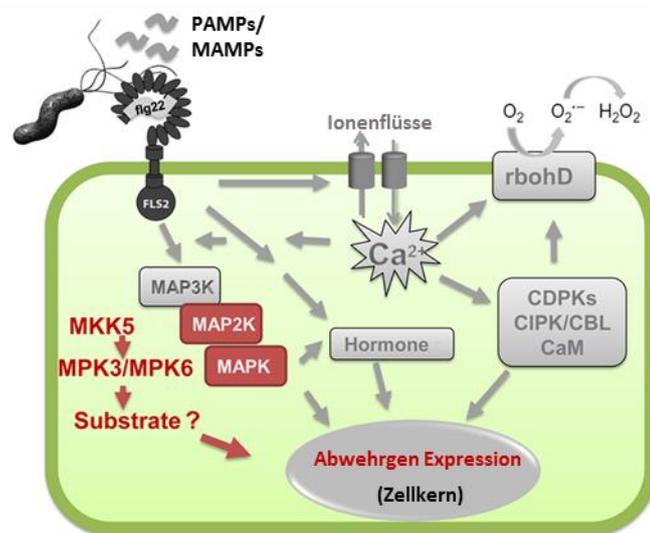


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PAMP/MAMP induzierten zellulären Signaltransduktionsweges in Pflanzenzellen nach flg22 Behandlung.

Abgewandelt nach Lee *et al.* (2015) Beschreibung siehe Text

Wird das Pathogen durch die Aktivität der Genprodukte von Abwehrgenen gestoppt, spricht man von PAMP vermittelter Immunität (PTI *PAMP triggered immunity*) (Jones & Dangl, 2006) (Abb. 2). Erfolgreiche Pathogene überwinden diese Art der Abwehr mit Hilfe von Effektoren, die z.B. Teile der Signalkaskade unterbrechen und so die Antwort unterdrücken. Als Beispiel hierfür kann HopAI1 genannt werden, ein Effektor des bakteriellen Pflanzenpathogens *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Es wurde gezeigt, dass dieser Effektor mit den MAP Kinasen MPK3 und MPK6 interagiert und so die stromabwärts gerichtete Signalkaskade inhibiert (Zhang *et al.* 2007). Ist das Pathogen in der Lage die Pflanzenabwehr zu überwinden, spricht man von Effektor vermittelter Suszeptibilität (ETS, *effector triggered susceptibility*) (Jones & Dangl, 2006). Im Laufe der Evolution war es Pflanzen möglich Abwehrstrategien gegen Pathogen-Effektoren zu entwickeln. Im Allgemeinen führt die Erkennung von Effektoren und/ oder deren Wirkungsweisen zu einer verstärkten Antwort, der sogenannten Effektor vermittelten Immunität (ETI, *effector triggered immunity*), die sich durch eine hypersensitive Reaktion (HR) auszeichnet. Dabei gibt es verschiedene Möglichkeiten die Effektoren selbst, bzw. deren Wirkungsweise zu erkennen. Nach der Gen-für-Gen-Hypothese wird der Effektor direkt von einem zytoplasmatischen Rezeptor, z.B. einem NB-LRR-Rezeptor gebunden, was Signalkaskaden aktiviert, die zu einer verstärkten Abwehrreaktion führen (Dangl & Jones, 2001). Hierbei werden Avirulenzgene/-proteine (Avr-Gene/-Proteine) und

Resistenzgene/ proteine (R-Gene/-Proteine) unterschieden. Der Effektor, der in der Interaktion erkannt wird, ist dabei ein Avr-Protein, da es durch Aktivierung der Abwehrantwort die Virulenz des Pathogens inhibiert. Der jeweilige Rezeptor wird in der Interaktion als R-Protein bezeichnet, da er mit der Erkennung des Effektors zur Resistenz der Pflanze beiträgt.

Eine weitere Möglichkeit ist die Erkennung nach der Modellvorstellung der *guard* (Wächter) Hypothese. So wird im Fall von RIN4, (RPM1 (*resistance to Pseudomonas syringae pv maculicola 1*) *interacting protein 4*), einem zentralen Regulator der pflanzlichen Abwehr in *A. thaliana*, die Effektor bedingte Phosphorylierung, durch AvrRPM1 und AvrB aus *Pseudomonas syringae* durch RPM1 perzipiert was eine HR nach sich zieht und so das Wachstum des Pathogens unterdrückt (Mackey *et al.*, 2002). Virulente Stämme von *P. syringae* tragen den Effektor AvrRpt2, der RIN4 abbaut und so die Bindung durch RPM1 verhindert (Kim *et al.*, 2005). Dies würde wieder zur ETS führen was aber durch das R-Protein RPS2 (*resistance to P. syringae 2*) durch Perzeption des Abbaus von RIN4 verhindert wird.

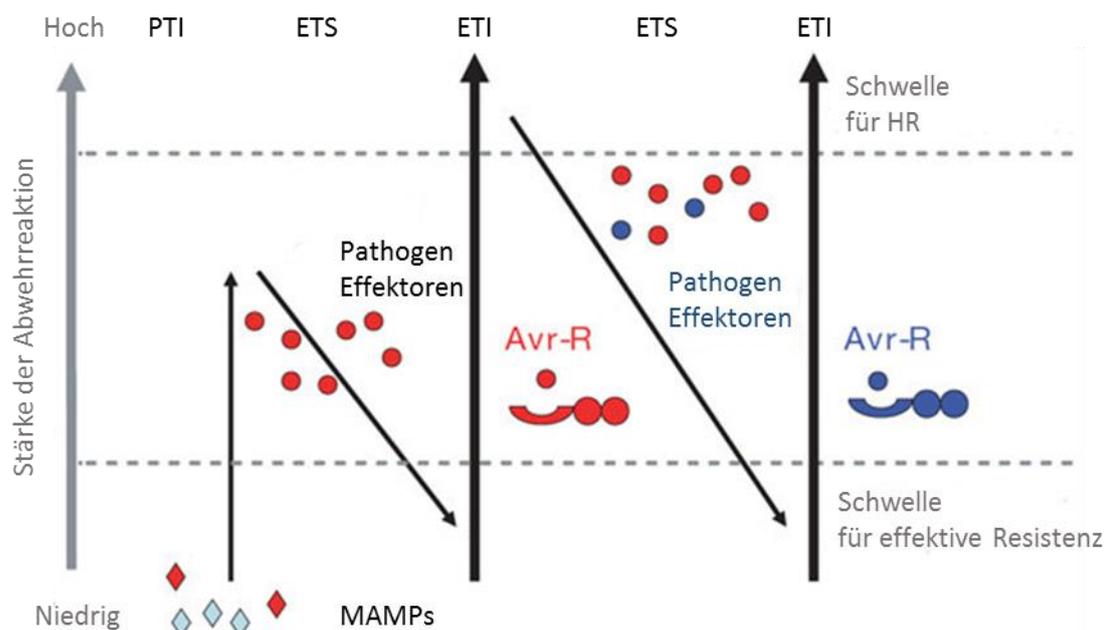


Abbildung 2: Das zigzag Modell nach Jones & Dangl (2006).

PTI- Pathogen vermittelte Immunität (*pathogen triggered immunity*). ETS- Effektor vermittelte Suszeptibilität (*effector triggered susceptibility*), ETI- Effektor-vermittelte Immunität (*effector triggered immunity*). HR- Hyper-sensitive Reaktion (*hyper sensitive response*). Beschreibung siehe Text.

Obwohl es viele bekannte, sehr potente Pflanzenpathogene gibt, sind der Befall und die Kolonisierung von Pflanzen durch Krankheitserreger die Ausnahme. Vor allem durch

Monokultivierung von anfälligen Zuchtformen und sehr enges Bepflanzen von Feldern in Agrarnutzungszonen wird das Problem von Pflanzenkrankheiten deutlich.

1.1 Nichtwirts Resistenz

Viele bekannte Pflanzenpathogene haben ein begrenztes Wirtsspektrum und können nur die kultivierten Formen der Wirtsspezies befallen. Das liegt mitunter daran, dass kultivierte Pflanzen meist Zuchtformen sind, bei denen zugunsten von Merkmalen wie größeren Früchten oder mehr Ertrag andere, für die Abwehr wichtige, Merkmale ausgekreuzt wurden. Ist eine ganze Pflanzenspezies gegen alle Vertreter einer Pathogen-Spezies resistent, spricht man von Nichtwirtsresistenz, NHR (*non host resistance*). Die Mechanismen der NHR überlappen mit der weiter oben beschriebenen PTI und umfassen dabei präformierte und induzierte Mechanismen (Nürnberger & Lipka, 2005). Dazu gehören mechanischer Schutz gegen Penetration von filamentösen Pilzen und Oomyceten wie Cutin, Lignin und Callose-Ablagerungen oder konstitutive Produktion von antimikrobiellen Substanzen, die nach Erkennung des Pathogens freigesetzt werden. Weiterhin erfolgt auch in der NHR die Erkennung von PAMPs über PRRs, was zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden führen kann und so die Expression von Abwehrgenen induziert. Ebenso ist auch die ETI Bestandteil der NHR. Hypothetische Betrachtungen vertreten die Ansicht dass umso weiter phylogenetisch entfernt die Wirtspflanze von der Nichtwirtspflanze ist, desto weniger haben Effektoren an der NHR Interaktion Anteil (Schulze-Lefert & Panstruga, 2011). Dies hätte zur Folge, dass je näher ein pflanzlicher Interaktionspartner phylogenetisch mit der Wirtspflanze des Pathogens verwandt ist, desto weniger Komponenten der NHR dürfen fehlen, um eine erfolgreiche Wirtsinteraktion zu zulassen.

Der Anstieg der intrazellulären Calciumionenkonzentration ist eine der ersten messbaren Reaktionen nach Erkennung von PAMPs. Das Membranpotenzial kann bei einer Veränderung der Ca^{2+} Konzentration depolarisiert werden, was sich wiederum auf die Weiterleitung von Signalen auswirkt (Jeworutzki *et al.*, 2010). Eine Folgereaktion ist zum Beispiel die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die direkt als antimikrobielle Substanzen wirksam werden können. Weiterhin lösen ROS eine Vielzahl von Reaktionen in Pflanze-Pathogen-Interaktionen aus (Lehmann *et al.*, 2015). Dazu gehören ROS induzierte Verknüpfung von Zellwandkomponenten oder posttranslationale Modifikationen von Abwehr Proteinen und Transkriptionsfaktoren (Fu & Dong, 2013).

1.1.1 *Phytophthora infestans* und *Arabidopsis thaliana*

Phytophthora infestans verursacht die Kraut- und Knollenfäule auf Kartoffeln und ist weiterhin ein großes Problem für Agrarunternehmen weltweit. Auch wenn mittlerweile diverse Fungizide bekannt sind, um eine Ausbreitung des Pathogens auf Kulturlächen zu stoppen, bedeutet der Einsatz dieser Wirkstoffe eine Belastung für die Umwelt sowie Kosten, die allein in den Niederlanden zwischen 2006 und 2015 um die 100 Millionen Euro pro Jahr betragen (Haverkort *et al.*, 2016). Daher ist die Grundlagenforschung weiterhin ein wichtiger Ansatzpunkt um einerseits die Pflanze-Pathogen-Interaktion besser zu verstehen, und andererseits den Züchtern neue Anhaltspunkte geben zu können, welche Merkmale für die effektive Abwehr von *P. infestans* benötigt werden.

Oomyceten wie *Phytophthora infestans* gehören zu den Stramenopilen und sind näher mit Braunalgen als mit echten Pilzen verwandt (Baldauf *et al.*, 2000). *P. infestans* ist der Erreger der Kraut und Knollenfäule auf Kartoffel sowie der Braunfäule auf Tomate. Die Lebensweise des Pathogens wird als hemibiotroph klassifiziert und zeichnet sich durch eine biotrophe Phase zu Beginn der Infektion aus. Das bedeutet, dass die befallenen Pflanzenteile weiterhin am Leben sind. Nach Verbreitung der Zoosporen Enzystieren die Sporen auf der Blattoberfläche von Wirtspflanzen und bilden ein Appressorium zum Penetrieren der epidermalen Zellschicht aus (Abb. 3) (Judelson & Blanco, 2005). Nach erfolgreicher Penetration wächst *P. infestans* interzellulär und bildet Haustorien, welche die Zellen penetrieren. Die Sekretion von Effektoren an der Kontaktstelle von Haustorium und Mesophyllzelle führt wahrscheinlich zur Umprogrammierung der Pflanzenzellen die dann Nährstoffe an das Pathogen abgeben. Ähnlich der Effektor-vermittelten Aktivierung der SWEET Zucker Transporter in *A. thaliana* (Chen *et al.*, 2010). Nachfolgend geht das Pathogen in die nekrotrophe Lebensphase über, bei der das Blattmaterial zerstört wird. Hier ist es denkbar, dass sich der Oomycet von den freigesetzten organischen Bestandteilen ernährt. Zu diesem Zeitpunkt kann man makroskopisch sichtbare nekrotische Läsionen auf der Blattoberfläche erkennen. Zur Vervollständigung des Lebenszyklus von *P. infestans* wachsen an den Rändern der sich ausbreitenden Läsion Hyphen durch das Zellgewebe und durch die Spaltöffnungen wieder nach außen und bilden Sporangien, in denen neue Zoosporen reifen. Diese werden bei günstigen Bedingungen freigesetzt und können weitere Pflanzen infizieren.

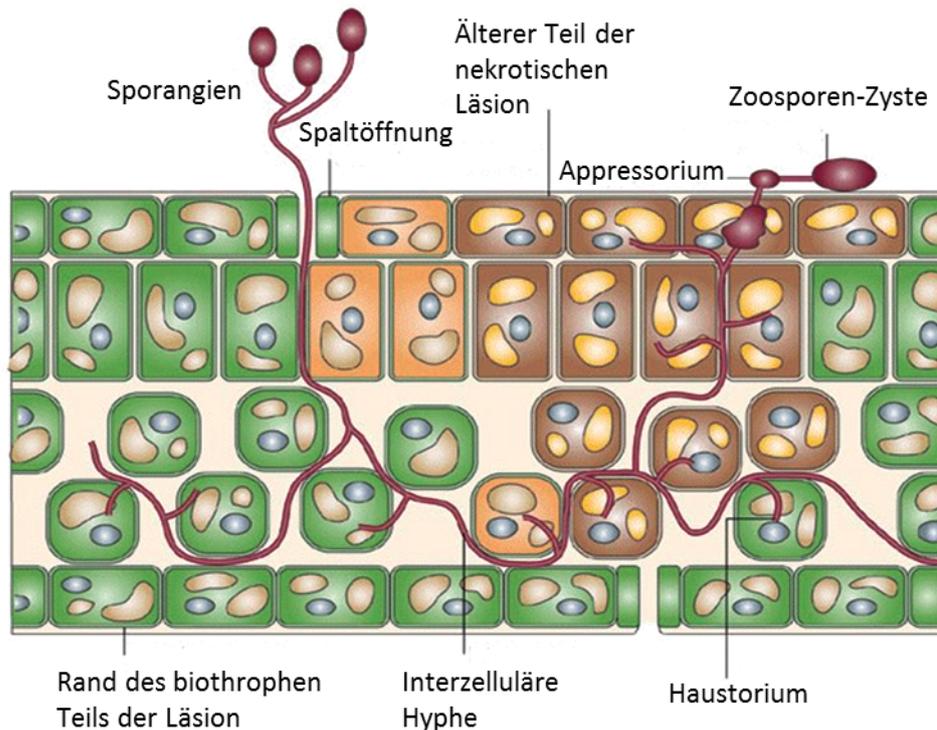


Abbildung 3. Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *P. infestans* auf Blättern einer Wirtspflanze.

Nach Judelson und Blanco (2005) Beschreibung siehe Text.

Arabidopsis thaliana (Acker-Schmalwand) gehört zu den Brassicaceae (Kreuzblütlern) und ist ein gut untersuchter Modellorganismus, dessen Genom vollständig sequenziert ist. Interessanterweise ist *P. infestans* nicht in der Lage erfolgreich *A. thaliana* zu kolonisieren und seinen Lebenszyklus zu vervollständigen.

Das *A. thaliana*/*P. infestans* Nichtwirtssystem wurde 2001 vorgestellt (Kamoun, 2001). Die Mechanismen die der NHR von *A. thaliana* gegen *P. infestans* zugrunde liegen, sind jedoch bis heute nicht vollständig verstanden. Makroskopisch sichtbare Reaktionen auf Blättern von Wildtyp *A. thaliana* Pflanzen nach Inokulation mit *P. infestans*, sind eher selten. Nur sehr hohe Sporenkonzentrationen führen zu einer Häufung der Einzelzelltod-Reaktion im Inokulationsbereich. In Inokuliertem Blattgewebe wurde zudem die Aktivierung der Expression von Abwehrgenen festgestellt (Huitema *et al.*, 2003). Genetische Untersuchungen an EMS-(Ethyl-methyl-sulfonat) mutagenisierten *A. thaliana* Linien ergaben Mutanten, die verstärkt Penetration durch das nichtadaptierte Pathogen *Blumeria graminis f. spec. hordeii* (*Bgh*) zulassen (PEN Mutanten von *penetration*) (Lipka *et al.*, 2005). Neben PEN1 wurden auch PEN2 und PEN3 als Komponenten der präinvasiven Resistenz von *A. thaliana* gegen *Bgh* entdeckt. PEN1 (*AtSYR1/ AtSYP121*) als Pflanzensyntaxin hat dabei Anteil am Vesikeltransport und damit potentiell an der Sekretion von Abwehrkomponenten (Lipka *et al.*, 2007). Das PEN1 Homologe aus

Kartoffel, StSYR1 (*Solanum tuberosum syntaxin related 1*) ist in die Callose haltige Papillenbildung als Abwehrantwort von Kartoffel gegen *P. infestans* involviert (Eschen-Lippold *et al.*, 2012). Interessanterweise hat die Mutation im *PEN1* Gen keinen Einfluss auf die Interaktion zwischen *P. infestans* und *A. thaliana*.

Bei *PEN2* handelt es sich um eine atypische Myrosinase/ Glucosidase, die Indolglucosinolate spaltet (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Die *pen2 A. thaliana* Mutantenlinie zeigt einen verstärkten Zelltodphänotyp gegen *P. infestans* der durch eine Häufung von erfolgreichen Penetrationseignissen ausgelöst wird (Stein *et al.*, 2006; Lipka *et al.*, 2008; Westphal *et al.*, 2008; Kopischke *et al.*, 2013; Geissler *et al.*, 2015). Dies könnte bedeuten, dass die Spaltprodukte von Indolglucosinolaten an der präinvasiven Resistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* beteiligt sind.

Der ABC-Transporter *PEN3* (ABCG36/ PDR8) gehört zur PDR (*pleiotropic drug resistance*) Protein-Familie, die für Pflanzen und Pilze spezifisch ist. PDRs sind in Detoxifizierungsvorgängen in Pilzen involviert und tragen in Pflanzen zum Export antimikrobieller Substanzen bei (Crouzet *et al.*, 2006). Wie *pen2*, zeigt auch die Mutante *pen3* einen verstärkten Zelltodphänotyp gegen *P. infestans* (weiterhin als PEN-Phänotyp bezeichnet). In *pen2pen3* Doppelmutanten wurde jedoch kein additiver Effekt im Gegensatz zu den Einzelmutanten beobachtet (Kobae *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2006). Dies könnte ein Hinweis auf Kooperation der atypischen Myrosinase *PEN2* mit dem ABC Transporter *PEN3* bei der präinvasiven Abwehr von *A. thaliana* gegen penetrierende Pathogene wie *P. infestans* sein. So wäre es denkbar, dass *PEN3* ein oder mehrere Spaltprodukte oder deren Derivate aus der *PEN2* abhängigen Enzymreaktion transportiert und so zur präinvasiven Resistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* beiträgt.

Mittels EMS Mutagenese der *pen2-1* Linie, wurden weitere Komponenten der Interaktion von *P. infestans* und *A. thaliana* in der Arbeitsgruppe Induzierte Pathogen Abwehr des Leibniz Institutes für Pflanzenbiochemie identifiziert. Dazu wurden mutagenisierte Nachkommen mit stärkerer Reaktion nach *P. infestans* Behandlung untersucht. Als Marker wurde der beschriebene PEN-Phänotyp genutzt. Von 14 unabhängigen Mutantenlinien mit stärkerer Zelltodreaktion auf *P. infestans* (*erp* Mutanten, *enhanced response to phytophthora*) wurden die betroffenen Gene mittels Kartierungsexperimenten sowie der kompletten Resequenzierung der Genome untersucht. Dabei wurde die Phospholipid-Sterol-Acyltransferase 1 (*PSAT1*), welche Sterolester bildet identifiziert. Der Verlust von *PSAT1* im *pen2* Hintergrund führt zu einem verstärkten Zelltod Phänotyp im Vergleich zu *pen2*. Außerdem wurden in, mit *P. infestans* inokulierten *A. thaliana* Blättern, massive Calloseablagerung an Mesophyllzellen beobachtet. Wahrscheinlich ist durch die Mutation in *PSAT1* die

Sterolhomöostase dereguliert was dann zu dem beobachteten Phänotyp beiträgt (Kopischke *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde eine bereits für andere Systeme beschriebene MAPKKK identifiziert, die in der *erp6* Mutante durch eine Punktmutation inaktiviert ist. Hier handelt es sich um *Enhanced Disease Resistance (EDR1)*, das in der kompatiblen Interaktion von *Golovinomyces cichoracearum* mit *A. thaliana* einen Suzeptibilitätsfaktor darstellt. Ein Verlust der MAPKKK Aktivität führt im NHR System von *P. infestans* und *A. thaliana* zu einer verstärkten Zelltodreaktion, die additiv zum beschriebenen PEN-Phänotyp ist (Geissler *et al.*, 2015).

Weder *erp1* noch *edr1* können als Komponenten der Postinvasiven Abwehr angesehen werden, da wie auch schon in den *pen* Mutanten keine erhöhte Biomasse von *P. infestans* detektiert werden kann. In anderen Nichtwirtssystemen konnten bereits Bestandteile der postinvasiven Abwehr ermittelt werden die bei Verlust zusammen mit nichtfunktionaler präinvasiver Abwehr zu einem kompletten Bruch der Resistenz führte. So wurde für die Dreifachmutante *pen2sag101pad4* bei der neben *PEN2* auch die Gene *SAG101 (SENESCENCE ASSOCIATED GENE 101)* und *PAD4 (PHYTOALEXINE DEFICIENT 4)* ausgeschaltet sind, der komplette Bruch der Nichtwirtsresistenz (NHR) gegen *Bgh* und *E. pisi* festgestellt (Lipka *et al.*, 2005; Lipka *et al.*, 2008). Das Genprodukt für *EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1)* wurde ebenfalls als Teil der Postinvasiven Resistenz ermittelt. In *pen3eds1* Doppelmutanten wurde auch ein Verlust der NHR gegen *E. pisi* nachgewiesen (Stein *et al.*, 2006) Interessanterweise reicht ein Verlust dieser Komponenten im Fall der NHR von *A. thaliana* gegen *P. infestans* nicht aus um die Resistenz zu brechen (L. Westphal, pers. Mitteilung).

Präinvasive Abwehr-Mechanismen an der Zellperipherie sorgen für die Aufrechterhaltung der NHR von *A. thaliana* gegen *P. infestans* und bilden eine der ersten Barrieren der präformierten und induzierten Abwehr.

1.2 Sekundärmetabolismus in der Abwehr

Niedermolekulare Naturstoffe, die auch als Sekundärmetaboliten bezeichnet werden, tragen zur Abwehr von Pflanzenpathogenen bei. Über 100 000 verschiedene Sekundärmetaboliten sind bekannt, die von Pflanzen produziert werden, so zum Beispiel Derivate aus dem Isoprenoid-, Phenylpropanoid-, Alkaloid- oder Fettsäure-/Polyketid-Stoffwechsel (Dixon, 2001). Bei der Pathogenabwehr unterscheidet man Phytoalexine und Phytoantizipine.

Phytoalexine werden nach Pathogenerkennung *de novo* synthetisiert. Zu den Phytoalexinen zählen zum Beispiel Hydroxyzimtsäurereamide wie *p*-Coumaroylagmatin, Indolverbindungen wie Camalexin oder Stilbene wie Resveratrol. Für *p*-Coumaroylagmatin wurde gezeigt, dass es auf der Oberfläche von *A. thaliana* Blättern 24 h nach Inokulation mit *P. infestans* akkumuliert und inhibierende Wirkung auf die Sporenkeimung des Pathogens *in vitro* hat (Dobritzsch *et al.*, 2016). An der Synthese von Camalexin ist die Cytochrom-P450-Oxidase Cyp71B15 (PAD3) beteiligt (Abb.4) (Böttcher *et al.*, 2009). Die Expression der Synthesegene und die Akkumulation des Metaboliten erfolgt Pathogen-induziert. Erhöhte Transkription von *PAD3* nach Behandlung mit nichtadaptierten Pathogenen wie avirulenten *P. syringae* Stämmen, *Alternaria alternata* sowie *P. infestans* deutet auf eine allgemeine Abwehrantwort gegen ein breites Pathogenspektrum hin (Zhou *et al.*, 1999; Schuegger *et al.*, 2007). Eine eindeutige antimikrobielle Aktivität wurde jedoch nur für wenige Interaktionen gezeigt. Resveratrol hingegen hat antimikrobielle Aktivität gegen den Oomycet *Plasmopara viticola* sowie den Pilz *B. cinerea* (Chalal *et al.*, 2014).

Phytoantizipine wie Tannine und Saponine werden konstitutiv in Pflanzenzellen in inaktiver Form gelagert, und können durch einen Stimulus, wie Pathogenbefall, aktiviert werden (VanEtten *et al.*, 1994). Ein Tannin aus *A. thaliana*, das Proanthocyanin, akkumuliert in der Samenschale und wird für die Keimruhe als auch zum Schutz gegen Pathogene benötigt (D'Auria & Gershenzon, 2005). Saponine werden von glycosylierten Steroiden, Steroidalkaloiden oder Triterpenen abgeleitet und destabilisieren Zellmembranen von Pathogenen (Bowyer *et al.*, 1995). Das Wurzel-Pathogen *Gaeumannomyces graminis var. tritici* ist sensitiv gegen das Wurzelsaponin Avenacin A-1 aus Hafer, was zur Resistenz von Hafer gegen dieses Pathogen führt. Die an Hafer adaptierte Art, *G. graminis var. avenae*, hingegen ist unempfindlich gegen Avenacin A-1 (Bowyer *et al.*, 1995).

Für die Interaktion zwischen *P. infestans* und *A. thaliana* spielen Indolglucosinolate und deren Spaltprodukte eine Rolle in der präinvasiven Resistenz. Mutanten die in der

Produktion oder dem Transport dieser Sekundärmetaboliten involviert sind, zeigen eine erhöhte Anzahl von Penetrationsereignissen im Gegensatz zum Wildtyp. Interessanterweise akkumulieren Indolische-Derivate nach *P. infestans* Behandlung stromabwärts von Tryptophan und den Schlüsselenzymen CYP79B2 und CYP79B3, auch Indolische Verbindungen im Blattmaterial, die unabhängig von Indolglucosinolaten synthetisiert werden können (Böttcher *et al.*, 2009; Böttcher *et al.*, 2014) (Abb. 4). CYP79B2 und CYP79B3 nehmen dabei redundante Funktion in der Synthese der Vorstufe Indol-3-acetaldoxim (IAOx) ein (Hull *et al.*, 2000). IAOx kann von CYP71A12 und CYP71A13 zu Indol-3-acetonitril (IAN) dehydratisiert werden (Glawischnig *et al.*, 2004; Nafisi *et al.*, 2007). Die postulierte Anlagerung von Glutathion und nachfolgende Abspaltung der γ -Glutamyl sowie Glycin Reste führt zu Cys-IAN was dann durch PAD3 über einen intramolekularen Thiazolin-Ringschluss und anschließender Decarboxylierung zu Camalexin umgewandelt wird (Böttcher *et al.*, 2009).

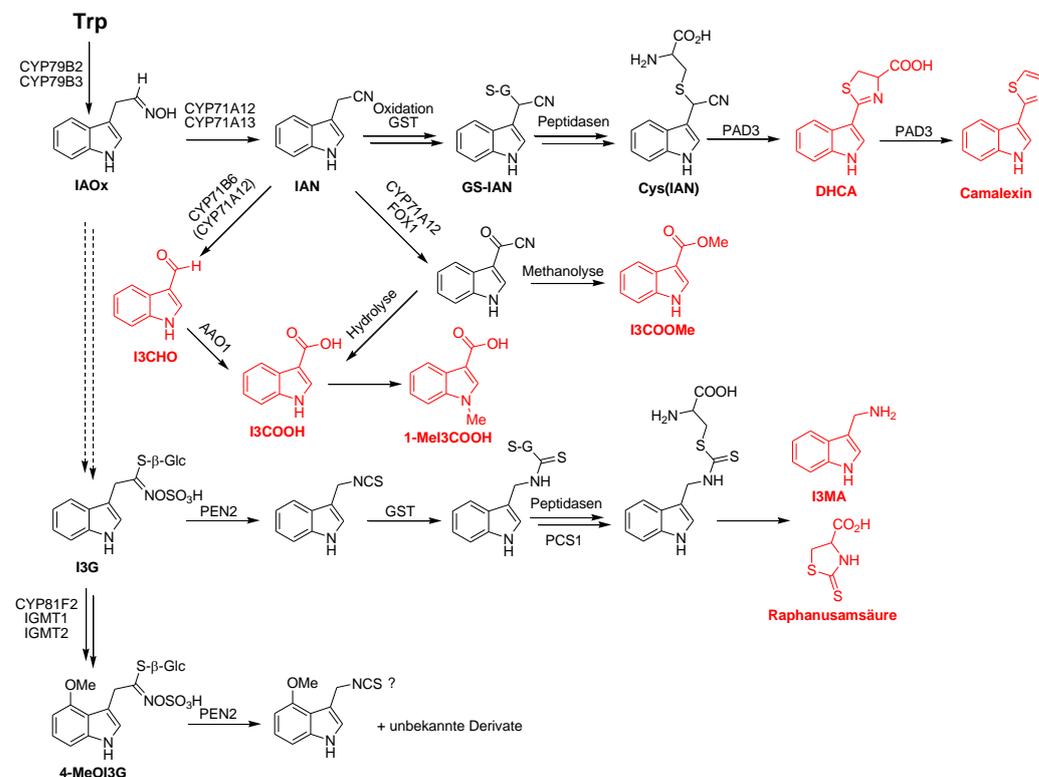


Abbildung 4: Übersicht von Tryptophan abgeleiteten Sekundärmetaboliten.

Indol-Verbindungen die ausgehend von Tryptophan nach Pathogenbefall in Blattmaterial akkumulieren. Potentielle Endprodukte sind rot markiert. DHCA: Dihydrocamalexinsäure, I3COOMe: indole-3-carbonsäuremethylester, I3CHO: Indole-3-carbaldehyd, I3COOH: Indole-3-carboxylsäure, 1-MeI3COOH: 1-Methylindole-3-carboxylsäure, I3MA: Indol-3-ylmethylamine. Übersicht erstellt anhand der Publikationen von: Hull *et al.* 2000, Glawischnig *et al.* 2004 Nafisi *et al.* 2007, Böttcher *et al.* 2009, Böttcher *et al.* 2014, Bednarek *et al.* 2009 und Pfalz *et al.* 2011.

Weiterhin können ausgehend von IAN auch die Indol-Verbindungen Indole-3-carbaldehyd (I3CHO) und Indol-3-carboxylsäure (I3COOH) sowie weitere Derivate wie

Indol-3-carbonsäuremethylester (I3COOMe), und 1-Methylindole-3-carboxylsäure (1-MeI3COOH) synthetisiert werden (Abb. 4).

Ausgehend von IAOx entstehen auch Indolglucosinolate. Cytochrom-P450 CYP83B1 aktiviert IAOx, das nachfolgend über eine unbekannte Glutathion-S-transferase wahrscheinlich an Glutathion gekoppelt wird. Durch Peptidabspaltung mittels γ -Glutamyl-Peptidase und der C-S Lyase SUR1, wird das Konjugat zum Zwischenprodukt Indol-Thiohydroximat umgewandelt (Mikkelsen *et al.*, 2004). Durch S-Glucosylierung mittels Enzymen der UDP-Glucose-Thiohydroximat S-Glucosyltransferase 74B (UGT74B) Familie und nachfolgender Sulfurierung durch Sulfotransferasen der SOT Familie, werden Indolglucosinolate synthetisiert (Grubb *et al.*, 2004; Piotrowski *et al.*, 2004; Klein *et al.*, 2006; Bednarek, 2012b). Pathogeninduzierter Abbau und Freisetzung von potentiell reaktiven Verbindungen aus Indolglucosinolaten ist abhängig von PEN2. Die möglichen resultierenden Produkte der PEN2-Reaktion sind Isothiocyanat-, Thiocyanat- und Acetonitrilderivate (Bednarek *et al.*, 2011; Bednarek, 2012b). Die weitere Verstoffwechselung ist jedoch bisher unklar. Ein bekanntes Endprodukt dieser Reaktion ist Indol-3-ylmethylamin (I3MA), das PEN2 abhängig in *Bgh* behandeltem Blattmaterial akkumuliert. Dabei wird das entstehende Isothiocyanat aus der PEN2 Reaktion auf Glutathion übertragen. Durch Abspaltung des γ -Glutamyl- sowie des Glycylrestes über Peptidasen könnte ein Dithiocarbamatderivat entstehen (Abb. 4) (Bednarek *et al.*, 2009). An dieser Reaktion ist wahrscheinlich auch Phytochelatinsynthase1 (PCS1) beteiligt, die in der Lage ist den Glycyl Rest aus Glutathion Konjugaten abzuspalten (Blum *et al.*, 2007). Durch intramolekularen Ringschluss und Abspaltung vom Indolkern entstehen I3MA sowie Raphanusamsäure (RA) (Bednarek *et al.*, 2009). Ein weiteres Substrat von PEN2 ist 4-Methoxyindol-3-glucosinolat (4-MeOI3G). Die Hydroxylierung und anschließende Methylierung von Indol-3-glucosinolat (I3G) ist abhängig von der Cytochrom P450 Oxidase CYP81F2 und der Indolglucosinolat-Methyltransferasen (IGMTs) (Pfalz *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016). Den bisher unbekanntenen Produkten aus der PEN2 abhängigen Spaltung von 4-MeOI3G, wird die größte Rolle in der Abwehr gegen filamentöse eukaryotische sowie bakterielle Pathogene zugeschrieben (Bednarek *et al.*, 2009; Clay *et al.*, 2009). Weiterhin ist unklar ob diese Sekundärmetaboliten antimikrobiell wirken, oder ob sie als Mediatoren und/oder Signalmoleküle Anteil an der Abwehr in Pflanze-Pathogen-Interaktion haben (Bednarek, 2012a). Bereits 2009 wurde in *P. infestans* Sporensuspension nach 24 Stunden Inkubation auf *A. thaliana* Blättern eine Vielzahl an Sekundärmetaboliten detektiert (Böttcher *et al.*, 2009). Hier wurden vor allem Indolische Verbindungen, die dem weiter oben beschriebenen Syntheseweg zugeordnet werden können identifiziert. Die Analyse

von Mutantenlinien die ein verändertes Metaboliten-Profil auf der Oberfläche und innerhalb des inokulierten Blattmaterials kann weitere Erkenntnisse über die Synthesewege aufzeigen.

1.3 Zielstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Nichtwirts-Interaktion zwischen *P. infestans* und *A. thaliana* zu untersuchen und zu charakterisieren. Dabei lag der Fokus auf der induzierten Akkumulation von Sekundärmetaboliten an der Zellperipherie, da es sich hierbei um ein Schlüsselement der NHR von *A. thaliana* gegen *P. infestans* handelt. Unter Zuhilfenahme bereits bekannter Mutantenlinien, wurde versucht tiefere Einblicke in das Zusammenspiel der Komponenten der präinvasiven Abwehr von *A. thaliana* zu erhalten. Die bekannten Mutantenlinien *pen2* und *pen3*, auf denen *P. infestans* öfter in der Lage ist erfolgreich die Epidermis zu penetrieren wurden zunächst dafür analysiert. PEN2 und PEN3 werden in Abbau- und Transportprozesse von Tryptophan abhängigen Indolglucosinolaten und deren Abbauprodukten eingeordnet. Die wirksamen Endprodukte dieser Prozesse sind jedoch bisher unklar. Die Identifizierung und Charakterisierung der PEN2-Abbauprodukte, die PEN3-abhängig an der Zellperipherie akkumulieren, waren Ziele dieser Arbeit. Die Analyse weiterer möglicher Komponenten der Synthese Tryptophan abhängiger Sekundärmetaboliten unter Verwendung der zugehörigen Mutantenlinien kann Aufschluss über Synthesewege und deren Transport an die Stelle der versuchten Penetration geben. Die funktionelle Analyse von potentiellen PEN2 Abbauprodukten sollte abschließend Aufschluss über die Wirkweise der Sekundärmetaboliten an der Zellperipherie geben.

2. Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben, diente bei allen nachfolgend beschriebenen Methoden, die Zugabe von Wasser erforderten, deionisiertes Wasser, welches an einer Anionenaustauschersäule (Milli-Q; Millipore) aufbereitet wurde.

Aufgeführte Medien und hitzestabile Lösungen wurden bei 121 °C und einem Druck von 1 bar 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.1 Verwendete Lösungsmittel und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit angegebenen Chemikalien wurden, soweit nicht gesondert vermerkt, in Analysequalität eingesetzt und von den Firmen Bio-Rad, Carl Roth, Fluka, 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 wurden von Invitrogen, Fermentas, ROCHE oder New England Biolabs bezogen. 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.

2.2 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana Pflanzen wurden auf einem Erde Vermiculit Gemisch in einer Phytokammer (Heraeus/ Vötsch GmbH, Hanau) unter Kurztag Bedingungen (8 h Licht 22°C, 16 h dunkel 20°C) kultiviert.

Für Experimente mit Keimlingen wurde das Saatgut in 24 *well* Platten (Sarstedt) mittels Chlorbegasung Oberflächensterilisiert und nachfolgend mit ½ MS Medium (siehe 2.1) versetzt. Nach Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln wurden die Platten in einen Lichtraum (16 h 8 h dunkel Licht 20°C) bis zu 14 d inkubiert bis der gewünschte Morphologische Zustand erreicht war.

2.2.1 verwendete Linien

Col-0, *gl1*, *pen2*, *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3*, *pMAQ2*,

2.2.2 Oberflächensterilisierung

Die Oberflächensterilisierung von Samen erfolgte mittels Chlorgas. Trockene Samen wurden in Zellkulturplatten (Sarstedt) überführt (zwischen 20 und 30 Samen pro *well*). Platten wurden mit BREATHseal (Greiner, BioOne) abgedeckt. Anschließend erfolgte

eine dreistündige Inkubation unter Chlorgas Am Boden des Exsikkators wurde in einem Becherglas ein Gemisch aus Natriumhypochlorid (12 % Cl) und Salzsäure im Verhältnis 3:1 (v/v) bereitgestellt. Das entstandene Chlorgas wurde dann für mindestens 3 Stunden abgepumpt und anschließend wurde der Exsikkator mit geöffnetem Deckel über Nacht in einem Abzug aufbewahrt um das Chlorgas wieder vollständig zu entfernen. Am folgenden Tag wurden die sterilen Samen in $\frac{1}{2}$ MS +0,5% Sucrose Flüssigmedium transferiert.

2.2.3 Anilinblau-Färbung

Zur Callose Färbung von flg22 behandelten Arabidopsis Keimlingen aus Flüssigkultur wurde die Anilinblau-Färbung nach Clay (2009) angewandt. Nachfolgend wurden die Blätter in 50% Glycerin überführt und auf Objektträger aufgezogen. An einem Nikon AZ 100 mit einer CCDKamera (DS-Fi1c) wurden die Blätter fotografiert. Die Anilinblaufluoreszenz wurde mit dem Standard-Filterblock UV-2A (Anregung 330-380 nm, Kaltlicht 400 nm, Emission 420 nm) detektiert.

2.2.4 Messung der Ca^{2+} Konzentrationen in *pMAQ2* Keimlingen

Calcium Ströme nach Elicitierung mit diversen PAMPs wurde in transgenen *pMAQ2 Arabidopsis* Mutanten gemessen. *pMAQ2* Pflanzen, exprimieren konstitutiv Apoaeqourin, welches bei Calciumbindung fluoresziert (Knight *et al.*, 1991; Ranf *et al.*, 2012). Dazu wurden 8 Tage alte Keimlinge aus Flüssigkultur in weiße 96 well Platten (Lumitrac 200, Greiner) überführt und wie bei Ranf *et al.* (2012) beschrieben, weiter verfahren. Mittels Varioscan Flash (Thermo Fischer Scientific) wurde der Fluoreszenzanstieg gemessen. Die transiente Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte wurde anhand der Messung berechnet (Ranf *et al.*, 2012).

2.3 *Phytophthora infestans*

Die Kultivierung des *P. infestans* Isolats CRA208m2 (Si-Ammour *et al.*, 2003) erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (3,4 % [w/v] Bohnenmehl, 1,7 % [w/v] Hafermehl, 0,85 % [w/v] Saccharose, 1,5 % [w/v] Agar) bei 18°C im Dunkeln. Für die Produktion der Zoosporensuspension wurden ca. 1 mm² Stücke einer gut bewachsenen Petrischale steril ausgeschnitten und in einen 100 mL Erlenmeyer Kolben mit HB Medium überführt (schräg Agar). Das frisch gewachsene Myzel wurde nach 10-12 Tagen mit 4 mL H₂O benetzt und etwa 3,5 h bei 4°C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde anschließend aus mehreren Kolben vereinigt und durch ein Nylonnetz filtriert. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Je nach Verwendung wurde die Sporenkonzentration mit H₂O auf $1 \cdot 10^5$ bzw. $5 \cdot 10^5$

Zoosporen/ mL eingestellt. Zur Gewinnung von Sporangien wurden an geimpfte Kolben nach 10-12 Tagen mit H₂O abgespült.

2.3.1 Mycelwachstumsassay

Zur Messung des Myzelwachstums wurden frische Sporangien 1*10⁵ Sporangien/ mL in flüssigem V8-Medium in 12-well Platten über Nacht bei 18°C im Dunkeln inkubiert. Mittels Berthold Twinkle LB 970 Plattenlesegeräts wurde die Zunahme der GFP Fluoreszenz über mehrere Tage gemessen. Die Testsubstanzen wurden nach einem Tag Inkubation appliziert. Zur Kontrolle wurden γ -Oxocrotonat Fettsäuren (Eschen-Lippold *et al.*, 2009) und Azoxystrobin (Pestanal, Sigma Aldrich) verwendet.

2.3.2 Inokulation von *A. thaliana*

Auf die Blattoberseite von 5 Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen wurden unter Verwendung einer Dispenser-Pipette „Pegstepper“ (VWR) mit Combitips PLUS 0,5 mL (Eppendorf) 10 μ L Tropfen einer *P. infestans* Sporen Suspension appliziert. Arabidopsis-Pflanzen wurden mit 10 μ L Tropfen der Zoosporensuspension inokuliert und je nach Verwendung unterschiedlich lang unter Langtagbedingungen in einer Phytokammer (16 h Licht, 140 μ Mol·m⁻²·s⁻¹) bei 20°C und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.3.3 Trypanblau-Färbung inokulierter Blätter

Inokulierte Blätter von *A. thaliana* wurden nach verschiedenen Inkubationszeiten abgeschnitten und in ein 50 mL Reaktionsgefäß (Greiner) überführt. Nach Zugabe der Lactophenol Färbelösung (0,1% Trypanblau in 1 Vol. Lactophenol (Gemisch aus Glycerin, Milchsäure, Phenol (liquifiziert Sigma Aldrich) und H₂O zu gleichen Teilen) plus 2 Vol. 96% Ethanol) wurden die Proben im Wasserbad ca. 1 min auf 100°C erhitzt. Anschließend wurden die Färbelösung entsorgt und die Blätter mit gesättigter Chloralhydrat-Lösung (2,5 kg Chloralhydrat in 1 L H₂O) entfärbt. Die entfärbten Blätter wurden in Petrischalen gelegt und für die visuelle Auswertung fotografiert.

2.4 Nukleinsäuren

2.4.1 DNA Methoden

Genomische DNA aus Arabidopsis-Blattmaterial wurde nach der Methode „Quick DNA Prep for PCR“ (Weigel & Glazebrook, 2002) isoliert.

2.4.2 RNA Methoden

Gesamt-RNA wurde mit der Trizol-Methode isoliert (Chomczynski & Sacchi, 1987) RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels Nanodrop8000 (Thermo Fischer Scientific). Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.4.3 cDNA-Synthese und qRT-PCR

Die Synthese von cDNA aus 2 µg RNA erfolgte mit dem RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fischer Scientific) unter Verwendung der *oligo-dT-Primer* entsprechend der Herstellerangaben. Zuvor wurde die RNA mit RNase-freier DNaseI (RNase-free DNase Set, QIAGEN) behandelt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide und Taq-man Sonden.

FAM und BHQ1 sind die Fluoreszenzfarbstoffe. Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins bezogen. Für *PCS1* wurde die Roche Sonde #135 aus der UniversalProbeLibrary (cat.no. 04694198001) verwendet.

Bezeichnung	ATG Nr.	Sonde	Primer 1	Primer 2
<i>Cyp71A12</i>	AT2G30750	FAM-AGA ATA CTG GAG ACA GAT GAA GAG TGT A-BHQ1	GCC GTG ATT AAA GAG GTG TTT C	ATG GCC CAA GCA TTG ATT AT
<i>Cyp81F2</i>	AT5G57220	FAM-AGA CGC TAC TAC GGA GAC CAG G-BHQ1	TAT TGT CCG CAT GGT CAC AG	GAT TCG CTT CTT CCT TGT TAT GA
PP2A (HK)	AT1g13320	FAM-ATA ATG AGG CAG AAG TTC GGA TAG CAG-BHQ1 oder Roche Sonde No #29	GAC CGG AGC CAA CTA GGA C	AAA ACT TGG TAA CTT TTC CAG CA
<i>PCS1</i>	AT5G44070	Roche Sonde No #135	TGC ATG AAA TGA AGC AGC TC	GCC GTC GAA GAT GCA ATA C

Für den Einsatz in qRT-PCR-Analysen wurde die cDNA 1:5 bis 1:10 verdünnt. qRT-PCR Analysen wurden nach der *Taq-man* Methode durchgeführt (Holland *et al.*, 1991). Der PCR-Reaktionsmix wurde unter Verwendung des Maxima™ Probe qPCR Master Mix (Fermentas), 5 µl der verdünnten cDNA und genspezifischen Oligonukleotiden sowie Sonden angesetzt. Als Referenzfarbstoff wurde ROX verwendet (im Mastermix enthalten). Die PCR-Reaktion und die Messung der Transkriptmengen-Akkumulation 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) unter Berechnung des ΔCT -Werts ($2^{-\Delta\text{CT}}$) ermittelt (Schmittgen & Livak, 2008).

2.5 Massenspektrometrie

2.5.1 Probenvorbereitung

Zur Analyse von Pathogen induzierbaren Metaboliten in *P. infestans* inokulierten *A. thaliana* Blättern und Inokulationstropfen wurden 5 Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen mit einer *P. infestans* Sporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ mL) inokuliert (30 Tropfen/ Pflanze). Nach Inkubation in einer Phytokammer (Heraeus/ Vötsch GmbH, Hanau) bei 100% Luftfeuchte und Langtagbedingungen (16 h Licht 20°C, 8 h dunkel 18°C) wurden die Tropfen wieder abgenommen und in 1,5 mL *safe lock* Reaktionsgefäße (Eppendorf) überführt. Das Blattmaterial wurde direkt nach dem Entfernen der Tropfen in 2 mL Schraubdeckelgefäße (Sahrstedt) mit Porzellankügelchen 2 mm Ø (Ermil) gesammelt. Tropfen und Blattmaterial wurde direkt nach der Ernte in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.1.1 Aufarbeitung Tropfen

Tropfen (30 Tropfen/ Pflanze) wurden ca. 4 h in einem Vakuum-Konzentrator (Christ RVC 2-25 CO plus) bis zur Trockne eingeengt (30°C, 100 mbar). Das Pellet wurde in je 60 µL 30% MeOH resuspendiert. Die Proben wurden 15 min in einem Ultraschallbad sonifiziert und danach mindestens 10 min zentrifugiert (4°C 15000 rpm) um Schwebstoffe und andere Verunreinigungen zu pelletieren. Der Überstand wurde in HPLC-Gefäße (QsertVial, Waters) überführt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

2.5.1.2 Aufarbeitung Blattmaterial

Vor der Aufarbeitung des Blattmaterials wurde das Frischgewicht mit einer Feinwaage (Mettler Toledo new classic MF) bestimmt.

Die Blätter wurden 2x20 sec, 6500 rpm in Schraubdeckelgefäße in einem MP-FastPrep-24 Homogenisator unter flüssigem N₂ zerkleinert. Die Proben wurden auf Trockeneis temperiert (-78°C) und mit ca. 200 µL 80% MeOH (-80°C, LC-MS *grade*) versetzt und gemischt. Danach wurden die Proben langsam auf RT temperiert und währenddessen mehrfach mittels VORTEX-2 gemischt.

Den Proben wurde bei diesem Extraktionsschritt ein interner Standard (20 µL/ 100 mg Frischgewicht) bestehend aus 30 µM BiochaninA, 30 µM Kinetin und 30 µM IAA-Val in 30% MeOH hinzu gegeben. Nach 15 min Sonifikation im Ultraschallbad bei RT folgte eine Zentrifugation (10 min, 4°C, 14000 rpm). Der Überstand wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß (*safe lock* Eppendorf) überführt und bei 4°C auf Eis gehalten

In einem zweiten Extraktionsschritt wurde nochmal 200 µL 80% MeOH zum Pellet gegeben und erneut 2 x 20 sec, 6500 rpm im einem MP-FastPrep-24 Homogenisator durchmischt. Die Proben wurden 15 min im Ultraschallbad sonifiziert und anschließend zentrifugiert (10 min, 4°C, 14000 rpm). Der Überstand wurde mit dem Überstand aus dem ersten Extraktionsschritt vereinigt und in einer Vakuum-Konzentrator (Christ RVC 2-25 CO plus) bis zur Trockne eingeeengt.

Das Pellet wurde mit 200 µL/ 100 mg Blattfrischgewicht in 30% MeOH resuspendiert und anschließend 15 min im Ultraschallbad sonifiziert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4°C, 14000 rpm) wurden die Proben in HPLC Gefäße (300 µL *Fixed insert vial*, Chromacol) überführt und bis zur Messung bei -80°C gelagert.

2.5.1.3 Messmethode

Ein Acquity UPLC System (Waters) bestückt mit einer HSS T3 Säule (100 x 1 mm, Partikel Größe 1,8 µm, Waters) wurde zur chromatographischen Trennung der Proben (s.o.) verwendet. Der binäre Gradient lief bei einer Flussrate von 150 µL/ min mit folgendem Verlauf: 0-1 min, isokratisch 95% A (Wasser: Ameisensäure, 99,9:0,1 [v/v]), B (Acetonitril: Ameisensäure, 99,9:0,1 [v/v]); 1-10 min, linear von 5% zu 60% B; 10-12 min, isokratisch 95% B; 12-14 min isokratisch 5% B, Das Injektionsvolumen betrug 2,6 µL (*full loop injection*).

Die eluierten Substanzen wurden mit einem MicrOTOF-Q *hybrid quadrupole time off flight* Massen Spektrometer (Bruker Daltonics), ausgestattet mit einer Apollo II Elektrospray Ionen Quelle, im Massenbereich 100-100 m/z im positiven sowie negativen Ionisierungsmodus gemessen. Die folgenden Geräteeinstellungen wurden vorgenommen:

Nebulizer Gas, Stickstoff, 1,6 bar; Trocken Gas, Stickstoff, 6 L/ min, 190°C; Kapillare, -5500 V (+4000 V); end plate offset, -500 V; funnel 1 RF, 200 Vpp; funnel 2 RF, 200 Vpp; in-source CID energy, 0 V; hexapole RF, 100 Vpp; quadrupole ion energy, 5 eV; collision gas, Argon; collision energy, 10 eV; collision RF 200/400 Vpp (timing 50/50); transfer time, 70 µs; prepulse storage, 5 ms; pulser frequency, 10 kHz; spectra rate, 3 Hz. Interne Massen Kalibration wurde durch Injektion von 20 µL 10 mM Lithiumformiat in Isopropanol/ Wasser, 1:1 (v/v) in Minute 12 des Gradienten (s.o.)gewährleistet.

2.5.1.4 Auswertung

Sichtung und Analyse der Daten erfolgte mit der Software Buker Compass DataAnalysis 4.2 SR2. Gerichtete Analyse erfolgte durch Peakflächen-Bestimmung mittels Compass QuantAnalysis 2.2

Ungerichtete Analyse der Datensätze erfolgte mittels des Programms „R“ (R-Development-Core-Team, 2008) und folgender Zusatzpakete: Biobase, Biogenerics, datasets, graphics, grDevices, methods, mzR, parallel, ProtGenerics, Rcpp, stats, utils und xcms. (r-script siehe Anhang)

Statistische Auswertungen wurden mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism Version 5.00 für Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com) vorgenommen.

2.6 Synthese von 4-Methoxy-Indol-3-methanol und –methylcystein

2.6.1 4-Methoxy-Indol-3-methanol

Zu einer Lösung von 4-Methoxyindole-3-carboxaldehyd (2,8 g) (4-MIC) in Methanol/Ethanol/Chloroform 1:8:5 wurde äquimolar Natriumborhydrid gegeben und diese Mischung 6 h unter Schutzatmosphäre (N₂) bei RT gerührt.

Der Reaktionsverlauf wurde mittels Dünnschichtchromatografie (Laufmittel DCM/MeOH 95:5) verfolgt.

Nach Vollständiger Reaktion wurde das Lösungsmittel mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt und das Produkt, 4-Methoxy-Indol-3-methanol (4-MeOI3M), in Methanol rückgelöst. Für die Reinigung der Substanz von Syntheserückständen und Edukt Resten wurde eine *flash* Kieselgel Säule verwendet (l = 24 cm; d = 7 cm; Partikelgröße: 0,065-0,2 mm Lösungsmittel. DCM/ MeOH 95:5). Die Chromatografische Trennung wurde visuell verfolgt (blau, rot, gelb) und wurde entsprechend fraktioniert. Die Fraktionen wurden mittels Dünnschichtchromatografie überprüft. 4-MeOI3M wurde zum großen Teil in der roten Phase gefunden. Daher wurden die Fraktionen der roten Phase vereinigt und mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt. Das Gewicht des Produkts wurde ermittelt (1,4301 g) und zur weiteren Verwendung in 20 mL Methanol rückgelöst. Die Substanz wurde mittels ESI-MS und 1H-NMR analytisch untersucht (Abt. NWC IPB Halle).

2.6.2 4-Methoxy-Indol-3-methylcystein

Zur Synthese von 4-Methoxy-Indol-3-methylcystein (4-MeOI3Cys) wurde das unter 2.7.1 produzierte 4-MeOI3M (0,64 g) mit L-Cystein (0,87 g) in wässrig basischer Lösung

umgesetzt. Das Gemisch bestand aus einem Teil 4-MeOI3M und zwei Teilen Cystein und wurde mit Natronlauge auf pH 13 eingestellt. Nach 17 h rühren bei 60°C wurde das Gemisch auf RT abgekühlt und durch einen Faltenfilter gegeben. Mit 0,2 N HCl wurde der pH auf 7 abgesenkt. Beim langsamen einengen in einem Rotationsverdampfer, fiel ein weißer Feststoff aus der nach abfiltrieren über eine Fritte mittels ESI-MS und ¹H-NMR überprüft und als 4-MeOI3Cys identifiziert wurde (Abt. NWC IPB Halle)

3. Ergebnisse

3.1 Die Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. infestans*

Die Interaktion zwischen *Arabidopsis thaliana* und *Phytophthora infestans* wird als Nichtwirtsresistenz (NHR) eingeordnet da das Pathogen nicht in der Lage ist, seinen Lebenszyklus auf der Pflanze zu vervollständigen. Auch durch Beseitigung einzelner Komponenten der präinvasiven Abwehr wird *P. infestans* in seiner Ausbreitung gestoppt. Zur Aufrechterhaltung der präinvasiven Abwehr gehört die atypische Myrosinase PEN2, die Indolglucosinolate spaltet (Bednarek *et al.*, 2009). Die Mutantenlinie *pen2*, bei der das *PEN2* Gen ausgeschaltet ist (Lipka *et al.*, 2005) zeigt einen verstärkten Zelltod-Phänotyp wenn sie mit *P. infestans* inokuliert wurde (Abb.5 A). Die hier verwendete *PEN2* Mutante wurde im *gl1* Hintergrund erstellt. Die Zelltodreaktion lässt sich durch Färbung mit einer Laktophenol-Trypanblau-Färbelösung visualisieren. Zellen, die erfolgreich durch *P. infestans* penetriert wurden, werden durch Apoptose abgetötet. Da sich der Farbstoff aus vorher intaktem Gewebe leichter wieder entfernen lässt, bleiben die abgetöteten Zellen, nach Entfärbung, angefärbt. Eine erhöhte Zahl an erfolgreichen Penetrationen resultiert in einer stärkeren Blaufärbung dieser Bereiche. Im Fall von *pen2* lässt sich, im Vergleich zum Wildtyp, eine deutlich verstärkte Blaufärbung des Blattgewebes unterhalb des Inokulationstropfens 3 dpi erkennen. Eine weitere Mutantenlinie die diesen Phänotyp zeigt, ist *pen3* (Kobae *et al.*, 2006; Stein *et al.*, 2006). Bei dieser Mutante ist der ABC Transporter PEN3 ausgeschaltet, der wahrscheinlich *PEN2* abhängige Syntheseprodukte transportiert. Die Cytochrom P450 Oxidase CYP81F2 ist für die Hydroxylierung der 4' Position am Indolring von Indolglucosinolaten verantwortlich und ist somit an der Synthese potentieller *PEN2* Substrate beteiligt. Um zu untersuchen ob der Verlust der CYP81F2 Enzymaktivität sich ebenfalls auf die Penetrationshäufigkeit auswirkt, wurde die Mutantenlinie *cyp81F2* in die Analyse einbezogen und mit dem korrespondierendem Wildtyp Col-0 verglichen (Abb. 5 B). Blätter der *A. thaliana* Mutanten *pen2* und *pen3* zeigen einen verstärkten Zelltod nach Inokulation mit *P. infestans* (PEN-Phänotyp). Die Zelltodreaktion beschränkt sich dabei auf die Inokulationsstelle und überschreitet nicht die Grenzen des Inokulationstropfens. Das ist ein Hinweis auf eine lokale Immunantwort bei der das Pathogen am Weiterwachsen gehindert wird. Blätter der *cyp81F2* Linie zeigten keinen verstärkten Zelltod-Phänotyp nach Inokulation mit *P. infestans*.

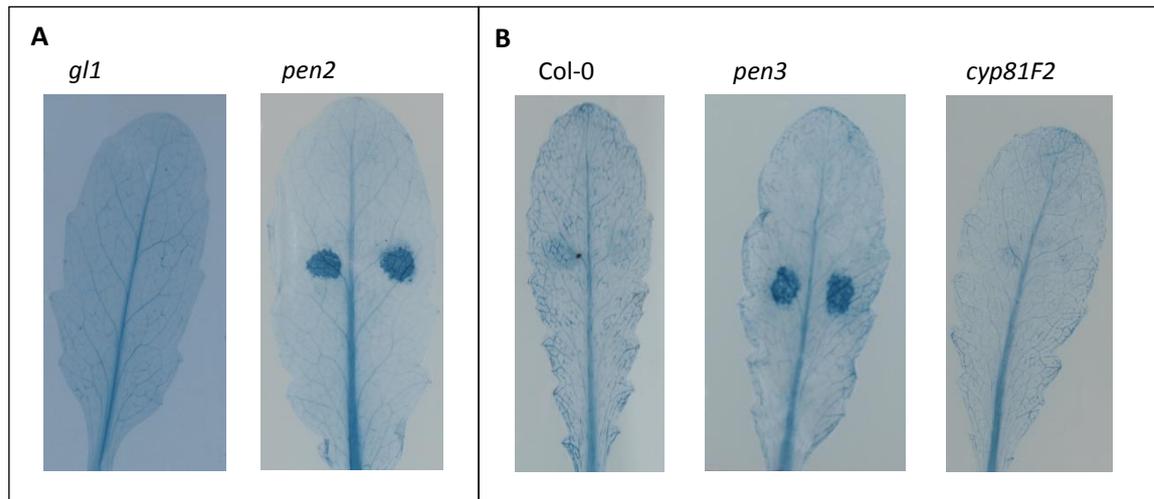


Abbildung 5: Zelltodphänotyp von *A. thaliana* Mutanten nach Inokulation mit *P. infestans*.

Blätter von adulten *A. thaliana* Pflanzen wurden mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ mL) inokuliert. Die Inokulationstropfen hatten dabei ein Volumen von 10 μ L. Die Blätter wurden nach 3 dpi in einer Laktophenol-Trypanblau Lösung gefärbt. Nach Entfärbung in einer Chloralhydratlösung wurden die Blätter auf eine transparente Oberfläche aufgezogen und fotografiert. Es wurden die Linien *pen2* mit dem korrespondierendem Wildtyp *gl1* (A) und *pen3* sowie *cyp81F2* korrespondierend zum Wildtyp Col-0 verwendet (B). Bilder exemplarisch für mindestens 3 unabhängige Experimente mit jeweils mindestens 5 individuellen Pflanzen pro Linie.

Interessanterweise wurde der PEN-Phänotyp auch bei der Linie *cad1-3* beobachtet (Kühnlenz *et al.*, 2015). Hier ist die Phytochelatinsynthase1 (PCS1), die vermutlich auch an der Verstoffwechslung von PEN2 Abbauprodukten beteiligt ist, nicht funktional. Die PEN2 abhängige Synthese von Indolglucosinolat-Abbauprodukten könnte ein kritischer Punkt in der präinvasiven Abwehr sein. Um den Einfluss der Synthese und des Abbaus von Indolglucosinolaten auf die NHR von *A. thaliana* gegen *P. infestans* zu untersuchen, wurden in den nachfolgenden Analysen die Mutantenlinien *pen2*, *pen3*, *cad1-3*, *cyp81F2* und *cyp79B2/B3* mit ihren korrespondierenden Wildtypen *gl1* und Col-0, untersucht.

3.1.1 *P. infestans* induzierte Genaktivierung in *A. thaliana*

Die Aktivierung von Abwehrgenen, deren Genprodukte an der Bildung von Sekundärmetaboliten beteiligt sind, wurde im Rahmen des Forschungsgruppenpraktikums von Ben Alexander Meinen, in inokuliertem Blattmaterial über mehrere Messzeitpunkte untersucht. Die hier analysierten Gene waren *Cyp71A12*, welches für ein Schlüsselenzym zur Synthese von Camalexin codiert (IAOx->IAN), *CYP81F2* sowie *PCS1*, deren Genprodukte weiter oben beschrieben sind und Anteil an der Verstoffwechslung von Indolglucosinolaten haben. Es fällt auf dass die Transkripte von *CYP71A12* bereits drei Stunden nach *P. infestans* Inokulation signifikant erhöht, im Vergleich zu Wasser behandeltem Blattmaterial akkumulieren (Abb. 6). Dies trifft auch für *P. infestans* inokuliertes Blattmaterial aus *pen2* zu. Die Transkripte von *CYP81F2* akkumulieren ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur Wasserkontrolle 3 hpi in *P. infestans* behandeltem Blattmaterial. Demgegenüber wurden keine signifikant

veränderten Transkriptmengen von *PCS1* in *P. infestans* behandeltem Blattmaterial von *gl1* Pflanzen beobachtet. In Blattmaterial von *pen2* wiederum wurden signifikant erhöhte Transkriptgehalte von *PCS1* im Vergleich zur Wasserkontrolle gemessen.

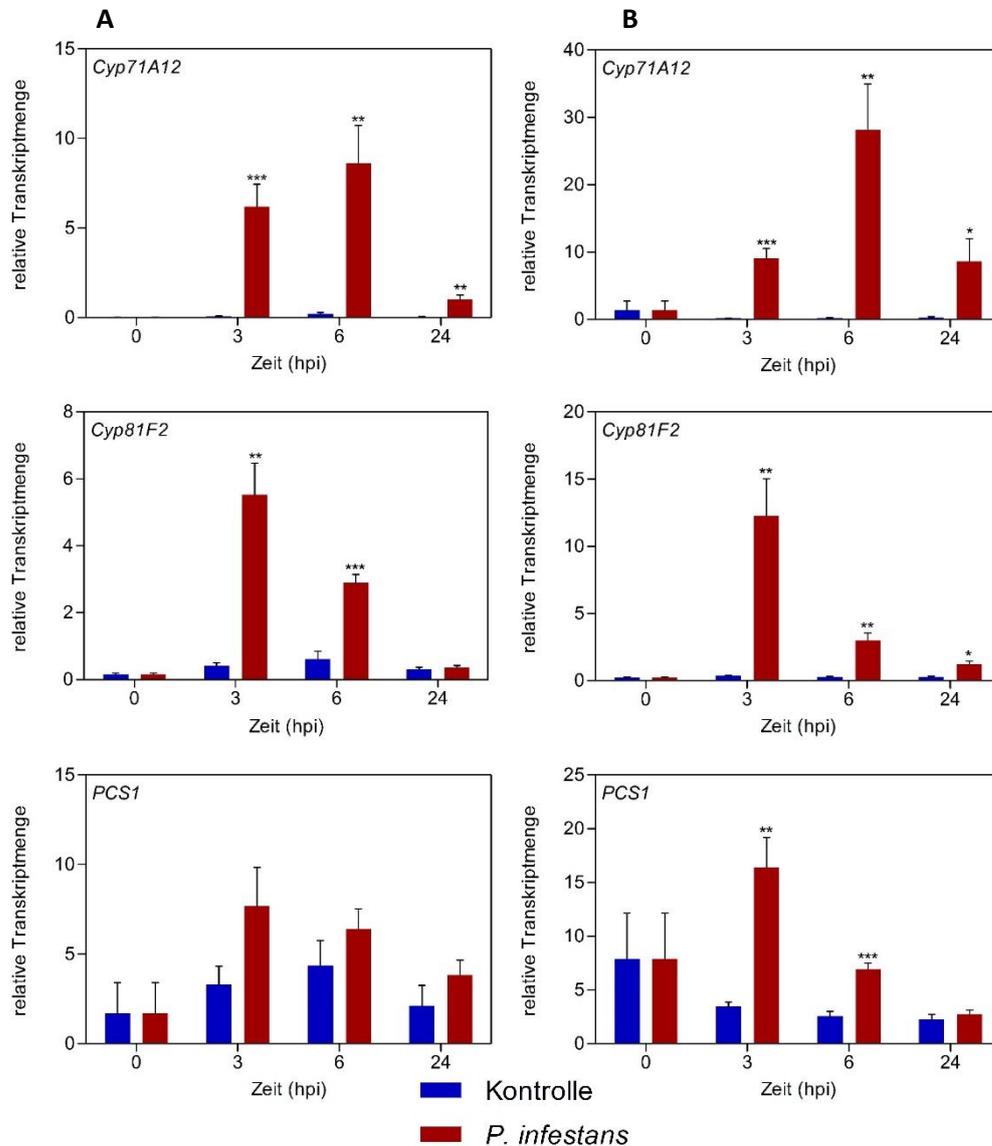


Abbildung 6: *P. infestans* induzierte Geneaktivierung in *gl1* und *pen2*.

Die relative Transkriptmenge der Gene *CYP71A12*, *CYP81F2* und *PCS1* wurde in Blättern von adulten *A. thaliana* Pflanzen der Linien *gl1* (Wildtyp) (A) und *pen2* (B) nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ mL) bestimmt. Zu den Zeitpunkten 0, 3, 6 und 24 hpi wurde das Blattmaterial geerntet, die RNA extrahiert und anschließend eine cDNA Synthese durchgeführt. Mittels q-RT PCR, unter Verwendung genspezifischer Sonden (Taq-man Technologie) und Oligonukleotiden, wurde im Vergleich zu dem konstitutiv transkribierten Gen, *AtPP2A*, die Transkripte gemessen. Berechnung und Analyse der Daten erfolgte über die Δ Ct Methode nach Pfaffel 2001. Daten aus drei unabhängigen Experimenten $n=6$. Statistische Auswertung erfolgte über einen Zweiseitigen t-Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.

P. infestans Behandlung von *A. thaliana* führt zur Aktivierung der Transkription von Pflanzengenen, deren Produkte an der Synthese von Tryptophan abgeleiteten Sekundärmetaboliten, wie Camalexin und Indolglucosinolaten, beteiligt sind.

3.1.2 Identifizierung von Sekundärmetaboliten in *A. thaliana* nach *P. infestans* Behandlung in extrazellulären Inokulationstropfen sowie Blattmaterial

Um den Einfluss chemischer Abwehrmechanismen auf die NHR von *A. thaliana* gegenüber *P. infestans* zu untersuchen, wurde eine Metaboliten-Analyse mittels Ultra Hoch Druck Flüssigchromatographie (UHPLC; *ultra high pressure liquid chromatography*) und Elektronen-Spray Ionisierung Massenspektrometrie (ESI-MS) durchgeführt. Dabei wurden Inokulationstropfen und inokuliertes Blattmaterial unabhängig voneinander betrachtet. Extra- und intrazelluläre Metaboliten, welche in den folgenden Mutanten als Reaktion auf die Inokulation mit *P. infestans* abweichende Konzentrationen im Vergleich zum korrespondierenden Wildtyp aufwiesen wurden untersucht.

3.1.3 Sekundärmetaboliten in Tropfen

Extrazellulär auftretende Metaboliten wurden in Inokulationstropfen 24 h nach der Inokulation von Col-0 mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/ mL) oder Wasser mittels LC/MS gemessen. In vergleichenden Analysen wurden Metaboliten identifiziert, die spezifisch nach *P. infestans* Behandlung akkumulieren (Tabelle 2). Hierbei wurden auch aus der Literatur bekannte Metaboliten detektiert, die nach Pathogenbefall in *A. thaliana* auftreten (Bednarek *et al.*, 2009; Böttcher *et al.*, 2009; Strehmel *et al.*, 2014; Dobritzsch *et al.*, 2016). Hier kann Camalexin und die Vorstufe Dihydrocamalexinsäure (DHCA) erwähnt werden. Außerdem wurde das Hydroxyzimtsäureamid *p*-Coumaroylagmatin identifiziert. Neben diesen Sekundärmetaboliten wurden weitere indolische Verbindungen entdeckt. Sie leiten sich von der Aminosäure Tryptophan ab, wobei die Substituenten am Indolring variieren. Wahrscheinlich läuft ihre Synthese über Indolglucosinolate. Die Synthese dieser Verbindungen ist bisher nicht vollständig verstanden. Bekannte Indolderivate, wie Indol-3-carbonsäure und Indol-3-carbaldehyd sowie der Indol-3-methylester als Derivat der Carbonsäure, wurden detektiert (Böttcher *et al.*, 2014). Auch der PEN2 abhängige Metabolit Indol-3-methylamin (I3MA) wurde auf der Blattoberfläche nachgewiesen (Bednarek *et al.*, 2009).

Tabelle 2: Analyse Daten von Verbindungen die mittels UPLC/ESI-QToF MS in *P. infestans* Sporensuspension, nach 24 h Inkubation auf *A. thaliana* Col-0 Wildtyp Blättern, detektiert wurden.

Nr.	Name	Referenz Standard (Quelle)	Summenformel	Ret. Zeit [min]	Ion zur Quantifizierung			
					Typ	m/z berechnet	Typ	m/z berechnet
1	Camalexin	synthetisch	C ₁₁ H ₈ N ₂ S	6.6	[M+H] ⁺	201.04810	[M-H] ⁻	199.0335
2	Dihydrocamalexinsäure (DHCA)	synthetisch	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	3.8	[M+H] ⁺	247.05358	[M-H] ⁻	245.0390
3	UNK-1 (Camalexin Metabolit C.Böttcher)		C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	3.9	[M+H-H ₂ O] ⁺	217.04301	-	-
4	UNK-2 (PAD3-abhängiger indolischer Metabolit C-Böttcher)		C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O	3.7	[M+H] ⁺	187.08659	-	-
5	Indol-3-ylmethyl amin (I3MA)	Sigma-Aldrich	C ₉ H ₁₀ N ₂	1.9	[M+H-NH ₃] ⁺	130.06513	-	-
6	Indole-3-carbonsäure (I3COOH)	Sigma-Aldrich	C ₉ H ₇ NO ₂	4.7	[M+H] ⁺	162.05496	[M-H] ⁻	160.0404
7	Indole-3-carboxyl-methyl ester (I3COOMe)	Olchemim	C ₁₀ H ₉ NO ₂	6.6	-	-	[M-H] ⁻	174.056
8	1-Methyl-indole-3-carbonsäure (1MeI3COOH)	Sigma-Aldrich	C ₁₀ H ₉ NO ₂	5.9	[M+H] ⁺	176.07061	-	-
9	Indole-3-carbaldehyd (I3CHO)	Sigma-Aldrich	C ₉ H ₇ NO	4.8	[M+H] ⁺	146.06004	[M-H] ⁻	144.0450
10	4-Hydroxyindol-3-carbaldehyde (4HOI3CHO)	Apollo Scientific	C ₉ H ₇ NO ₂	5.1	[M+H] ⁺	162.05496	[M-H] ⁻	160.0404
11	Coumaroylagmatin	synthetisch	C ₁₄ H ₂₀ N ₄ O ₂	2.9/3.3	[M+H] ⁺	277.16590	-	-
12	4-Methoxyindole-3-methylcystein	synthetisch	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	4.2	[M+H] ⁺	281.09	-	-
13	4-Methoxyindole-3-methanol	synthetisch	C ₁₀ H ₁₁ N ₂ O ₃ S	5.0	[M+H+Na] ⁺	200.06	-	-

In dieser Arbeit wurden weitere Indolderivate identifiziert, die in der Nichtwirtsinteraktion zwischen *P. infestans* und *A. thaliana* auf der Blattoberfläche im Inokulationstropfen akkumulieren. Interessanterweise wurden in Inokulationstropfen, die auf Blättern der *pen2* Mutante inkubiert wurden, weitere Sekundärmetaboliten detektiert (Tabelle3). Dazu gehören Phenylpropane, wie Scopoletin und Flavonoide, wie glycosilierte Varianten von Kaempferol. Weiterhin wurden auch Phytohormone wie Salicylsäure auf der Blattoberfläche detektiert. Diese Metaboliten wurden in Inokulationstropfen, die auf Col-0 inkubiert wurden, nur sehr gering abundant oder an der Detektionsgrenze gefunden. Ein Grund hierfür könnte die allgemein stärkere Reaktion von *pen2* gegen *P. infestans* sein.

Tabelle 3 Analyse Daten von Verbindungen die mittels UPLC/ESI-QToF MS in *P. infestans* Sporensuspension, nach 24 h Inkubation auf *A. thaliana* Mutante *pen2* Blättern, zusätzlich zu Tab. 2 detektiert wurden.

Nr.	Name	Referenz Standard (Quelle)	Summenformel	Ret. Zeit [min]	Ion zur Quantifizierung			
					Typ	<i>m/z</i> berechnet	Typ	<i>m/z</i> berechnet
14	2-Foramidophenyl-2'-thiazolylketon	synthetisch	C ₁₁ H ₈ N ₂ O ₂ S	6.0	[M+H] ⁺	233.03793	-	-
15	8-Methylsulphinyloctyl-NHCOSMe		C ₁₁ H ₂₃ NO ₂ S ₂	5.9	[M+Na] ⁺	288.10624	-	-
16	Kaempferol 3,7-di-O- α -Rha (K 3,7-Rha ₂)		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	4.7	[M+H] ⁺	579.17083	[M-H] ⁻	577.1562
17	Kaempferol 3-O- β -Glc-7-O- α -Rha (K 3-Glc-7-Rha)		C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	4.3	[M+H] ⁺	595.16575	[M-H] ⁻	593.1511
18	Sinapoylmalat		C ₁₅ H ₁₆ O ₉	4.6	[M+H-C ₄ H ₆ O ₃] ⁺	207.06519	[M-H] ⁻	339.0720
19	Scopoletin	Sigma-Aldrich	C ₁₀ H ₈ O ₄	4.5	[M+H] ⁺	193.04954	[M-H] ⁻	191.0350
20	Salicyl Säure (SA)	Sigma-Aldrich	C ₇ H ₆ O ₃	5.0	[M+H] ⁺	139.03897	[M-H] ⁻	137.0244
21	Jasmon Säure(JA)	Sigma-Aldrich	C ₁₂ H ₁₈ O ₃	6.6	-	-	[M-H] ⁻	209.1183
22	Hydroxyjasmon Säure		C ₁₂ H ₁₈ O ₄	4.0	-	-	[M-H] ⁻	225.1132

3.1.4 Identifizierung und Quantifizierung PEN2 und PEN3-abhängiger extrazellulärer Sekundärmetaboliten

Anhand ungerichteter Vergleichsanalysen zwischen Wildtyp *A. thaliana* Pflanzen und den Penetrationsmutanten *pen2* und *pen3* wurden Verbindungen gesucht, welche abhängig von PEN2 und PEN3 auf der Blattoberfläche nach Inokulation mit *P. infestans* detektierbar sind. Für die ungerichtete Metaboliten Analyse wurde die mit *P. infestans* inokulierte *pen2* (Lipka *et al.*, 2005) Mutante und dem korrespondierendem Wildtyp *gl1*, sowie *pen3-1* (Stein *et al.*, 2006) und dem korrespondierendem Wildtyp Col-0 verwendet. Das Inokulum sowie methanolische Extrakte des inokulierten Blattmaterials wurden mittels Massenspektrometrie analysiert. Die bioinformatische Auswertung, unter Verwendung des Programms „R“ (R-Development-Core-Team, 2008) ergab Kandidaten-Peaks die PEN2 und PEN3-abhängig sind und im Inokulationstropfen von *P. infestans*, aber nicht in Wasser oder Sporensterilfiltrat vorkommen.

Mittels MS/MS Experimenten (Abb. 7) wurden erste Hinweise auf die Struktur dieser Kandidaten-Verbindungen ermittelt. Die chemische Synthese der Kandidaten und Vergleich ihrer MS/MS-Spektren und Retentionszeiten ließen eine Identifizierung der Verbindungen zu. Die Masse zu Ladungsverhältnisse (*m/z*) 200,06 und 281,09 wurden

den Metaboliten 4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M) und 4-Methoxyindol-3-methylcystein (4-MeOI3Cys) zugeordnet.

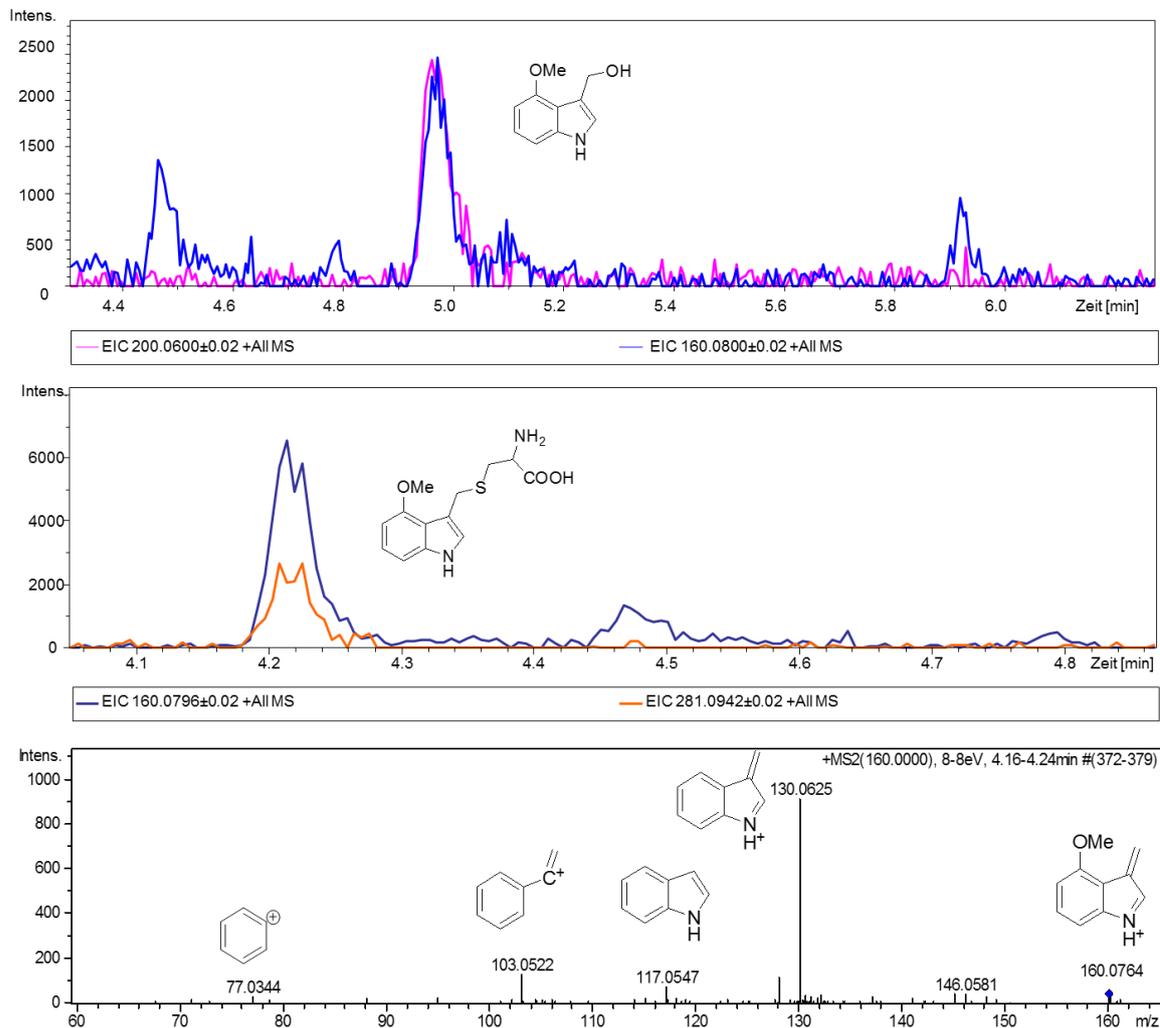


Abbildung 7: Identifizierung von 4MeOI3Cys und 4-MeOI3M.

Darstellung der extrahierten Ionen-Chromatogramme der m/z 281,09 und 200,06 und der ko-eluierenden m/z 160,08 gemessen in *P. infestans* Inokulationstropfen 24 h nach Inkubation auf *A. thaliana* Blättern, sowie eines exemplarischen MS/MS Chromatogramms mit dem m/z 160,08 als Ursprungs-Ion. Die resultierenden Fragmente können mit einer indolischen Vorstufe erklärt werden

Mittels chemischer Synthese von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys aus 4-Methoxyindol-3-carbaldehyd und nachfolgender Reinheitsüberprüfung mittels Massenspektrometrie und NMR in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Natur und Wirkstoffchemie (IPB) konnten die Produkte als Referenzsubstanzen verwendet werden. Die Retentionszeiten der synthetischen Metaboliten stimmen mit den Retentionszeiten der Metaboliten aus dem Tropfenmaterial überein.

Daraufhin wurden Nr. 12: 4-MeOI3Cys und Nr. 13: 4-MeOI3M der Tabelle 1 hinzugefügt. Nachfolgend wurde die Menge von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in Inokulationstropfen mittels QuantAnalysis (Bruker 2014) bestimmt. Die Akkumulation beider indolischer

Metaboliten, 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys, im Inokulationstropfen einer *P. infestans* Sporensuspension 24 h nach Inokulation, scheint von den Synthesenzymen PEN2 und CYP79B2/B3 abhängig zu sein da in den Mutanten Linien *pen2* und *cyp79B2/B3* keine dieser Substanzen detektiert wurde. Zusätzlich werden eine funktionierende Phytochelatin-Synthase 1 (PCS1) sowie das P450 Enzym CYP81F2 benötigt, um die gleichen Mengen, wie im den korrespondierenden Wildtypen, synthetisieren zu können (Abb. 8).

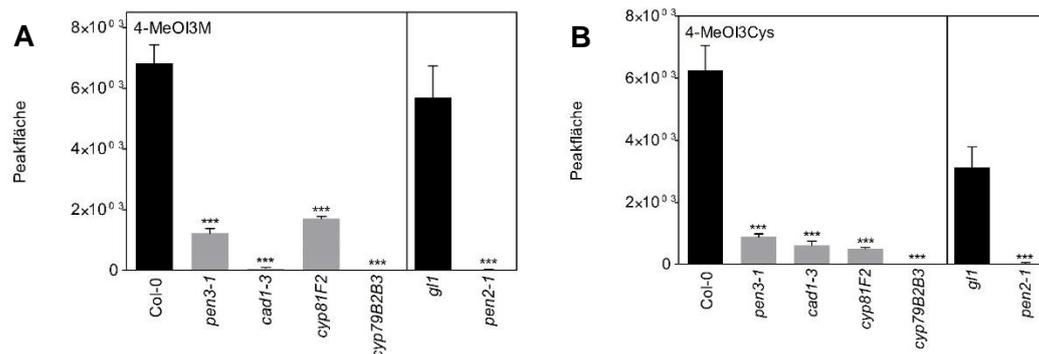


Abbildung 8: Quantifizierung von 4-Methoxyindol-3-methanol und 4-Methoxyindol-3-methylcystein in Inokulationstropfen.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche von 4-Methoxyindol-3-methanol (A) und 4-Methoxyindol-3-methylcystein (B) in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung des m/z und Retentionszeiten (Tab. 2), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***, $\leq 0,01$ **, $\leq 0,05$ *.

Weiterhin kann man im Inokulationstropfen der Mutante *pen3-1* signifikant geringere Mengen dieser zwei Metaboliten feststellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die beiden Verbindungen über den Syntheseweg von Indolglucosinolaten produziert werden und dass ihre extrazelluläre Akkumulation auf der Blattoberfläche von dem ABC Transporter PEN3 abhängt.

3.1.5 Quantifizierung abwehrrelevanter Metaboliten mittels Massenspektrometrie in Inokulationstropfen und inokuliertem Blattmaterial

Um einen Überblick über Vorkommen und Verteilung an der Abwehr beteiligter bekannter Sekundärmetaboliten innerhalb und außerhalb von mit *P. infestans* inokuliertem *A. thaliana* Blattmaterial 24 h nach der Inokulation zu erhalten, wurden bekannte Vertreter dieser Metaboliten in den Datensätzen quantifiziert. Dazu wurden die Analysedaten aus Tabelle 2 und 3 verwendet. Das Hauptphytoalexin aus *Arabidopsis thaliana*, Camalexin, akkumuliert nach Inokulation mit *P. infestans* auf der Blattoberfläche (Abb. 9). Wie bereits aus der Literatur bekannt, ist die Synthese von

Camalexin von den P450 Enzymen CYP79B2/B3 abhängig (Glawischig *et al.*, 2004; Böttcher *et al.*, 2009).

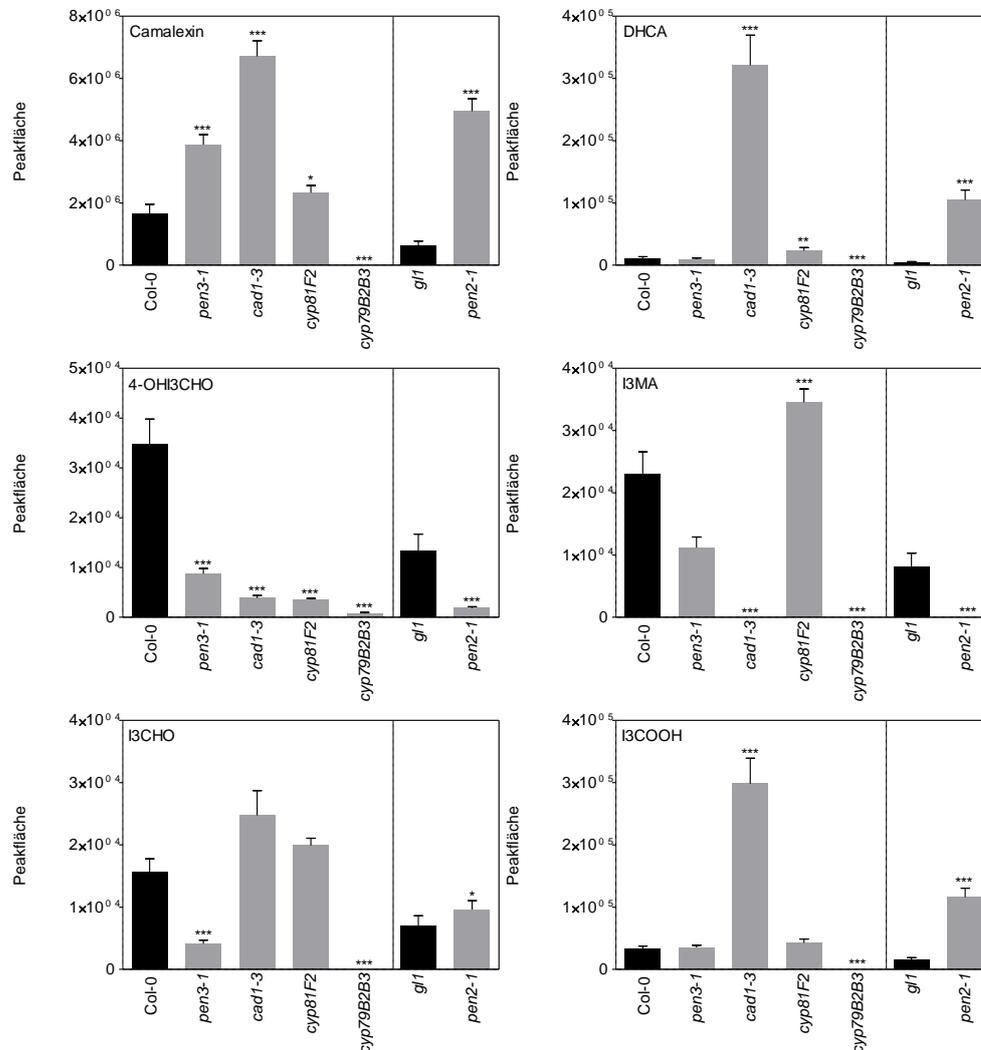


Abbildung 9: Quantifizierung abwehrrelevanter indolischer Metaboliten in Inokulationstropfen.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche von Camalexin, Dihydrocamalexinsäure (DHCA), 4-Hydroxyindol-3-carbaldehyd (4-OH13CHO), Indol-3-methylamin (I3MA), Indol-3-carbaldehyd (I3CHO), Indol-3-carbonsäure (I3COOH), in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tab.2), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.

Interessanterweise ist Camalexin auf der Blattoberfläche der Mutanten Linien *pen2*, *pen3*, *cad1-3* sowie *cyp81F2* signifikant erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Bei der Camalexin-Vorstufe Dihydrocamalexinsäure (DHCA) kann eine ähnliche Verteilung beobachtet werden. In Inokulationstropfen die auf der *pen3* Mutante inkubiert wurden, ist im Fall von DHCA allerdings keine signifikante Veränderung im Vergleich zum WILDTYP

feststellbar. Das Vorkommen der indolischen Verbindungen 4-OHI3CHO, I3MA, I3CHO und I3COOH ist in allen Fällen von der Enzymaktivität der CYP79B2/B3 Enzyme abhängig. Für 4-OHI3CHO und I3MA ist auch die Enzymaktivität von PEN2 sowie PCS1 zur Akkumulation notwendig. Der ABC Transporter PEN3 scheint für die extrazelluläre Akkumulation von I3MA eine untergeordnete Rolle zu spielen, da hier keine signifikanten Unterschiede in der Abundanz in Inokulationstropfen von der Mutantenlinie *pen3* im Vergleich zum WILDTYP Col-0 messbar waren. Nicht so für 4-OHI3CHO. Hier wurde ein signifikanter Unterschied zwischen *pen3* und Col-0 festgestellt. Dies könnte bedeuten, dass 4-OHI3CHO aber nicht I3MA, ein mögliches Substrat des ABC Transporters PEN3 darstellt. Die Akkumulation von I3CHO als bekannten indolischen Metabolit, der über CYP71B6 und CYP71A12 synthetisiert wird (Böttcher *et al.*, 2014), ist unabhängig von PCS1, CYP81F2 und PEN2. I3CHO könnte aber auch eines der möglichen Substrate von PEN3 sein. I3COOH, welches aus I3CHO über das Enzym AAO1 oder über Indol-3-carbonitril entstehen kann (Böttcher *et al.*, 2014), ist wiederum wahrscheinlich kein Substrat von PEN3 und akkumuliert signifikant erhöht auf der Blattoberfläche von *pen2* und *cad1-3* Pflanzen. Der Abwehrmetabolit *p*-Coumaroylagmatin akkumuliert, wie auch bei Dobritzsch *et al.* (2016) gezeigt, während der Nichtwirts-Interaktion von *A. thaliana* und *P. infestans* im Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation. Die Synthese und Sekretion dieses Hydroxyzimtsäureamides ist abhängig von der Agmatin Coumaroyl Transferase ACT und dem MATE Transporter DTX18. *p*-Coumaroylagmatin hemmt die Sporenkeimung von *P. infestans in vitro*. Interessanterweise akkumuliert dieser Metabolit verstärkt auf den Blattoberflächen von *cad1-3*, *pen2* und *cyp79B2/B3* (Abb. 9). Kaempferole gehören zu den Flavonoiden und gelten ebenfalls als Abwehrmetaboliten. Auch diese Verbindungen wurden auf der Blattoberfläche gefunden, wobei die Abundanz auf den WILDTYP Col-0 und *gl1* sich an der Detektionsgrenze befand. In den Mutantenlinien, bis auf *cyp81F2*, hingegen wurde Kaempferol-3-7-Rhamnosid sehr viel stärker abundant nachgewiesen. Ähnliches gilt für das Coumarin Scopoletin und das Phytohormon Salicylsäure. Die gesteigerte Akkumulation der verschiedenen Abwehrmetaboliten aus unterschiedlichen Stoffklassen in den untersuchten Mutanten, könnte mit der erhöhten Menge erfolgreicher Penetrationen zusammen hängen, was wiederum zu einer verstärkten Abwehrreaktion führt.

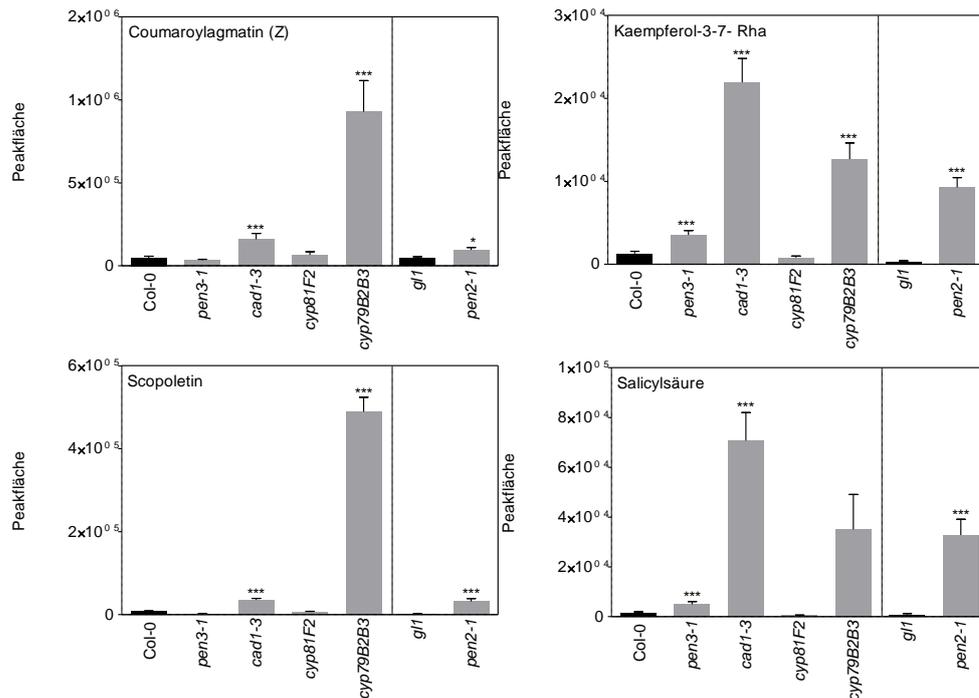


Abbildung 10: Quantifizierung weiterer abwehrrelevanter Metaboliten in Inokulationstropfen.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche von *p*-Coumaroylagmatin (Z Konformer), Sinapoylmalat, Formamidophenyl-2-thiazolylketon, Kaempferol-3-7- Rhamnosid, Scopoletin und Salicylsäure in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tab.3), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *

In methanolischen Blattextrakten sind die potentiellen Vorstufen I3G sowie 4-MeOI3G detektierbar (Abb. 11). Das Vorkommen von I3G und 4-MeOI3G ist vorrangig abhängig von CYP79B2/B3. Die Hydroxy- und damit auch die Methoxylierung an der 4'Position am Indolring ist abhängig von der CYP81F2 Enzymaktivität. Interessanterweise akkumuliert 4-MeOI3G in den Mutantenlinien *pen3*, *cad1-3* und *pen2* stärker im Vergleich zum Wildtyp. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in diesen Mutanten die Verstoffwechslung durch PEN2 bzw. PCS1 beeinträchtigt sein könnte oder es zu einer Rückkopplungshemmung der Synthese Produkte durch mangelhaften Abtransport kommt. Der PEN2 abhängige Metabolit I3MA und das vorgeschlagene Synthese Nebenprodukt Raphanusamsäure akkumulieren im Blattmaterial nach *P. infestans* Behandlung. Wobei es bei I3MA, wie auch schon im Inokulationstropfen, zu einer verminderten Anreicherung in *pen2*, *cad1-3* und *cyp79B2/B3* kommt, was auf eine Rolle der Enzyme PEN2, PCS1 und CYP79B2/B3 bei der Synthese dieser Verbindung hindeutet.

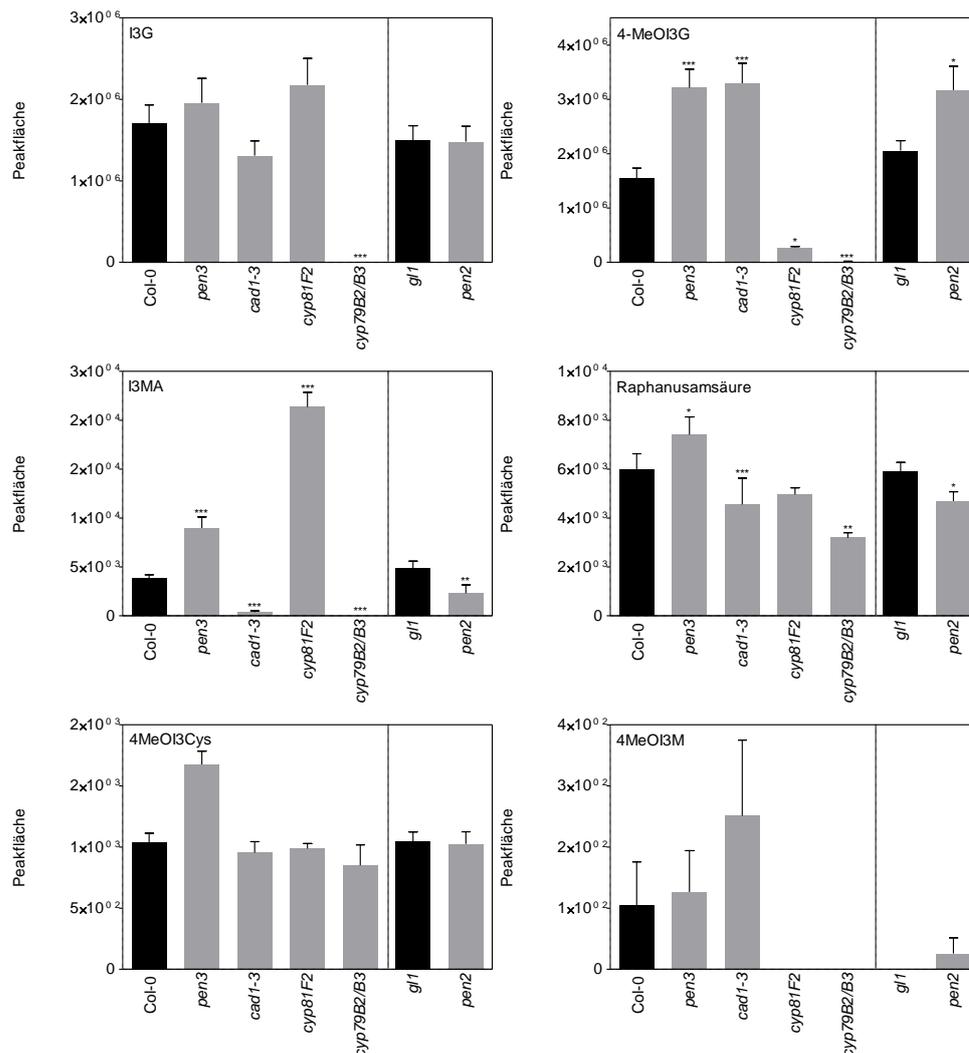


Abbildung 11: Quantifizierung abwehrrelevanter Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche von Indol-3-glucosinolat (I3G), 4-Methoxyindol-3-glucosinolat (4-MeOI3G), Indol-3-methylamin (I3MA), Raphanusamsäure, 4-Methoxyindol-3-methylcysein (4-MeOI3Cys) und 4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M) in Blattmaterial 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension (5×10^5 Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tab.2 und Anhang Tab.1), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *g/1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. *p*-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *

In den Linien *pen3* und *cyp81F2* akkumuliert I3MA hingegen verstärkt, was wiederum dafür spricht, dass I3MA möglicherweise auch ein Substrat von PEN3 sein könnte. Die Abwesenheit von CYP81F2 und der daraus resultierende Mangel an 4-methoxylierten Indolderivaten könnte die Synthese in Richtung I3MA verschieben, was der Grund für stark erhöhte Level dieses Metaboliten in der Linie *cyp81F2* sein kann. 4-MeOI3Cys sowie 4-MeOI3M konnten im Blattmaterial nur an der Detektionsgrenze gemessen werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die entdeckten PEN2 und PEN3-abhängigen Metaboliten direkt an der Stelle der versuchten Penetration aus Vorstufen synthetisiert und transportiert werden müssen.

3.2 Zeitlicher Verlauf der Akkumulation von Sekundärmetaboliten auf der Blattoberfläche

Um die zeitliche Abfolge der Produktion und des Transports von Sekundärmetaboliten auf der Blattoberfläche sowie im darunter liegenden Blattgewebe von *A. thaliana* nach Inokulation mit *P. infestans* untersuchen zu können, wurden relative Gehalte von Sekundärmetaboliten in Abhängigkeit von der Zeit untersucht. Hierbei wurden *A. thaliana* Pflanzen mit *P. infestans* inokuliert und Tropfen- sowie Blatt-Proben wurden über mehrere Messzeitpunkte gesammelt, aufgearbeitet und massenspektrometrisch analysiert.

3.2.1 Zeitlicher Verlauf der Sekretion von Metaboliten in Reaktion auf *P. infestans*

Die Sekretion von Abwehrmetaboliten an die Stellen der versuchten Penetration ist Teil der Immunantwort und muss schnell und präzise erfolgen, damit eventuelle antimikrobielle Substanzen oder auch Signalmoleküle, welche die Reizperzeption verstärken, an ihren Wirkungsort transportiert werden können. Anhand der Analyse der Metaboliten über mehrere Messzeitpunkte ist zu erkennen, dass die Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys bereits zwischen 2 und 4 Stunden nach der Inokulation auf der Blattoberfläche akkumulieren (Abb.12). Andere bekannte Sekundärmetaboliten, welche Anteil an Immunantworten von Pflanzen haben oder in Verbindung damit auftreten, können zum Teil erst später im Inokulationstropfen detektiert werden (siehe Anhang).

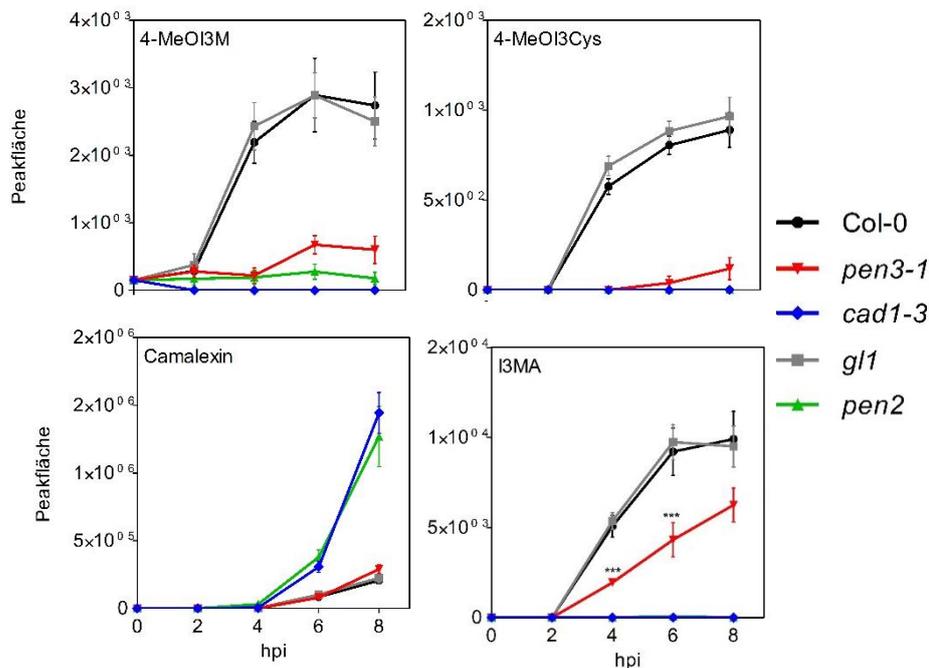


Abbildung 12: Quantifizierung von Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen über die Zeit.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie von 4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M), 4-Methoxyindol-3-methylcysein (4-MeOI3Cys) Camalexin und Indol-3-methylamin (I3MA) in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der m/z und Retentionszeiten (Tab.2) über die Peakfläche, berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Wildtyp Col-0 schwarz und *gl1* grau; Die Mutanten *pen3-1* rot, *cad1-3* blau und *pen2* grün. Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem T-test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***, $\leq 0,01$ **, $\leq 0,05$ *.

3.2.2 Zeitlicher Verlauf der Akkumulation von Metaboliten im Blatt in Reaktion auf *P. infestans*

Indol-3-glucosinolat (I3G) und 4-Methoxyindol-3-glucosinolat (4-MeOI3G) wurden in dieser Arbeit als potentielle Vorstufen von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys angenommen. In Zeitverlaufsuntersuchungen an methanolischen Blattextrakten mittels Massenspektrometrie, wurden diese Metaboliten quantifiziert. Dabei fiel auf, dass die Level für I3G in allen untersuchten Linien nach Inokulation stetig abfallen (Abb. 13). Dies könnte ein Indikator für Induzierten Abbau hin zu den wirksamen Indolderivaten, welche an die Blattoberfläche sezerniert werden, sein. Wie bereits in den Ergebnissen unter 3.2.2 gezeigt sind 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys von den Synthesenzymen PEN2 und PCS1 /CAD1 abhängig. Des Weiteren ist ein funktionaler ABC Transporter PEN3 nötig, damit beide Substanzen im Tropfen auf der Blattoberfläche detektiert werden können.

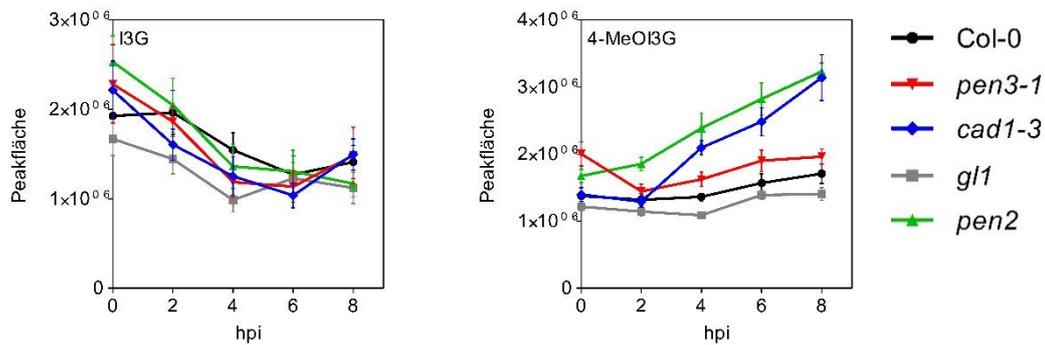


Abbildung 13.: Quantifizierung potentieller Vorstufen-Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie von 4-Methoxyindol-3-glucosinolat (4-MeOI3M) und Indol-3-glucosinolat (I3G) in Blattmaterial 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der m/z und Retentionszeiten über die Peakfläche (Anhang Tab.1), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Wildtyp Col-0 schwarz und *gl1* grau; Die Mutanten *pen3-1* rot, *cad1-3* blau und *pen2* grün.

Im Fall des Hauptphytoalexins Camalexin aus *A. thaliana*, fällt auf, dass erst zwischen 4 und 6 Stunden nach Inokulation ein Anstieg messbar ist. Camalexin akkumuliert auf der Blattoberfläche von *pen2* und *cad1-3* im Inokulationstropfen weitaus stärker im Vergleich zum Wildtyp. Auch I3MA ist von PEN2 und PCS1/CAD1 abhängig. Im Unterschied zu 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys, scheint PEN3 keine so drastische Rolle zu spielen wenn auch hier signifikant verringerte Level an I3MA im Vergleich zum Wildtyp nach 4 und 6 hpi messbar sind. Nach 8 hpi ist dieser Unterschied, wie auch 24 hpi, nicht signifikant. Die indolischen Verbindungen, welche PEN2 abhängig akkumulieren werden sehr schnell nach Inokulation mit *P. infestans* in den Inokulationstropfen und damit vermutlich an die Stelle der versuchten Penetration transportiert. Die Menge an 4-MeOI3G hingegen bleibt für die beiden Wildtypen, Col-0 und *gl1*, sowie für die Transportermutante *pen3-1* gleich. In den Synthesemutanten *pen2* und *cad1-3* steigt sie wiederum an, was auf eine Akkumulation durch beeinträchtigte Verstoffwechslung hindeuten könnte. Interessanterweise sind die Level für 4-MeOI3G in methanolischen Blattextrakten aus *pen3*, 24 hpi nach Inokulation mit *P. infestans* ähnlich hoch wie aus *pen2* und *cad1-3* (siehe 3.2.3). Dies kann bei 8 hpi nicht beobachtet werden.

3.3 Funktion der Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys

Die Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys, welche auf der Blattoberfläche von *A. thaliana* Pflanzen nach Inokulation mit *P. infestans* akkumulieren, wurden auf Ihre mögliche Funktion untersucht. Vielen Sekundärmetaboliten wird eine antimikrobielle Wirkung zugeschrieben, die an der Stelle der versuchten Penetration das Wachstum des Pathogens inhibieren sollen. Wie zum Beispiel *p*-Coumaroylagmatin, das auch in diesem System entdeckt wurde (Dobritsch *et al.*, 2016).

3.3.1 Inhibierung des *P. infestans* Wachstums

Um zu untersuchen ob die Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys einen Einfluss auf das *Phytophthora infestans* Wachstum *in vitro* haben, wurde die Zunahme der Biomasse des Oomyceten im Flüssigmedium nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen gemessen (Abb. 14). Hier wurde die GFP Fluoreszenz des Stammes CRA208m2 (Si-Ammour *et al.*, 2003) genutzt. Der Anstieg der GFP Fluoreszenz ist proportional zum Anstieg der *P. infestans*-Biomasse. Zur Kontrolle wurden γ -Oxocrotonat Fettsäuren die eine inhibierende Wirkung gegen *P. infestans* besitzen (Eschen-Lippold *et al.*, 2009) und das kommerzielle antifungale Agens Azoxystrobin (Pestanal) verwendet. Verglichen wurde die gesamt Fluoreszenz nach 5 Tagen mit der Fluoreszenz des ersten Tages nach Zugabe der Analyten auf eine *P. infestans* Kultur in Flüssigmedium. Die Lösungsmittelkontrolle sowie die unbehandelten Proben sind die Bezugsgrößen für die statistische Auswertung. Es wurde festgestellt, dass die Metaboliten 4-MeOI3Cys und 4-MeOI3M bei einer Konzentration von 100 μ M keinen Einfluss auf das *P. infestans*, Wachstum *in vitro* haben. Die Kontrollen, γ -Oxocrotonat Fettsäuren und Azoxystrobin zeigen eine Inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *P. infestans* was die Funktionalität dieses Tests zeigt.

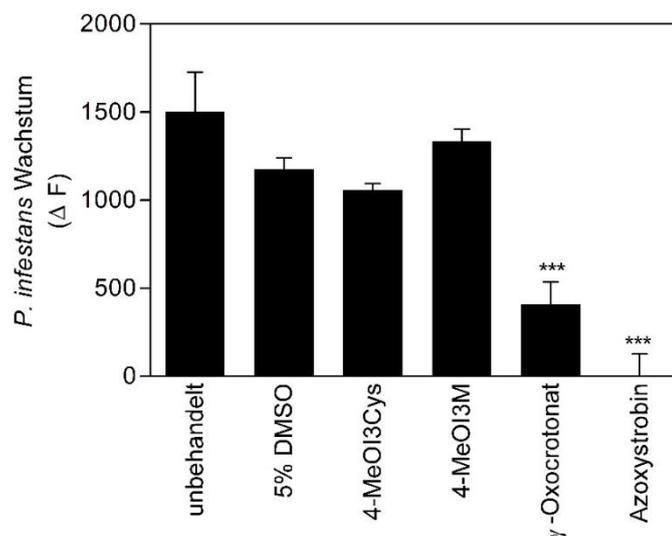


Abbildung 14: Inhibierung des Mycelwachstums von *P. infestans in vitro*.

Δ Floureszenz zwischen erstem und fünften Tag nach der Zugabe von 4Methoxyindol-3-methylcystein (4-MeOI3Cys), 4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M), γ -Oxocrotonatfettsäuren sowie Azoxystrobin je 100 μ M zuzüglich unbehandelter Proben und einer Lösungsmittel Kontrolle. Daten aus vier unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001 \rightarrow$ ***; $\leq 0,01 \rightarrow$ ** $\leq 0,05 \rightarrow$ *.

3.3.2 Induzierung von Abwehrreaktionen durch 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys

Da gezeigt wurde dass 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys keine wachstumsinhibierende Wirkung auf *P. infestans* haben, sollte untersucht werden, ob die Metaboliten die Aktivierung der Abwehrreaktion beeinflussen können. Ein möglicher Ansatz ist, den PAMP und Schaden/ Gefahren assoziierten molekularen Muster (DAMPs, *damage/danger associated molecular patterns*) induzierten Calcium Ionen Anstieg innerhalb der Zellen zu verfolgen. Hierfür wurden *pMAQ2* Pflanzen, die konstitutiv transgen Apoaeqourin exprimieren, welches bei einer Calciumbindung fluoresziert, verwendet (Ranf *et al.*, 2012). Mittels eines Varioscan Flash (Thermo Fischer Scientific) wurde die transiente Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte nach Perzeption Möglicher PAMPs untersucht. Es zeigte sich, dass 4-MeOI3M aber nicht 4-MeOI3Cys einen kleinen aber reproduzierbaren Calcium Peak auslöst (Abb. 15 A).

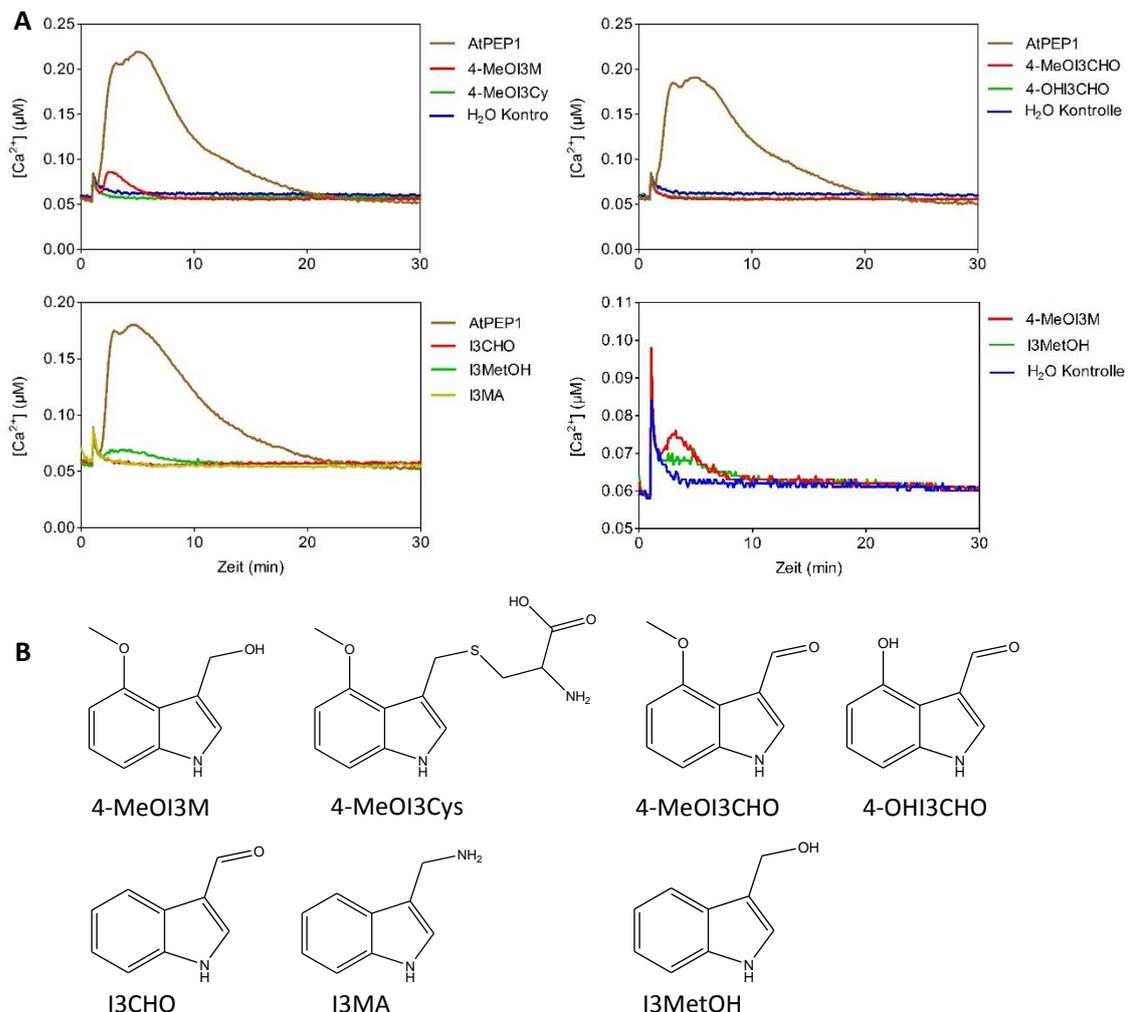


Abbildung 15: Analyse der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte..

Anstieg der cytosolischen Calcium Gehalte in transgenen *pMAQ2 A. thaliana* Keimlingen nach Behandlung mit diversen Indol-Derivaten, gemessen mittels Varioscan Flash (Thermo Fischer Scientific) (A). Übersicht der Verwendeten Indol-Derivate :4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M), 4-Methoxyindol-3-carbaldehyd (4-

MeOI3CHO), 4-Methoxyindol-3-methylcystein (4-MeOI3Cys), 4-Hydroxyindol-3-carbaldehyd (4-OHI3CHO), Indol-3-carbaldehyd (I3CHO), Indol-3-methylamin (I3MA) und Indol-3-methanol (I3MetOH) (B). Die Indol-Derivate wurden mit einer Endkonzentration von 10 μ M eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde das DAMP AtPEP1 [1 μ M] und als negativ Kontrolle 0,5% DMSO in Wasser (H_2O Kontrolle) verwendet. Daten exemplarisch für mindestens zwei unabhängige Experimente $n \geq 16$.

Konzentrationsabhängigkeiten wurden in zusätzlichen Experimenten nicht beobachtet (siehe Anhang). Vielmehr scheint die Konzentration von 10 μ M ein Maximum darzustellen, da die Amplitude des beobachteten Peaks auch bei einer 10-Fach höheren Konzentration nicht größer wurde. Untersuchungen mit weiteren Indol-Derivaten, welche an den Positionen 3' und 4' am Indolring unterschiedliche Substituenten aufwiesen, sollten klären welche funktionelle Gruppe für den Effekt von 4-MeOI3M verantwortlich ist. Dafür wurden Verbindungen ausgewählt, die Strukturell sehr ähnlich zu 4-MeOI3M sind (Abb. 15 A und B). Wird die Alkoholfunktion an der 3' Position gegen eine Aldehydfunktion ausgetauscht (4-MeOI3CHO), wird kein Ca^{2+} Anstieg beobachtet. Im Fall von 4-OHI3CHO, bei der eine Alkoholfunktion am Molekül an 4' Position lokalisiert ist, sowie für die Indol-Derivate ohne Substituenten an der 4' Position, I3CHO und I3MA, kann ebenfalls kein Anstieg der Ca^{2+} Ionen Konzentration beobachtet werden. Lediglich für I3MetOH war ein geringer Anstieg des Ca^{2+} Levels messbar, der jedoch nicht dieselbe Amplitude aufwies wie der Peak der durch 4-MeOI3M ausgelöst wird. Die Methanol Funktion an der 3' Position scheint demnach wichtig für den beobachteten Effekt zu sein. Dieser wird wahrscheinlich durch die an 4' Position gelegene methoxy-Funktion verstärkt. Um zu klären ob auch eine Alkoholfunktion an 4' Position den Effekt der Alkoholfunktion an 3' Position verstärkt wurde im Zuge der Synthese der Indol-Derivate 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys auch versucht 4-Hydroxyindol-3-methanol (4-OHI3M) und daraus 4-Hydroxyindol-3-methylcystein herzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich 4-OHI3M zu synthetisieren und daher auch nicht das dazugehörige Cystein-Derivat.

3.3.3 Komplementierung des flg22 induzierten Callose Phänotyps in *pen3-1* Mutanten

Wie von Clay *et al.* (2009) beschrieben, weist die ABC Transporter mutante *pen3* ein Defizit in der durch flg22 induzierten Calloseablagerung in Blättern von *A. thaliana* Keimlingen auf. Weiterhin zeigten auch die Mutantenlinien *pen2*, *cad1-3* und *cyp81F2* diesen Phänotyp. Dies könnte ein Hinweis auf die Abhängigkeit der flg22 induzierten Calloseablagerung von den Produkten des Indolglucosinolat-Syntheseweges sein. Für die Mutante *cyp81F2*, welche nur eingeschränkt in der Lage ist diesen Metabolit ausreichend bereitzustellen, wurde dieser Phänotyp in Fütterungsexperimenten mit der Vorstufe 4-MeOI3G komplementiert. Das aktive Stoffwechselendprodukt war aber

weiterhin unbekannt (Clay *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob 4-MeOI3M zur Bildung der flg22 induzierten Callose in *A. thaliana* Pflanzen beiträgt, wurde zu *pen3-1* Keimlingen in Flüssigmedium neben flg22 auch 4-MeOI3M appliziert. Die Keimlinge wurden 24 h inkubiert und danach mit Anilinblau gefärbt. Die gefärbten Blätter wurden mikroskopisch untersucht und fotografiert. Unter Zuhilfenahme der „Fiji“ Distribution von *Image J* (Schindelin *et al.*, 2012) wurden die Callose gefärbten Bereiche, abzüglich der Blattadern, Prozentual auf die gesamte Blattfläche berechnet. Werden Wildtyp Keimlinge der Linie Col-0 mit flg22 Elicitiert, so lässt sich eine Callosebildung von ca. 2% der Blattfläche anhand der Zunahme der Anilinblau gefärbten Calloseablagerungen ermitteln (Abb.16).

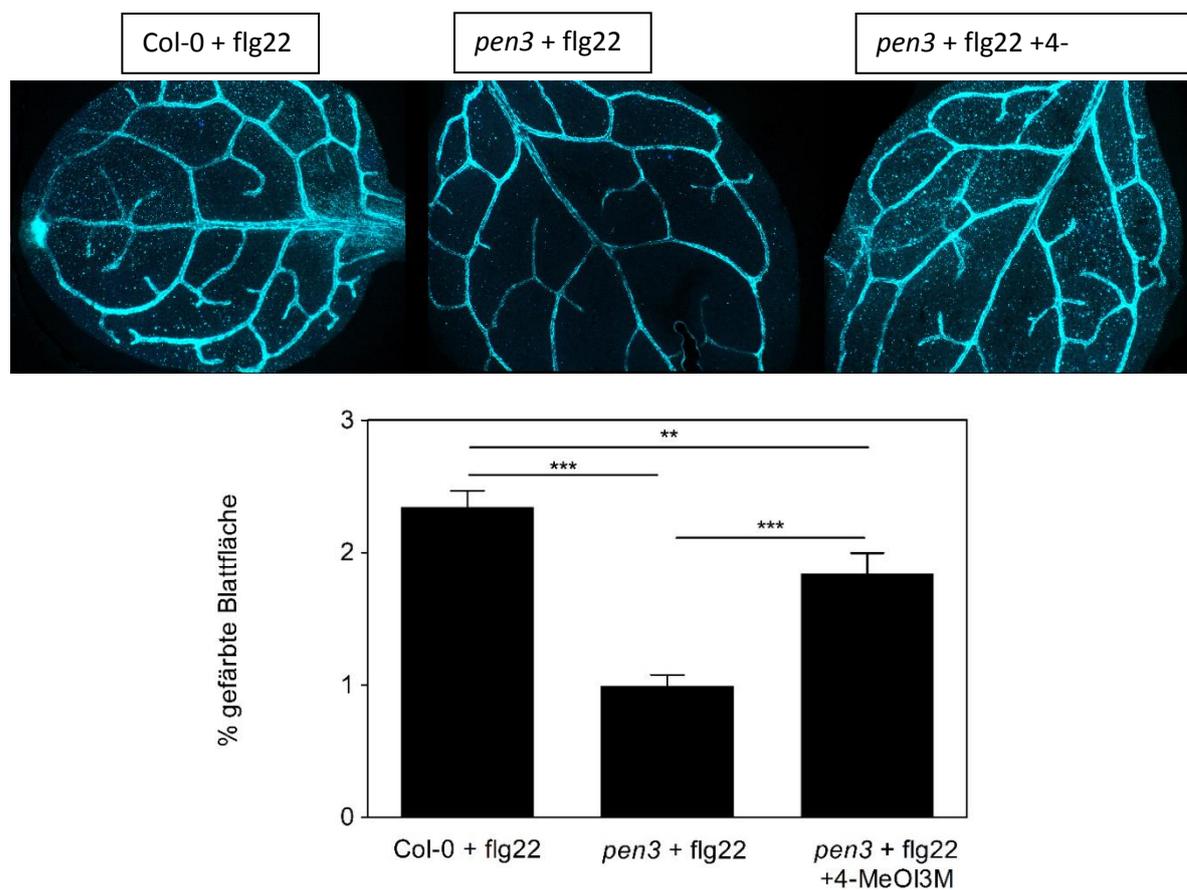


Abbildung 16: Prozentuale Callosebildung auf *A. thaliana* Blättern nach flg22 Elicitierung.

Anilinblau gefärbte Blätter von *A. thaliana* Keimlingen fotografiert mittels Fluoreszenzmikroskopie exemplarisch über dem Diagramm angeordnet. Quantifizierung der durch Anilinblau gefärbten Callose auf flg22 induzierten *A. thaliana* Keimlingen prozentual bezogen auf die Blattfläche abzüglich der Blattadern. Daten aus 3 unabhängigen Experimenten mit insgesamt $n \geq 82$. Statistische Auswertung erfolgte über einen zweiseitigen t-test p-Werte: $\leq 0,001 \rightarrow ***$; $\leq 0,01 \rightarrow **$; $\leq 0,05 \rightarrow *$.

Die Mutantenlinie *pen3* zeigt eine signifikant verringerte Callosebildung nach Elicitierung mit flg22. Dies deckt sich mit bereits publizierten Ergebnissen. Wird zu *pen3* neben flg22 auch 4-MeOI3M appliziert, kann eine teilweise, wenn auch nicht vollständige, Komplementierung beobachtet werden. Anhand dieser Daten, kann eine Rolle von 4-MeOI3M bei der Bildung von flg22 induzierter Callose in *A. thaliana* Keimlingen postuliert werden.

4. Diskussion

4.1 Die Synthese von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in *A. thaliana*

Die Vielzahl von Sekundärmetaboliten, deren Produktion als direkte Antwort auf die Erkennung von Pathogenen oder auch potentieller Gefahren erfolgt, unterstreicht deren Rolle in Abwehr- und Erkennungsprozessen. Die Beobachtung der verstärkten Zelltodreaktion auf *pen2* und *pen3* Mutanten wirft die Frage nach der Zusammensetzung und Funktion der in diesem Stoffwechselweg produzierter Metaboliten auf. Durch Inhibierung der Verstoffwechslung und des Transports von Indolglucosinolaten und den zugehörigen Abbauprodukten ist die Penetrationsresistenz von *A. thaliana* Pflanzen gegen *P. infestans* gebrochen. Dies führt zu einem häufigerem Auftreten von Zelltodreaktion, ausgelöst durch erfolgreiche Penetration. Als Sekundäreffekt wird erhöhte Akkumulation von Metaboliten anderer Stoffwechselwege in Penetrationsmutanten im Vergleich zum Wildtyp festgestellt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Sekundärmetaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in *P. infestans* Inokulationstropfen nach Inkubation auf adulten *A. thaliana* Blättern identifiziert. Die Akkumulation auf der Blattoberfläche ist abhängig von der Enzymaktivität der P450 Cytchrom Oxidase CYP79B2/B3, was auf eine Tryptophan abhängige Synthese hindeutet. Weiterhin wird CYP81F2 für die Methoxy-Funktion an der 4'Position am Indolring beider Verbindungen benötigt. Da für CYP81F2 die 4'Hydroxylierung des Indolrings an Indolglucosinolaten beschrieben wurde, liegt der Ursprung von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys vermutlich bei Indolglucosinolaten (Pfalz *et al.*, 2009). I3G und 4-MeOI3G können von PEN2 hydrolysiert werden (Bednarek *et al.*, 2009). 4-MeOI3G akkumuliert in *P. infestans* inokuliertem *pen2* Blattmaterial. Dies deutet auf Substratakkumulation durch Verlust der Enzymaktivität von PEN2 hin. In Inokulationstropfen die auf *pen2* inkubiert wurden, können 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys nicht detektiert werden was für PEN2 vermittelte Synthese der Metaboliten spricht. Demnach würde durch die Enzymaktivität von PEN2 aus 4-MeOI3G, 4-MeOI3-isothiocyanat, -thiocyanat oder -acetonitril synthetisiert werden (Bednarek *et al.*, 2011; Bednarek, 2012b). Das Metaboliten-Profil der PCS1-Mutante *cad1-3* gleicht dem von *pen2*. Auch hier akkumuliert 4-MeOI3G in *P. infestans* inokuliertem Blattmaterial und die Metaboliten 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys sind kaum detektierbar. Für *cad1-3* wurde ein ähnlicher Pen-Phänotyp wie für *pen2* beobachtet (Kühnlitz *et al.*, 2015). Interessanterweise kann der Schwermetallphänotyp von *cad1-3* mit einer Phytochelatinsynthese aus *Caenorhabditis elegans* komplementiert werden, der Pen-Phänotyp jedoch nicht. PCS von Pflanzen besitzen spezifisch neben der

Phytochelatin-Domäne auch noch eine Domäne unbekannter Funktion (Phytochelatin-C, DUF1984) die nicht in *C. elegans* PCS vorkommt. Diese Domäne könnte somit an der Synthese von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys beteiligt sein. So wäre es denkbar, dass zum Beispiel auf 4-MeOI3-isothiocyanat, Glutathion übertragen wird. PCS1 spaltet den Glycyl Rest aus Glutathion Konjugaten ab (Blum *et al.*, 2007) und würde eine ähnliche Rolle übernehmen wie bei der Synthese von I3MA und Raphanusamsäure (Bednarek *et al.*, 2009). Das Cysteinderivat 4-MeOI3Cys könnte so synthetisiert werden (Abb. 17).

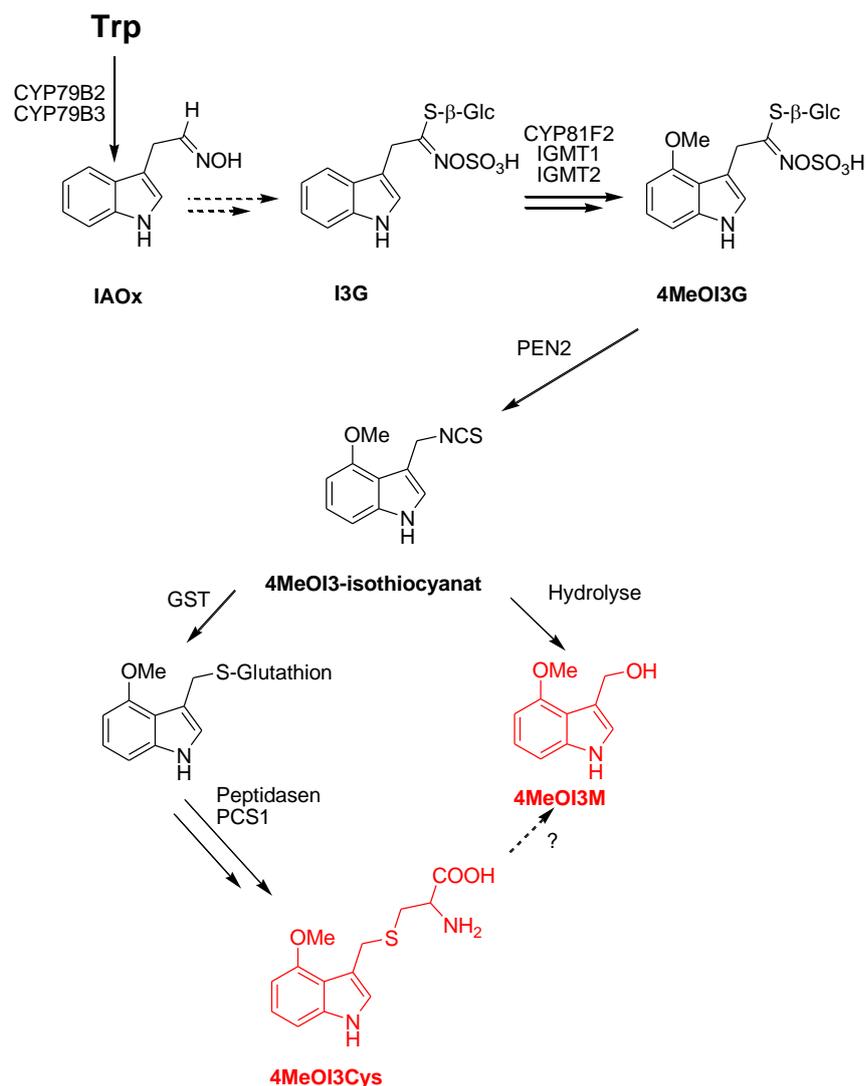


Abbildung 17: Vorgeschlagene Synthese von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys.

Beschreibung siehe Text.

4-MeOI3M könnte durch Hydrolyse von 4-MeOI3-isothiocyanat entstehen. Hier wäre es denkbar, dass reaktive Isothiocyanate oder Thiocyanate als Spaltprodukte der PEN2-Reaktion an die Zellperipherie transportiert werden und dort antimikrobielle Wirkung

entfalten (Xu *et al.*, 2016). Durch die hohe Reaktivität dieser Verbindungen könnten sie leicht in wässriger Lösung hydrolysieren. Jedoch wurde ein Transport von Isothiocyanaten oder Thiocyanaten bisher nicht gezeigt. Diese Verbindungen treten vor allem an Fraßstellen von Insekten auf. Durch die Zerstörung des Pflanzengewebes kommen die Vorstufen mit den Myrosinase zusammen und werden zu reaktiven und toxischen Verbindungen umgesetzt (Wittstock & Burow, 2010). Die räumliche Trennung der Reaktanten verhindert einen Abbau in intaktem Gewebe. Alternative Spaltung von Glucosinolaten wurde bereits am Beispiel von I3MA, das durch PEN2 aus I3G hervorgeht, gezeigt (Bednarek *et al.*, 2009). Die Möglichkeit, dass die toxischen und reaktiven Isothiocyanate von einem Transporter aktiv an die Stelle der versuchten Penetration transportiert werden, ist unwahrscheinlich. Zudem würde dies bedeuten, dass 4-MeOI3M unabhängig von PCS1 entstehen müsste. Das steht im Gegensatz zu der Beobachtung, dass der Verlust der PCS1 Enzymaktivität in *cad1-3* zu signifikant verringerter Akkumulation von 4-MeOI3M im Inokulationstropfen führt. Wahrscheinlich wird 4-MeOI3M stromabwärts von 4-MeOI3Cys synthetisiert. Ob die Umsetzung von 4-MeOI3Cys zu 4-MeOI3M intrazellulär oder extrazellulär geschieht, ist derzeit unklar.

4.2 PEN3-abhängiger Transport von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys

Die PEN3-abhängige Akkumulation von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in *P. infestans* Inokulationstropfen nach Inkubation auf *A. thaliana* Blättern könnte bedeuten, dass diese Metaboliten Substrate des ABC-Transporters sind. Ebenso könnte es sich auch um Derivate der PEN3 Substrate handeln, die nach Transport metabolisiert werden. In Experimenten mit *Bgh* inokuliertem Blattmaterial wurde 4-O- β -D-Glucosyl-indol-3-yl formamid (4GlcOI3F) PEN2 abhängig entdeckt (Lu *et al.*, 2015). Dies führte zu der Annahme, dass eine Vorstufe dieser Verbindung möglicherweise das PEN3 Substrat ist. Im Fall der Inokulation mit *P. infestans* wurde keine Akkumulation dieses Metaboliten beobachtet. Möglicherweise werden unterschiedliche Derivate von Sekundärmetaboliten auf unterschiedliche Stimuli produziert und sezerniert.

Der PEN3-abhängige Transport des bekannten PEN3-Substrates Indol-3-buttersäure (IBA) und des artifiziellen Auxin-Analogons 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D) in *A. thaliana* Mesophyll-Protoplasten (Ruzicka *et al.*, 2010) kann von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys inhibiert werden (Prof. Markus Geisler, Universität de Fribourg, Schweiz, pers. Mitteilung). Ein Mikrosomen-basiertes System wurde verwendet (Henrichs *et al.*, 2012), um zu klären, ob 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys als Substrate mit IBA und 2,4-D konkurrieren können. Hierfür wurde in *inside-out* Mikrosomen die PEN3-abhängige Beladung von radioaktiv markierter IBA und 2,4-D verfolgt. Die Zugabe von 4-MeOI3Cys in hohen Konzentrationen blockiert die schwache IBA Aufnahme in Wildtyp-Mikrosomen. In Mikrosomen, die aus *35S::PEN3* überexprimierenden Pflanzen hergestellt wurden, blockieren beide Metaboliten, 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys, die PEN3 vermittelte Aufnahme von IBA und 2,4-D in die Mikrosomen (Prof. Markus Geisler, Universität de Fribourg, Schweiz, pers. Mitteilung). Die Frage, ob es sich um eine kompetitive oder eine nicht-kompetitive, allosterische Inhibierung handelt bleibt derzeit unklar. Eine allosterische Inhibierung hat zumeist eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum und damit eine Inaktivierung des Transporters zur Folge, wie am Beispiel der Feedback-Inhibierung des Ammonium-Transporters AMT1 aus *A. thaliana* gezeigt (Lanquar *et al.*, 2009). Hier wird die Konformationsänderung durch eine C-terminale Phosphorylierung ausgelöst, die durch erhöhte Ammoniumlevel stimuliert wird. Die strukturelle Ähnlichkeit von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys zu den bekannten Substraten IBA und 2,4-D macht jedoch eine kompetitive Inhibierung wahrscheinlicher. Dies würde zudem die Hypothese stützen, dass es sich bei 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys um Substrate von PEN3 handelt. Weitere Experimente, den direkten Transport von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys durch PEN3 zu untersuchen, sind in Bearbeitung. Hierfür wurde 4-MeOI3M radioaktiv (mittels Tritium) markiert und soll in dem Mikrosomen-basierten Versuchsaufbau von Henrichs *et*

al. (2012) eingesetzt werden. Die Ergebnisse hierzu stehen jedoch zu diesem Zeitpunkt noch aus.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass eine Vorstufe von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys das PEN3 Substrat ist und die identifizierbaren Metaboliten durch extrazelluläre Enzyme oder durch spontanen Zerfall entstehen wie zum Beispiel antimikrobielle Tannine im Apoplasten (Gutzeit & Ludwig-Müller, 2014). 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys sind kaum in methanolischen Extrakten von *P. infestans* inokuliertem Blattmaterial detektierbar, was für diese Annahme sprechen würde. Eine andere Möglichkeit könnte die Bildung eines Multienzymkomplexes an der Stelle der versuchten Penetration sein. Solche Komplexe werden benötigt, um zu gewährleisten, dass Kreuzreaktionen reaktiver Zwischenprodukte vermieden werden (Sweetlove & Fernie, 2013). Bei der Bildung des cyanogenen Glycosids Dhurrin, das seinen Ursprung in der Aminosäure Tyrosin hat, wird ein Multienzymkomplex geformt. Drei membranständige Enzyme, die NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) - abhängige Cytochrom-P450 Oxidoreduktase (POR) und zwei Cytochrom P450 Enzyme (CYP79A1 und CYP71E1) aus *Sorghum bicolor* werden zur Synthese benötigt. Die lösliche UDP-Glucosyltransferase 85B1 (UGT85B1) ist an der Glycosylierung beteiligt (Laursen *et al.*, 2016). Hier wurde beobachtet, dass sich in artifiziellen Liposomen die Enzyme zusammenschließen und dabei auch die lösliche UGT85B1 benötigt wird, um einen funktionellen Komplex zu bilden. Auch für Isoflavonoide aus Sojabohnen wurde kürzlich ein Multienzymkomplex beschrieben, bei dem Enzyme, die auch in anderen Stoffwechselwegen involviert sind, an das endoplasmatische Retikulum lokalisiert werden, um spezifisch Isoflavone zu synthetisieren (Dastmalchi *et al.*, 2016).

PEN2 ist zum Teil an Mitochondrien lokalisiert, die an der Stelle der versuchten Penetration akkumulieren. CYP81F2 befindet sich auf der Oberfläche des endoplasmatischen Retikulums und während der Nichtwirtsinteraktion von *A. thaliana* und *Bgh* wurde die räumliche Nähe zu PEN2 gezeigt (Fuchs *et al.*, 2016). Auch PEN3 akkumuliert an der Stelle der versuchten Penetration (Stein *et al.*, 2006). So ist es denkbar, dass auch ein Multienzymkomplex aus Katalyseenzymen und dem Transporter PEN3 gebildet werden muss, um effektiven Transport von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys zu gewährleisten.

4.3 Funktionsanalyse von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys

Der beobachtete PEN-Phänotyp auf den *A. thaliana* Mutanten *cyp79b2/b3*, *pen2*, *pen3* und *cad1-3* korreliert mit der signifikant verringerten Menge an 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys im Inokulationstropfen. Auch in Inokulationstropfen, die auf *cyp81F2* inkubiert wurden, lassen sich signifikant verringerte Mengen dieser Metaboliten feststellen. Der PEN-Phänotyp kann hier jedoch nicht beobachtet werden. Die Mutante *cyp81F2* weist signifikant geringere Mengen an 4-MeOI3G im Blattmaterial auf und ist somit nur eingeschränkt in der Lage 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys in ausreichenden Mengen zu synthetisieren. Vielmehr lässt sich ein Anstieg an anderen Indolderivaten feststellen, die keine Modifizierung an der 4'Position am Indolring tragen. Vor allem I3MA wird signifikant erhöht im Inokulationstropfen und in methanolischen Blattextrakten detektiert, was mit einer Verschiebung der Synthese zu I3MA erklärt werden kann, wie am Beispiel der *cyp83A1* Mutante gezeigt, bei der die Glucosinolat-Biosynthese durch Verlust des P450 Enzyms CYP83A1 inhibiert ist. Hier kommt es zu einer verstärkten Akkumulation von Camalexin (Liu *et al.*, 2016).

In anderen Pathosystemen wird mehrheitlich von antimikrobieller Aktivität der PEN2 abhängigen Spaltprodukte von 4-MeOI3G ausgegangen (Stein *et al.*, 2006; Bednarek *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2016). Wie auch bei *p*-Coumaroylagmatin, was auf der Blattoberfläche von *P. infestans* inokuliertem Blattmaterial akkumuliert (Dobritzsch *et al.*, 2016), konnte kein antimikrobieller Effekt von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys gegen *P. infestans*-Myzelwachstum *in vitro* beobachtet werden. Bei den Metaboliten könnte es sich jedoch auch um Signalsubstanzen handeln die sich unterstützend auf die Reizperzeption auswirken und so das Signal verstärken, um eine stärkere Immunantwort zu generieren oder den Stimulus zu verlängern. Schließlich kann es sich bei den entdeckten Metaboliten auch um Abbauprodukte der eigentlich sezernierten Verbindungen mit potentieller antimikrobieller Aktivität handeln. Der Abbau könnte Pathogen-vermittelt oder durch oxidierende Bedingungen an der Oberfläche erfolgen. Schon 2009 wurde vermutet, dass es sich bei den Spaltprodukten von 4-MeOI3G um Signalmoleküle oder Mediatoren der Abwehrantwort handeln könnte (Clay *et al.*, 2009). Die Autoren zeigten, dass das PEN2-Spaltprodukt aus 4-MeOI3G für die flg22-induzierte Callosebildung in *A. thaliana* Keimlingen benötigt wird. Hier ist neben PEN2 und PEN3 auch PCS1 involviert. Im Gegensatz zur Antwort auf filamentöse Pathogene wie *Bgh* und *P. infestans* wird in den Penetrationsmutanten nach flg22-Behandlung keine Callose mehr gebildet. Die vermehrte Callosebildung nach Inokulation der Penetrationsmutanten mit *P. infestans* könnte jedoch auch mit einem sekundären Effekt zusammenhängen, da der Oomycet häufiger in der Lage ist erfolgreich zu penetrieren.

Papillen, die sich an der Stelle der versuchten Penetration bilden, bestehen hauptsächlich aus Callose (β -(1,3)-Glucan) und bilden wahrscheinlich physische Barrieren, die das penetrierende Pathogen am Eindringen hindern (Luna *et al.*, 2011; Voigt, 2014). Die Bestandteile von Papillen variieren zwischen verschiedenen Pflanzenspezies, doch die häufigsten sind neben Callose auch andere Zellwand-Polymere und Proteine. So wurde auch PEN3 in extrazellulären Papillen nach Elicitierung mit flg22 nachgewiesen (Underwood & Somerville, 2013). Welche Rolle PEN3 im Zusammenhang mit bakteriellen Pathogenen in extrazellulären Papillen einnimmt, ist dabei unklar. Für penetrierende, filamentöse Pathogene wurde bisher nur die Akkumulation an der Stelle der versuchten Penetration beobachtet (Stein *et al.*, 2006). Ob PEN3 auch hier in die Papille transportiert wird ist derzeit nicht bekannt.

Die transiente Erhöhung der Ca^{2+} Konzentrationen ausgelöst durch 4-MeOI3M in *A. thaliana* Keimlingen könnte ein Hinweis auf die mögliche Rolle dieser Verbindung als Modulator der Abwehrantwort sein. Auch wenn der beobachtete Effekt geringer im Vergleich zu dem DAMP PEP1 ausfällt, so ist er doch spezifisch für 4-MeOI3M. Dabei bleibt unklar, ob die Konzentration im Inokulationstropfen oder genauer an der Stelle der versuchten Penetration ausreicht, um einen Effekt *in vivo* zu erreichen, da man die genaue Konzentration dort nicht messen kann. In Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen konnte in höheren Konzentrationsbereichen keine Steigerung des Effekts beobachtet werden (siehe Anhang). Anstiege der Ca^{2+} -Konzentrationen können MAP-Kinase-Kaskaden aktivieren und so zur Abwehrantwort beitragen (Lee *et al.*, 2015). Jedoch wurde, im Gegensatz zur flg22 Kontrolle, keine Aktivierung von MPK3 und MPK6, die Anteil an der Abwehrantwort gegen einen Vielzahl von Stimuli haben, durch 4-MeOI3M festgestellt (L. Eschen-Lippold, IPB Halle, pers. Mitteilung). Daher handelt es sich wahrscheinlich nicht um einen klassischen Elicitor. Allerdings kann ein Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration auch direkten Einfluss auf die Abwehrmechanismen haben, die unabhängig von der Genaktivierung ablaufen, wie zum Beispiel auf die Stimulierung der ROS-Produktion (Lee *et al.*, 2015).

4-MeOI3M als Signalmolekül oder Modulator der Abwehrantwort könnte zur PAMP-induzierten Calloseablagerung beitragen. Die partielle Komplementierung des durch Clay *et al.* (2009) beschriebenen Callose-Phänotyps in Blättern von *pen3* Keimlingen nach flg22 lässt diese Vermutung zu. Durch Fütterungsexperimente der *cyp81F2* Mutante mit 4-MeOI3G konnte der Phänotyp bereits komplementiert werden (Clay *et al.*, 2009), jedoch nicht in Mutanten die stromabwärts von CYP81F2 für die Produktion PEN2-abhängiger Sekundärmetaboliten gelegen sind. Das bedeutet, dass die Metabolisierung von 4-MeOI3G für die flg22-induzierte Callosebildung notwendig ist. Die

Tatsache, dass 4-MeOI3M in *pen3* die flg22-abhängige Callosebildung zumindest partiell wieder herstellen kann, legt die Schlussfolgerung nahe, dass 4-MeOI3M die von Clay et al. (2009) postulierte Substanz ist.

Eine hypothetische Rolle von 4-MeOI3M bei der Bildung der Callose-haltigen Papillen als Antwort gegen filamentöse penetrierende Pathogene ist denkbar. So ist es möglich, dass durch Fehlen von 4-MeOI3M auf der Oberfläche oder an der Stelle der versuchten Penetration durch inhibierte Synthese oder Transport die Bildung von Papillen dereguliert wird. So kann das Pathogen besser die Zellwand penetrieren. Die penetrierten Zellen gehen daraufhin den programmierten Zelltod ein und können so zumindest hemibiotrophe und obligat biotrophe Pathogene wie *P. infestans* und *Bgh* an weiterer Ausbreitung hindern.

So ergibt sich folgende Modellvorstellung (Abb. 18): Werden adulte Blätter von *A. thaliana* Wildtyp-Pflanzen mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension inokuliert, enzystieren die Zoosporen auf der Blattoberfläche, bilden ein Appressorium und versuchen mittels Penetrationshyphae die Zellwand zu durchstoßen.

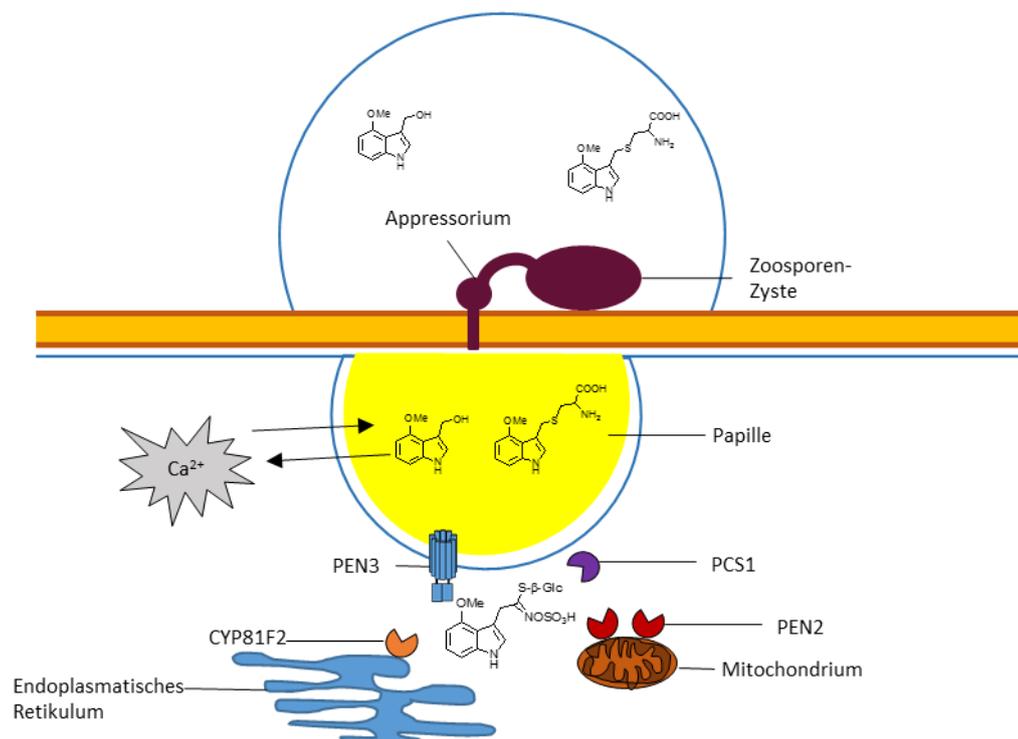


Abbildung 18: Modellvorstellung der Synthese und des Exports von 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys als Reaktion auf *P. infestans* Behandlung.

Abbildung nach Stein (2006), Bednarek (2012a) Fuchs (2016). Beschreibung siehe Text. Abbildung nicht Maßstabsgetreu.

Die Erkennung der versuchten Penetration verursacht auf Pflanzenseite die Aktivierung der Expression von Abwehrgenen. Als Folge daraus werden Sekundärmetaboliten

produziert und transportiert. Hier werden durch die PEN2 abhängige Hydrolyse von 4-MeOI3G und die Verstoffwechslung durch PCS1, 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys frei. Die Produkte werden wahrscheinlich direkt mittels PEN3 an die Stelle der versuchten Penetration sekretiert. Hierbei ist es möglich, dass sich Synthesenzyme und Transporter in einer Art Komplex organisieren. Durch 4-MeOI3M wird ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration verursacht, was zur Stimulierung der Papillenbildung führen könnte, um die Penetration zu unterdrücken. Sind diese Sekundärmetaboliten nicht präsent, kann es zu einer Deregulierung der Papillenbildung kommen, was zu einem erhöhten Penetrationserfolg von *P. infestans* führt.

4.4 Zusammenfassung

Die Nichtwirts-Interaktion zwischen *A. thaliana* und *P. infestans* ist bis heute nicht vollständig verstanden. PEN2 und PEN3 als Komponenten der präinvasiven Abwehr lassen sich dem Tryptophan-abhängigem Indolglucosinolat-Sekundärmetabolismus zuordnen, der u. a. durch Inokulation mit *P. infestans* aktiviert wird. Die Sekretion bzw. Akkumulation von Abwehrmetaboliten an der Stelle der versuchten Penetration scheint ein essentieller Bestandteil dieser Abwehr zu sein. Im Fall der erfolgreichen Penetration von *A. thaliana* Epidermiszellen auf Blättern, reagieren die Zellen mit einer HR-ähnlichen Zelltodreaktion. Bei Unterbrechung oder Inhibierung des PEN2/PEN3 Stoffwechselweges ist *P. infestans* viel häufiger in der Lage erfolgreich Epidermiszellen von *A. thaliana* Blättern zu penetrieren. Dies wirkt sich in vermehrter Zelltodreaktion in inokulierten Bereichen des Blattmaterials aus, was makroskopisch leicht erkennbar wird. Der hemibiotrophe Oomycet ist zu Beginn der Infektion auf lebendes Zellmaterial angewiesen und kann so in seiner Ausbreitung gestoppt werden. Die potentiellen PEN2-abhängigen Abwehrmetaboliten, die Anteil an dieser Interaktion haben, sind 4-Methoxyindol-3-methanol (4-MeOI3M) und 4-Methoxyindol-3-methylcystein (4-MeOI3Cys). Diese Substanzen wurden im Zuge dieser Arbeit als PEN2 und PEN3-abhängige Sekundärmetaboliten identifiziert die durch Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporensuspension extrazellulär akkumulieren. 4-MeOI3M und 4-MeOI3Cys sind wahrscheinlich Indolglucosinolat-Abbauprodukte. Die Synthese hängt dabei auch von CYP81F2 und PCS1 ab. Die Metaboliten werden vermutlich von dem ABC-Transporter PEN3 an die Stelle der versuchten Penetration transportiert. Eine antimikrobielle Wirkung *in vitro* wurde für diese Sekundärmetaboliten nicht festgestellt. 4-MeOI3M aber nicht 4-MeOI3Cys löst eine intrazelluläre Erhöhung der Ca^{2+} Ionen aus, was ein Hinweis auf eine Wirkung als Signalsubstanz oder Modulator der Abwehr sein könnte. 4-MeOI3M trägt zur flg22-induzierten Calloseablagerung in *A. thaliana* Keimlingen bei und könnte auch Anteil an der Induzierung der Papillenbildung gegen filamentöse Pathogene haben.

5. Literaturverzeichnis

Baldauf, S. L., A. J. Roger, I. Wenk-Siefert and W. F. Doolittle (2000). "A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data." Science **290**(5493): 972-977.

Bednarek, P. (2012a). "Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity." Curr Opin Plant Biol **15**(4): 407-414.

Bednarek, P. (2012b). "Sulfur-containing secondary metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with function in plant immunity." ChemBiochem **13**(13): 1846-1859.

Bednarek, P., M. Pislewska-Bednarek, A. Svatos, B. Schneider, J. Doubsky, M. Mansurova, M. Humphry, C. Consonni, R. Panstruga, A. Sanchez-Vallet, A. Molina and P. Schulze-Lefert (2009). "A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense." Science **323**(5910): 101-106.

Bednarek, P., M. Pislewska-Bednarek, E. Ver Loren van Themaat, R. K. Maddula, A. Svatos and P. Schulze-Lefert (2011). "Conservation and clade-specific diversification of pathogen-inducible tryptophan and indole glucosinolate metabolism in *Arabidopsis thaliana* relatives." New Phytol **192**(3): 713-726.

Blum, R., A. Beck, A. Korte, A. Stengel, T. Letzel, K. Lenzian and E. Grill (2007). "Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates." Plant J **49**(4): 740-749.

Böttcher, C., A. Chapman, F. Fellermeier, M. Choudhary, D. Scheel and E. Glawischnig (2014). "The Biosynthetic Pathway of Indole-3-Carbaldehyde and Indole-3-Carboxylic Acid Derivatives in *Arabidopsis*." Plant Physiol **165**(2): 841-853.

Böttcher, C., L. Westphal, C. Schmotz, E. Prade, D. Scheel and E. Glawischnig (2009). "The multifunctional enzyme CYP71B15 (PHYTOALEXIN DEFICIENT3) converts cysteine-indole-3-acetonitrile to camalexin in the indole-3-acetonitrile metabolic network of *Arabidopsis thaliana*." The Plant Cell **21**(6): 1830-1845.

Bowyer, P., B. R. Clarke, P. Lunness, M. J. Daniels and A. E. Osbourn (1995). "Host range of a plant pathogenic fungus determined by a saponin detoxifying enzyme." Science **267**(5196): 371-374.

Chalal, M., A. Klinguer, A. Echairi, P. Meunier, D. Vervandier-Fasseur and M. Adrian (2014). "Antimicrobial activity of resveratrol analogues." Molecules **19**(6): 7679-7688.

Chen, L. Q., B. H. Hou, S. Lalonde, H. Takanaga, M. L. Hartung, X. Q. Qu, W. J. Guo, J. G. Kim, W. Underwood, B. Chaudhuri, D. Chermak, G. Antony, F. F. White, S. C. Somerville, M. B. Mudgett and W. B. Frommer (2010). "Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens." Nature **468**(7323): 527-532.

Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.

- Clay, N. K., A. M. Adio, C. Denoux, G. Jander and F. M. Ausubel (2009). "Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response." Science **323**(5910): 95-101.
- Crouzet, J., T. Trombik, A. S. Fraysse and M. Boutry (2006). "Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family." FEBS Lett **580**(4): 1123-1130.
- Czechowski, T., M. Stitt, T. Altmann, M. K. Udvardi and W. R. Scheible (2005). "Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*." Plant Physiol **139**(1): 5-17.
- D'Auria, J. C. and J. Gershenzon (2005). "The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed." Curr Opin Plant Biol **8**(3): 308-316.
- Dangl, J. L. and J. D. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826-833.
- Dastmalchi, M., M. A. Bernards and S. Dhaubhadel (2016). "Twin anchors of the soybean isoflavonoid metabolon: evidence for tethering of the complex to the endoplasmic reticulum by IFS and C4H." Plant J **85**(6): 689-706.
- Dixon, R. A. (2001). "Natural products and plant disease resistance." Nature **411**(6839): 843-847.
- Dobritzsch, M., T. Lübken, L. Eschen-Lippold, K. Gorzolka, E. Blum, A. Matern, S. Marillonnet, C. Böttcher, B. Dräger and S. Rosahl (2016). "MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides." The Plant Cell **28**(2): 583-596.
- Eschen-Lippold, L., T. Draeger, A. Teichert, L. Wessjohann, B. Westermann, S. Rosahl and N. Arnold (2009). "Antioomycete activity of gamma-oxocrotonate fatty acids against *P. infestans*." J Agric Food Chem **57**(20): 9607-9612.
- Eschen-Lippold, L., R. Landgraf, U. Smolka, S. Schulze, M. Heilmann, I. Heilmann, G. Hause and S. Rosahl (2012). "Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression." New Phytol **193**(4): 985-996.
- Fu, Z. Q. and X. Dong (2013). "Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense." Annu Rev Plant Biol **64**: 839-863.
- Fuchs, R., M. Kopischke, C. Klapprodt, G. Hause, A. J. Meyer, M. Schwarzländer, M. D. Fricker and V. Lipka (2016). "Immobilized Subpopulations of Leaf Epidermal Mitochondria Mediate PENETRATION2-Dependent Pathogen Entry Control in *Arabidopsis*." Plant Cell **28**(1): 130-145.
- Geissler, K., L. Eschen-Lippold, K. Naumann, K. Schneeberger, D. Weigel, D. Scheel, S. Rosahl and L. Westphal (2015). "Mutations in the EDR1 Gene Alter the Response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora infestans* and the Bacterial PAMPs flg22 and elf18." Mol Plant Microbe Interact **28**(2): 122-133.

Glawischnig, E., B. G. Hansen, C. E. Olsen and B. A. Halkier (2004). "Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(21): 8245-8250.

Grubb, C. D., B. J. Zipp, J. Ludwig-Müller, M. N. Masuno, T. F. Molinski and S. Abel (2004). "*Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis." Plant J **40**(6): 893-908.

Gutzeit, H. O. and J. Ludwig-Müller (2014). Plant natural products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications, Wiley-Blackwell.

Haverkort, A. J., P. M. Boonekamp, R. Hutten, E. Jacobsen, L. A. P. Lotz, G. J. T. Kessel, J. H. Vossen and R. G. F. Visser (2016). "Durable Late Blight Resistance in Potato Through Dynamic Varieties Obtained by Cisgenesis: Scientific and Societal Advances in the DuRPh Project." Potato Research **59**(1): 35-66.

Henrichs, S., B. Wang, Y. Fukao, J. Zhu, L. Charrier, A. Bailly, S. C. Oehring, M. Linnert, M. Weiwad, A. Endler, P. Nanni, S. Pollmann, S. Mancuso, A. Schulz and M. Geisler (2012). "Regulation of ABCB1/PGP1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation." Embo j **31**(13): 2965-2980.

Holland, P. M., R. D. Abramson, R. Watson and D. H. Gelfand (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7276-7280.

Huitema, E., V. G. Vleeshouwers, D. M. Francis and S. Kamoun (2003). "Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*." Mol Plant Pathol **4**(6): 487-500.

Hull, A. K., R. Vij and J. L. Celenza (2000). "*Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(5): 2379-2384.

Jeworutzki, E., M. R. Roelfsema, U. Anschutz, E. Krol, J. T. Elzenga, G. Felix, T. Boller, R. Hedrich and D. Becker (2010). "Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels." Plant J **62**(3): 367-378.

Jones, J. D. and J. L. Dangl (2006). "The plant immune system." Nature **444**(7117): 323-329.

Judelson, H. S. and F. A. Blanco (2005). "The spores of *Phytophthora*: weapons of the plant destroyer." Nat Rev Microbiol **3**(1): 47-58.

Kamoun, S. (2001). "Nonhost resistance to *Phytophthora*: novel prospects for a classical problem." Curr Opin Plant Biol **4**(4): 295-300.

Kim, H. S., D. Desveaux, A. U. Singer, P. Patel, J. Sondek and J. L. Dangl (2005). "The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(18): 6496-6501.

- Klein, M., M. Reichelt, J. Gershenzon and J. Papenbrock (2006). "The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed." Febs j **273**(1): 122-136.
- Knight, M. R., A. K. Campbell, S. M. Smith and A. J. Trewavas (1991). "Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium." Nature **352**(6335): 524-526.
- Kobae, Y., T. Sekino, H. Yoshioka, T. Nakagawa, E. Martinoia and M. Maeshima (2006). "Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection." Plant Cell Physiol **47**(3): 309-318.
- Kopischke, M., L. Westphal, K. Schneeberger, R. Clark, S. Ossowski, V. Wewer, R. Fuchs, J. Landtag, G. Hause, P. Dormann, V. Lipka, D. Weigel, P. Schulze-Lefert, D. Scheel and S. Rosahl (2013). "Impaired sterol ester synthesis alters the response of *Arabidopsis thaliana* to *Phytophthora infestans*." Plant J **73**(3): 456-468.
- Kühnlenz, T., L. Westphal, H. Schmidt, D. Scheel and S. Clemens (2015). "Expression of *Caenorhabditis elegans* PCS in the AtPCS1-deficient *Arabidopsis thaliana cad1-3* mutant separates the metal tolerance and non-host resistance functions of phytochelatin synthases." Plant Cell Environ **38**(11): 2239-2247.
- Kunze, G., C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller and G. Felix (2004). "The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants." Plant Cell **16**(12): 3496-3507.
- Lanquar, V., D. Loque, F. Hormann, L. Yuan, A. Böhner, W. R. Engelsberger, S. Lalonde, W. X. Schulze, N. von Wiren and W. B. Frommer (2009). "Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*." Plant Cell **21**(11): 3610-3622.
- Laursen, T., J. Borch, C. Knudsen, K. Bavishi, F. Torta, H. J. Martens, D. Silvestro, N. S. Hatzakis, M. R. Wenk, T. R. Dafforn, C. E. Olsen, M. S. Motawia, B. Hamberger, B. L. Moller and J. E. Bassard (2016). "Characterization of a dynamic metabolon producing the defense compound dhurrin in sorghum." Science **354**(6314): 890-893.
- Lee, J., L. Eschen-Lippold, I. Lassowskat, C. Böttcher and D. Scheel (2015). "Cellular reprogramming through mitogen-activated protein kinases." Front Plant Sci **6**: 940.
- Lehmann, S., M. Serrano, F. L'Haridon, S. E. Tjamos and J. P. Metraux (2015). "Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens." Phytochemistry **112**: 54-62.
- Lipka, U., R. Fuchs and V. Lipka (2008). "*Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews." Curr Opin Plant Biol **11**(4): 404-411.
- Lipka, V., J. Dittgen, P. Bednarek, R. Bhat, M. Wiermer, M. Stein, J. Landtag, W. Brandt, S. Rosahl, D. Scheel, F. Llorente, A. Molina, J. Parker, S. Somerville and P. Schulze-Lefert (2005). "Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*." Science **310**(5751): 1180-1183.

- Lipka, V., C. Kwon and R. Panstruga (2007). "SNARE-ware: the role of SNARE-domain proteins in plant biology." Annu Rev Cell Dev Biol **23**: 147-174.
- Liu, S., L. M. Bartnikas, S. M. Volko, F. M. Ausubel and D. Tang (2016). "Mutation of the Glucosinolate Biosynthesis Enzyme Cytochrome P450 83A1 Monooxygenase Increases Camalexin Accumulation and Powdery Mildew Resistance." Front Plant Sci **7**.
- Liu, T., Z. Liu, C. Song, Y. Hu, Z. Han, J. She, F. Fan, J. Wang, C. Jin, J. Chang, J. M. Zhou and J. Chai (2012). "Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor." Science **336**(6085): 1160-1164.
- Lu, X., J. Dittgen, M. Pislewska-Bednarek, A. Molina, B. Schneider, A. Svatos, J. Doubtsky, K. Schneeberger, D. Weigel, P. Bednarek and P. Schulze-Lefert (2015). "Mutant Allele-Specific Uncoupling of PENETRATION3 Functions Reveals Engagement of the ATP-Binding Cassette Transporter in Distinct Tryptophan Metabolic Pathways." Plant Physiol **168**(3): 814-827.
- Luna, E., V. Pastor, J. Robert, V. Flors, B. Mauch-Mani and J. Ton (2011). "Callose deposition: a multifaceted plant defense response." Mol Plant Microbe Interact **24**(2): 183-193.
- Mackey, D., B. F. Holt, 3rd, A. Wiig and J. L. Dangl (2002). "RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*." Cell **108**(6): 743-754.
- Mikkelsen, M. D., P. Naur and B. A. Halkier (2004). "*Arabidopsis* mutants in the C-S lyase of glucosinolate biosynthesis establish a critical role for indole-3-acetaldoxime in auxin homeostasis." Plant J **37**(5): 770-777.
- Nafisi, M., S. Goregaoker, C. J. Botanga, E. Glawischnig, C. E. Olsen, B. A. Halkier and J. Glazebrook (2007). "*Arabidopsis* cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis." Plant Cell **19**(6): 2039-2052.
- Nürnberg, T. and V. Lipka (2005). "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon." Mol Plant Pathol **6**(3): 335-345.
- Pfalz, M., H. Vogel and J. Kroymann (2009). "The gene controlling the indole glucosinolate modifier1 quantitative trait locus alters indole glucosinolate structures and aphid resistance in *Arabidopsis*." Plant Cell **21**(3): 985-999.
- Piotrowski, M., A. Schemenewitz, A. Lopukhina, A. Muller, T. Janowitz, E. W. Weiler and C. Oecking (2004). "Desulfoglucosinolate sulfotransferases from *Arabidopsis thaliana* catalyze the final step in the biosynthesis of the glucosinolate core structure." J Biol Chem **279**(49): 50717-50725.
- R-Development-Core-Team. (2008). "R: A language and environment for statistical computing.", from <http://www.R-project.org>.

- Ranf, S., J. Grimmer, Y. Poschl, P. Pecher, D. Chinchilla, D. Scheel and J. Lee (2012). "Defense-related calcium signaling mutants uncovered via a quantitative high-throughput screen in *Arabidopsis thaliana*." Mol Plant **5**(1): 115-130.
- Romeis, T. (2001). "Protein kinases in the plant defence response." Curr Opin Plant Biol **4**(5): 407-414.
- Ruzicka, K., L. C. Strader, A. Bailly, H. Yang, J. Blakeslee, L. Langowski, E. Nejedla, H. Fujita, H. Itoh, K. Syono, J. Hejatko, W. M. Gray, E. Martinoia, M. Geisler, B. Bartel, A. S. Murphy and J. Friml (2010). "*Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(23): 10749-10753.
- Schindelin, J., I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak and A. Cardona (2012). "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis." Nat Methods **9**(7): 676-682.
- Schmittgen, T. D. and K. J. Livak (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc **3**(6): 1101-1108.
- Schuhegger, R., T. Rauhut and E. Glawischnig (2007). "Regulatory variability of camalexin biosynthesis." J Plant Physiol **164**(5): 636-644.
- Schulze-Lefert, P. and R. Panstruga (2011). "A molecular evolutionary concept connecting nonhost resistance, pathogen host range, and pathogen speciation." Trends Plant Sci **16**(3): 117-125.
- Si-Ammour, A., B. Mauch-Mani and F. Mauch (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**(4): 237-248.
- Silipo, A., A. Molinaro, L. Sturiale, J. M. Dow, G. Erbs, R. Lanzetta, M. A. Newman and M. Parrilli (2005). "The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*." J Biol Chem **280**(39): 33660-33668.
- Stein, M., J. Dittgen, C. Sanchez-Rodriguez, B. H. Hou, A. Molina, P. Schulze-Lefert, V. Lipka and S. Somerville (2006). "*Arabidopsis* PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration." Plant Cell **18**(3): 731-746.
- Strehmel, N., C. Böttcher, S. Schmidt and D. Scheel (2014). "Profiling of secondary metabolites in root exudates of *Arabidopsis thaliana*." Phytochemistry **108**: 35-46.
- Sweetlove, L. J. and A. R. Fernie (2013). "The spatial organization of metabolism within the plant cell." Annu Rev Plant Biol **64**: 723-746.
- Underwood, W. and S. C. Somerville (2013). "Perception of conserved pathogen elicitors at the plasma membrane leads to relocalization of the *Arabidopsis* PEN3 transporter." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(30): 12492-12497.

VanEtten, H. D., J. W. Mansfield, J. A. Bailey and E. E. Farmer (1994). "Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins"." Plant Cell **6**(9): 1191-1192.

Voigt, C. A. (2014). "Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae." Front Plant Sci **5**: 168.

Weigel, D. and J. Glazebrook (2002). Arabidopsis: A Laboratory Manual, CSHL Press.

Westphal, L., D. Scheel and S. Rosahl (2008). "The *coi1-16* mutant harbors a second site mutation rendering PEN2 nonfunctional." Plant Cell **20**(4): 824-826.

Wittstock, U. and M. Burow (2010). "Glucosinolate Breakdown in *Arabidopsis*: Mechanism, Regulation and Biological Significance." Arabidopsis Book **8**.

Xu, J., J. Meng, X. Meng, Y. Zhao, J. Liu, T. Sun, Q. Wang and S. Zhang (2016). "Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in *Arabidopsis* Immunity." Plant Cell **28**(5): 1144-1162.

Yamada, K., K. Yamaguchi, T. Shirakawa, H. Nakagami, A. Mine, K. Ishikawa, M. Fujiwara, M. Narusaka, Y. Narusaka, K. Ichimura, Y. Kobayashi, H. Matsui, Y. Nomura, M. Nomoto, Y. Tada, Y. Fukao, T. Fukamizo, K. Tsuda, K. Shirasu, N. Shibuya and T. Kawasaki (2016). "The *Arabidopsis* CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation." Embo j.

Zhou, N., T. L. Tootle and J. Glazebrook (1999). "*Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase." Plant Cell **11**(12): 2419-2428.

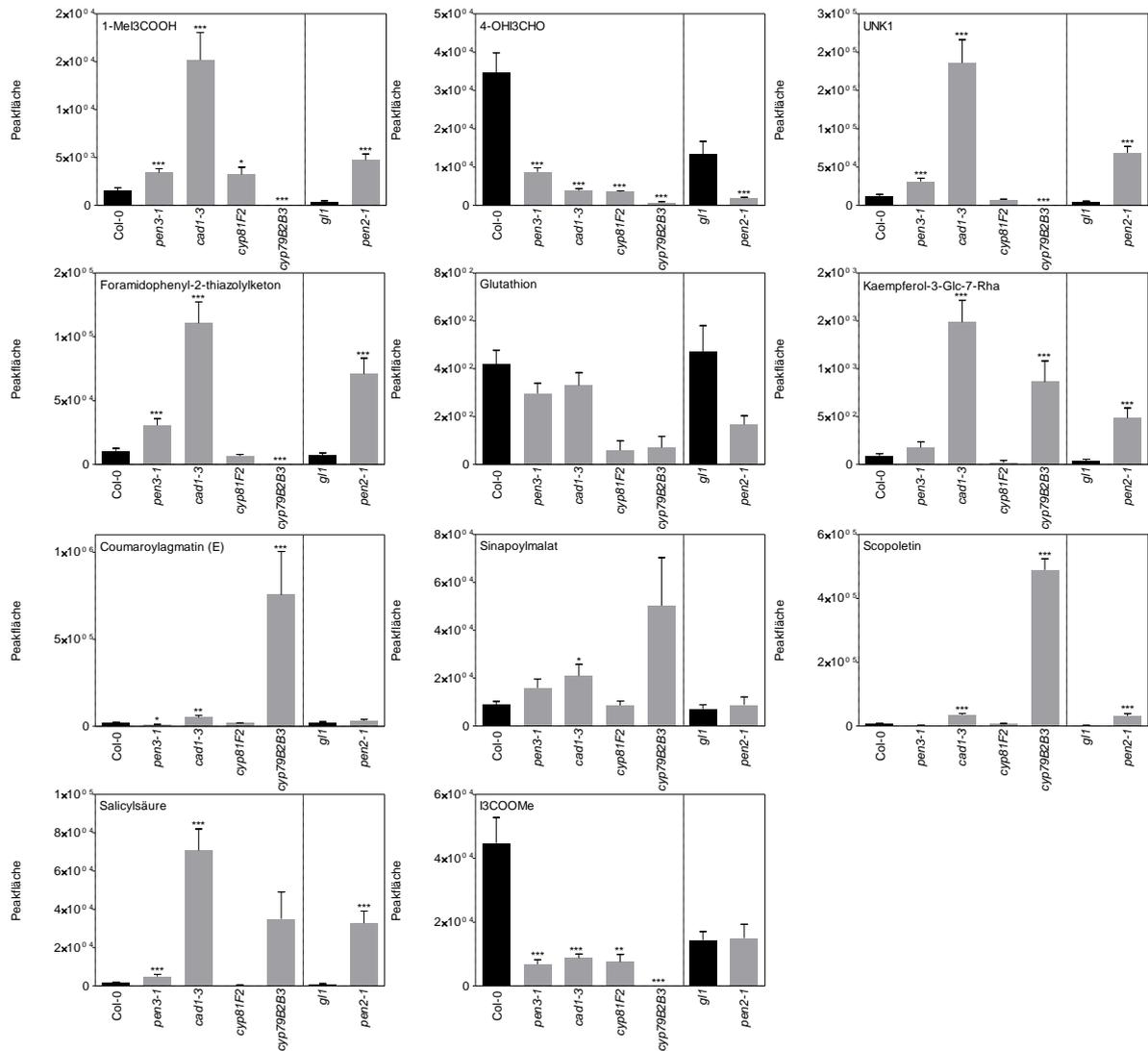
Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E. J. Oakeley, J. D. Jones, G. Felix and T. Boller (2004). "Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception." Nature **428**(6984): 764-767.

6. Anhang

6.1 Quantifizierung von Sekundärmetaboliten in Inokulationstropfen und methanolischen Blattextrakten

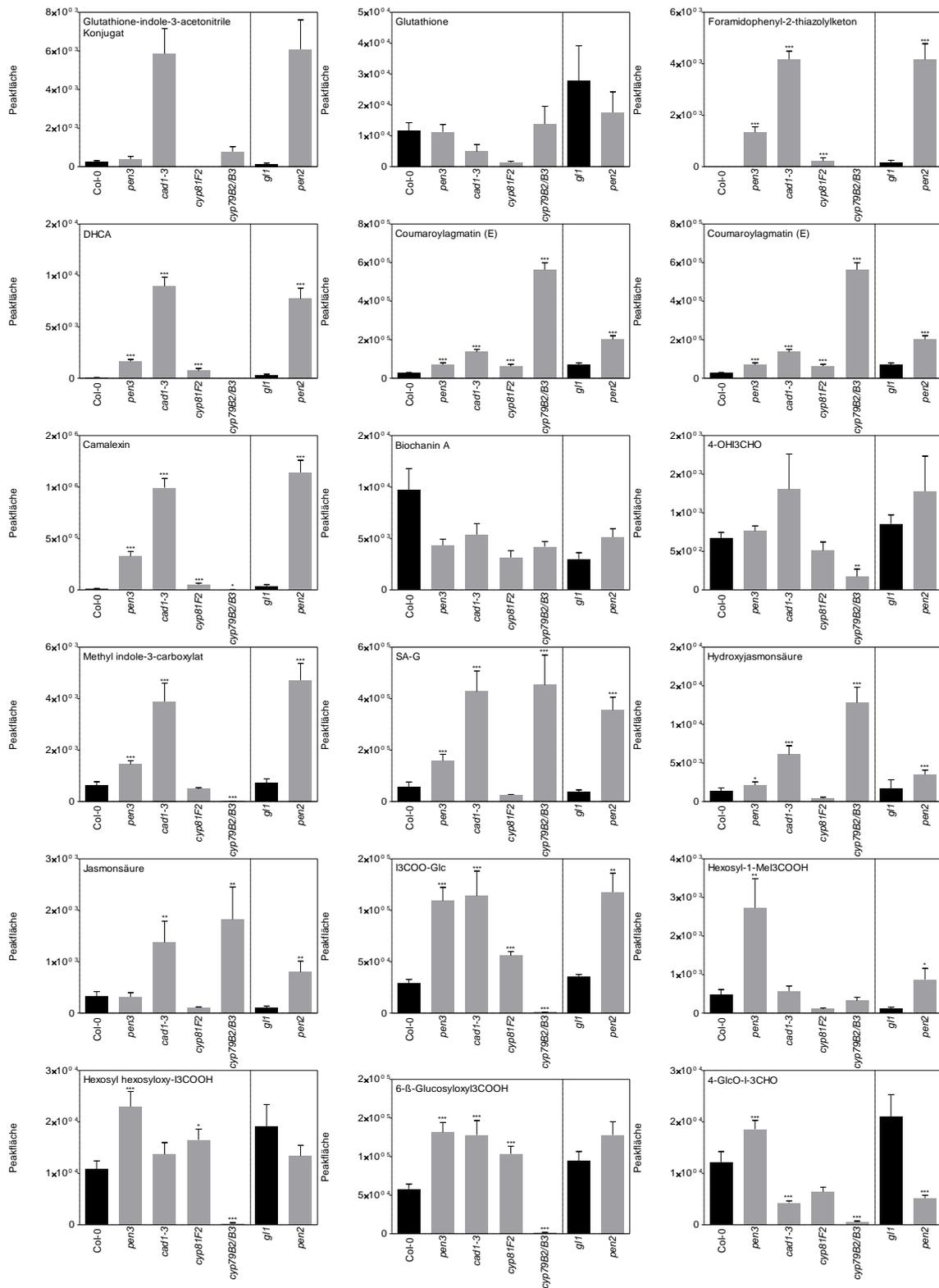
Anhang Tabelle 1: Analyse Daten von Verbindungen die mittels UPLC/ESI-QToF MS in methanolischen Blattextrakten von *P. infestans* inokuliertem *A. thaliana* Blattmaterial detektiert und quantifiziert wurden.

Name	Ret. Zeit [min]	Ion zur Quantifizierung	
		pos m/z	neg. m/z
Hydroxycamalexin #1 O-Hex	3.85	379.10	
Hydroxycamalexin #2 O-Hex	4.663	379.1	
Hydroxycamalexin #2 O-Hex	5.18	299.18	
IAA-Val(int. Standard)	6.27	299.18	273.125
Kinetin	3.1	216.08	214.07
β -Glucosyl-indole-3-carboxylate	3.55	322.09	
1-Methoxy-indol-3-ylmethyl glucosinolate	4.25		477.06
4-GlcO-Indol-3-CHO	2.61		322.09
4-Methoxy-indol-3-ylmethyl glucosinolate	3.6		477.06
6- β -Glucosyloxy-indole-3-carboxylic acid	1.72		338.08
Biochanin A	8.8		283.07
Hexosyl hexosyloxy-indole-3-carboxylate	1		500.14-
Hexosyl-1-methyl-indole-3-carboxylate	6.27		382.11
Indol-3-COO-Glc	3.8		322.09
Indol-3-ylmethyl glucosinolate	2.86		447.05
OH-JA	4		255.11
Raphanusamsäure	1.26		161.96
SA-Glycosid	2.92		299.08



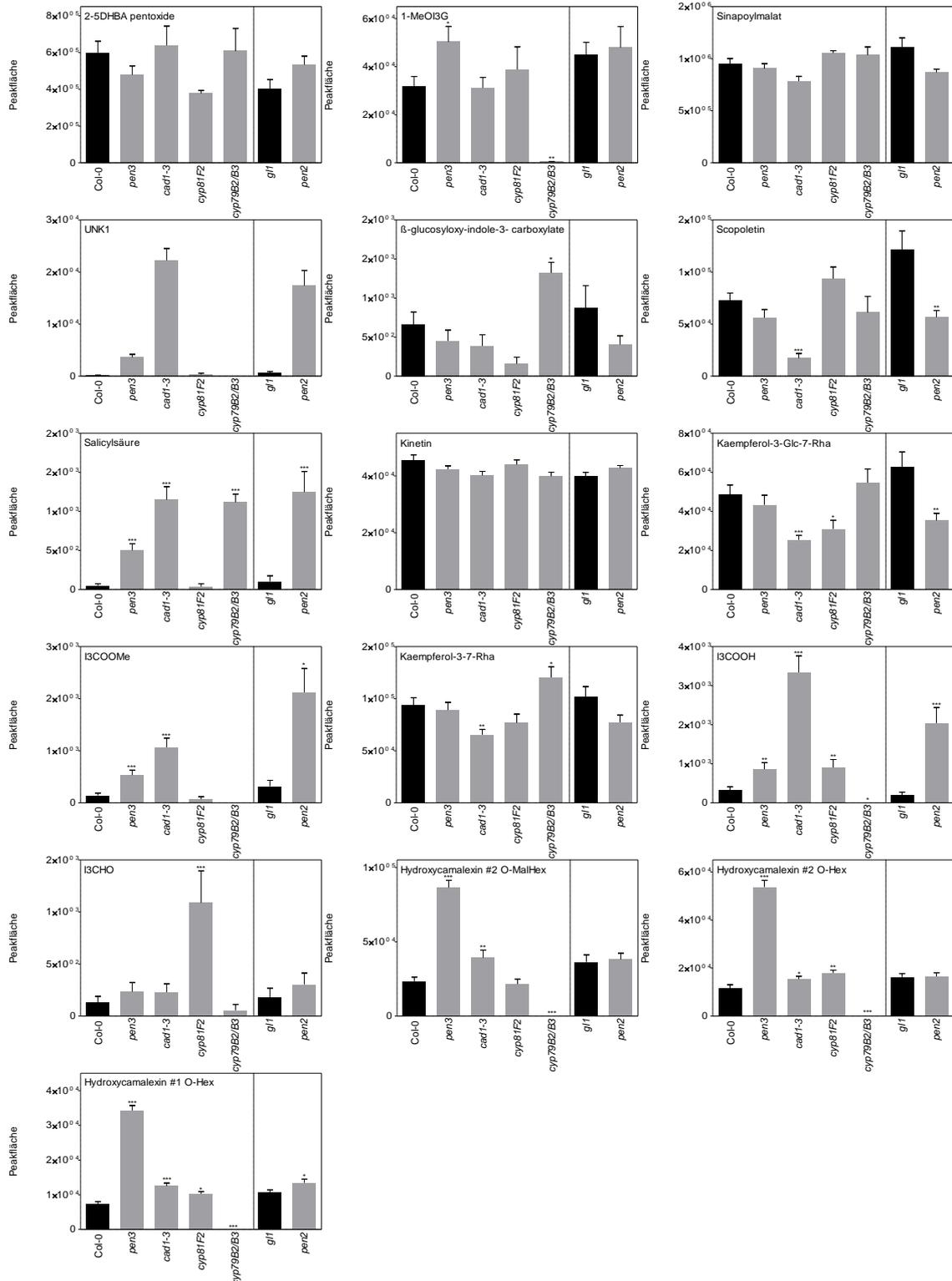
Anhang 1: Quantifizierung weiterer Metaboliten in Inokulationstropfen.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. *p*-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.



Anhang 2: Quantifizierung weiterer Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.

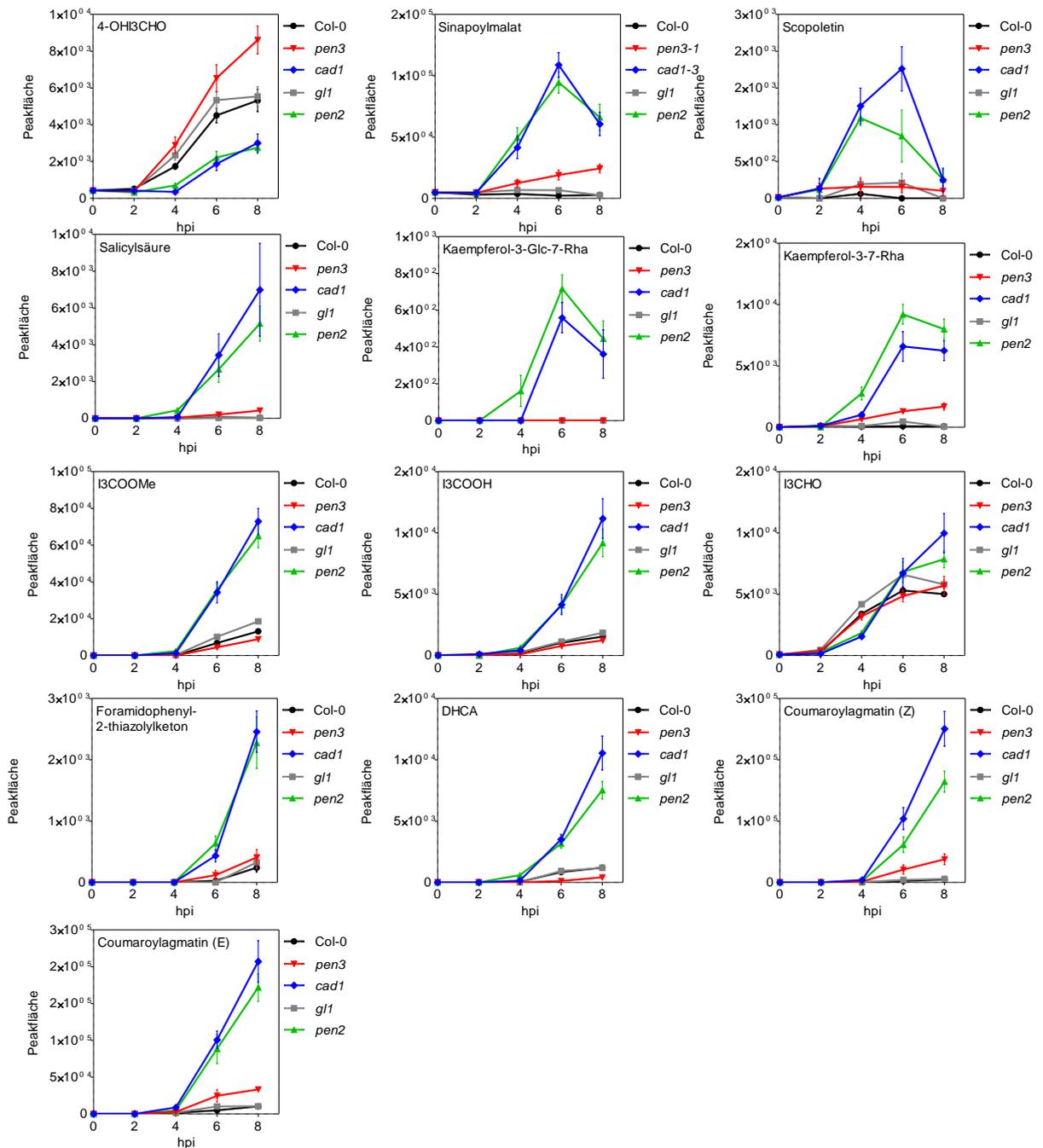
Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension (5×10^5 Sporen/mL) unter Einbeziehung der m/z und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***, $\leq 0,01$ **, $\leq 0,05$ *.



Anhang 3 Quantifizierung weiterer Metaboliten in methanolischen Blattextrakten.

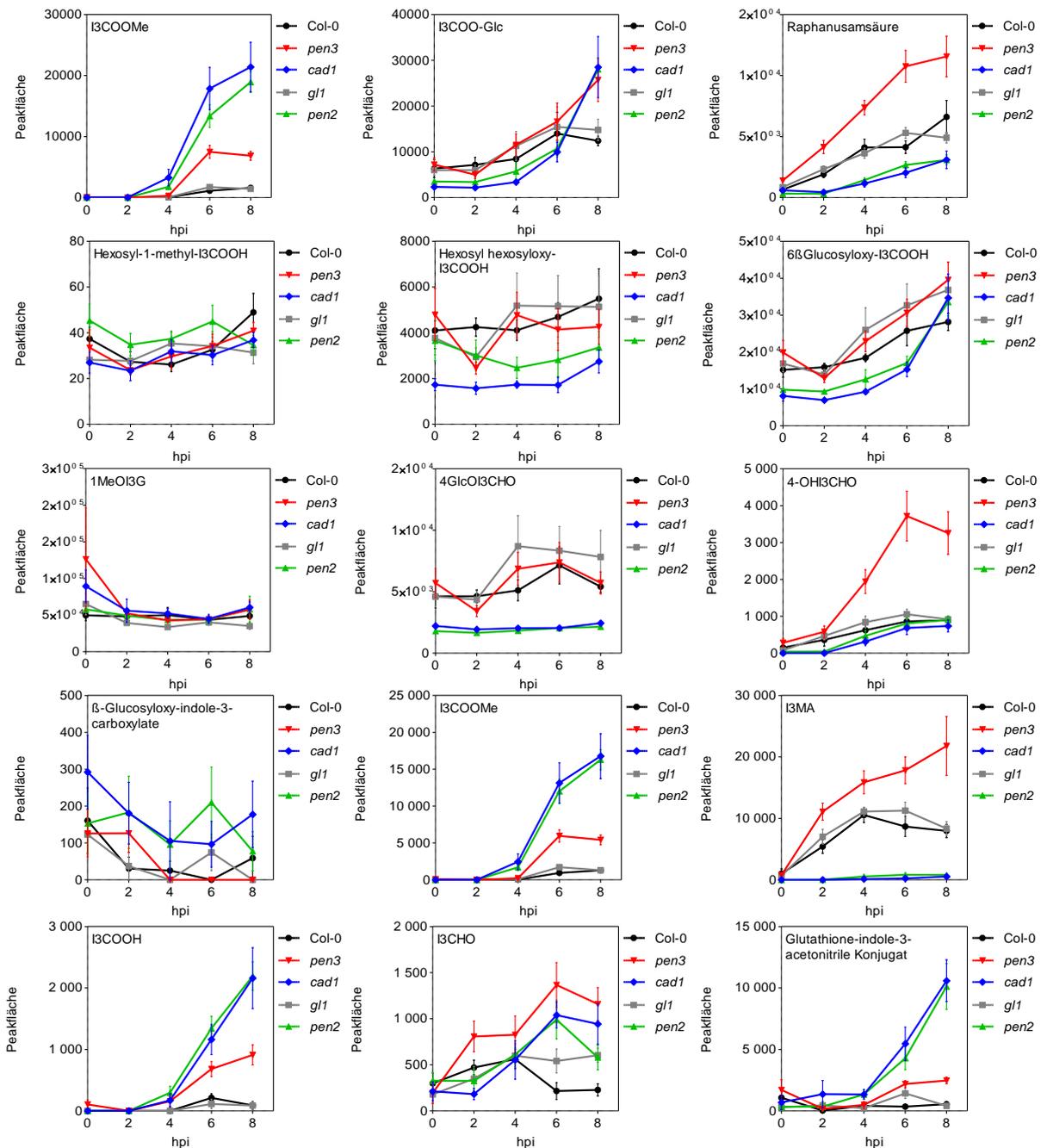
Quantifizierung mittels Massenspektrometrie über die Peakfläche in Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension (5×10^5 Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1), berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Wildtyp Col-0 und *gl1* schwarz; Die Mutanten *pen3-1*, *cad1-3*, *cyp81F2*, *cyp79B2/B3* und *pen2* grau. Daten aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels Mann Whitney Test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***, $\leq 0,01$ **, $\leq 0,05$ *.

6.2 Zeitverlaufs-Kinetiken von Sekundärmetaboliten in Inokulationstropfen und methanolischen Blattextrakten



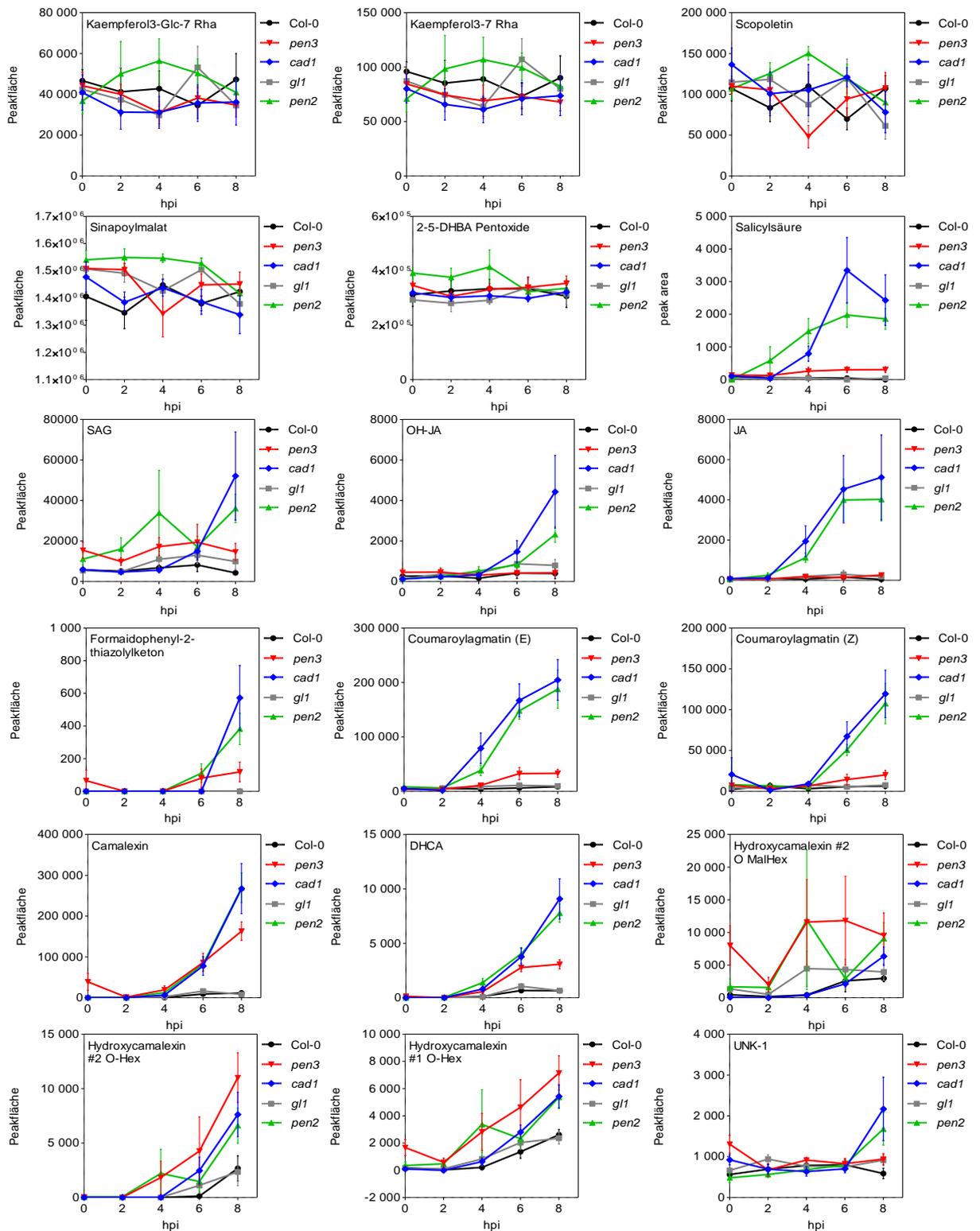
Anhang 4: Quantifizierung von Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen über die Zeit.

Quantifizierung mittels Massenspektrometrie von weiteren Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension (5×10^5 Sporen/mL) unter Einbeziehung der m/z und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1) über die Peakfläche, berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Wildtyp Col-0 schwarz und *gl1* grau; Die Mutanten *pen3-1* rot, *cad1-3* blau und *pen2* grün. Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem T-test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.



Anhang 5 Quantifizierung von Sekundärmetaboliten in methanolischen Blattextrakten über die Zeit.

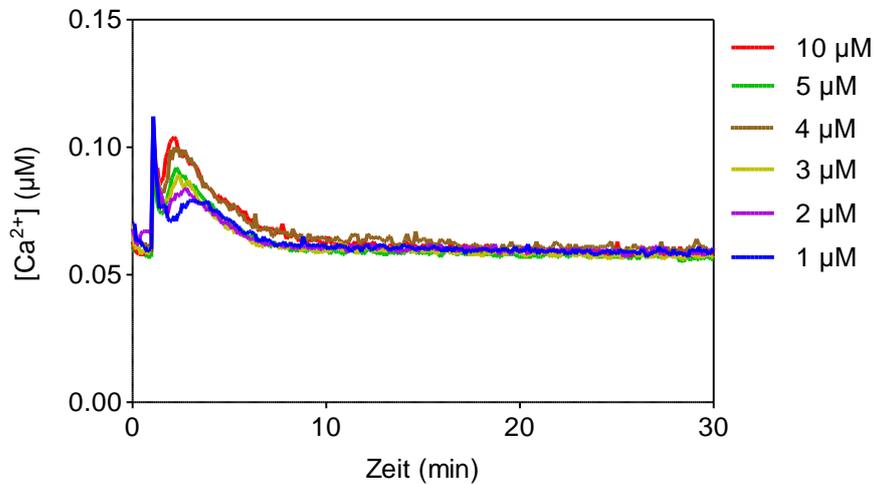
Quantifizierung mittels Massenspektrometrie von weiteren Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension (5×10^5 Sporen/mL) unter Einbeziehung der m/z und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1) über die Peakfläche, berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Wildtyp Col-0 schwarz und *gl1* grau; Die Mutanten *pen3-1* rot, *cad1-3* blau und *pen2* grün. Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem T-test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.



Anhang 6: Quantifizierung von Sekundärmetaboliten in methanolischen Blattextrakten über die Zeit.

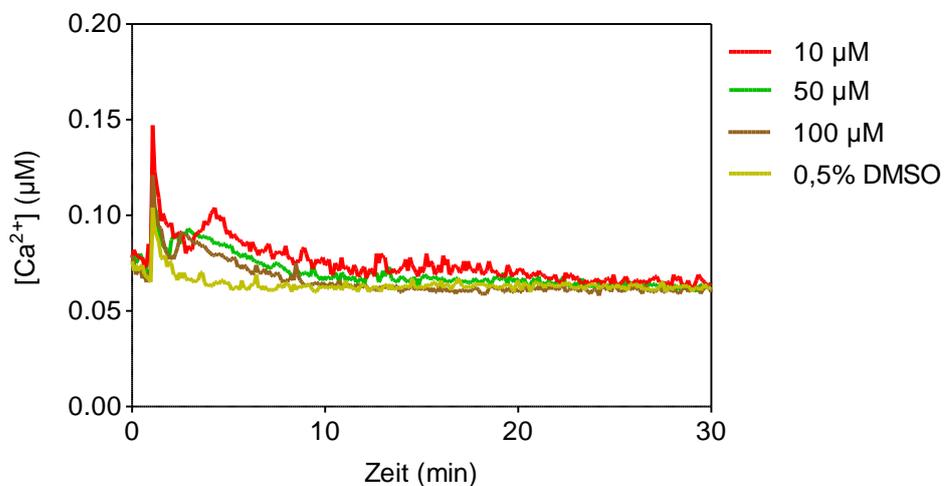
Quantifizierung mittels Massenspektrometrie von weiteren Sekundärmetaboliten im Inokulationstropfen 24 h nach Inokulation mit einer *P. infestans* Zoosporen Suspension ($5 \cdot 10^5$ Sporen/mL) unter Einbeziehung der *m/z* und Retentionszeiten (Tabelle 2, Tabelle 3 und Anhang Tabelle 1) über die Peakfläche, berechnet mit QuantAnalysis 2.2 (Bruker Daltonik 2014). Daten aus 3 unabhängigen Experimenten. Wildtyp Col-0 schwarz und *gl1* grau; Die Mutanten *pen3-1* rot, *cad1-3* blau und *pen2* grün. Daten aus drei unabhängigen Experimenten. Statistische Auswertung erfolgte mittels zweiseitigem T-test. p-Werte: $\leq 0,001$ ***; $\leq 0,01$ ** $\leq 0,05$ *.

6.3 Konzentrationsabhängigkeit der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte durch 4-MeI3M



Anhang 7 Analyse der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte .

Anstieg der cytosolischen Calcium Gehalte in transgenen *pMAQ2 A. thaliana* Keimlingen nach Behandlung mit 4-MeOI3M in den Konzentrationen 10 µM, 5,µM, 4 µM, 3 µM, 2 µM und 1 µM. Gemessen mittels Varioscan Flash (Thermo Fischer Scientific)



Anhang 8 Analyse der transienten Erhöhung der cytosolischen Calcium Gehalte..

Anstieg der cytosolischen Calcium Gehalte in transgenen *pMAQ2 A. thaliana* Keimlingen nach Behandlung mit 4-MeOI3M in den Konzentrationen 10 µM, 50,µM, 100 µM und der DMSO Kontrolle. Gemessen mittels Varioscan Flash (Thermo Fischer Scientific)

6.4 R-Skript

```
#####
rm(list = ls())
gc()
#####
## starting xcms
library(xcms)
#wurzelverzeichnis der daten benennen
setwd("/vol/.../order1','order2',...")
lpath <- c("order1','order2',...")
#####
# File-Liste erstellen
files <- list.files(lpath,full.names = T)
#####
## Parameter für Peakerkennung
#snthr=3
xset <- xcmsSet(files=files, method='centwave',prefilter=c(3,100),snthr=3,verbose.columns=T,ppm=25,scanrange=c(50,1900),peakwidth=c(5,12))
# snthr Signal to Noise Ratio
# ppm <- Massengenauigkeit
# peakwidth <- chromatographische Peakbreite in Sekunden
# scanrange <- hier kann man unwichtige Bereiche abschneiden ! Angabe in Scans nicht in Sekunden!
# 3 scans pro sekunde
# prefilter=c(a,b) <- Prefilter schritt für die erste phase der Peakerkennung. Masse spur wird nur behalten wenn mindestens Peaks mit der Intensität= b existieren
#####
# Zwischenspeichern/Laden des Profils ###
file='filename' # Namen des Files hier angeben
save(xset,file=file)
load(file)
#####
# Alignment (rt-korrektur) #
#####
## 1. Runde # gruppieren
xset_group1 <- group(xset, minfrac = 0.25, bw = 2, mzwid = 0.05, max=50)
# Retentionszeit korrigieren
xset_retcor1 <- retcor(xset_group1, plottype = "mdevden", span = 1, missing = 0, extra = 0)
## 2. Runde # gruppieren
xset_group2 <- group(xset_retcor1, minfrac = 0.5, bw = 15, mzwid = 0.05, max = 20)
# Retentionszeit korrigieren
xset_retcor2 <- retcor(xset_group2, plottype = "mdevden", span = 0.6, missing = 0, extra = 0)
## 3. Runde # gruppieren
xset_group3 <- group(xset_retcor2, minfrac = 0.75, bw = 20, mzwid = 0.025, max = 20)
# Retentionszeit korrigieren
xset_retcor3 <- retcor(xset_group3, plottype = "mdevden", span = 0.5, missing = 0, extra = 0)
##
xset_final <- group(xset_retcor3, minfrac = 0.75, bw = 10, mzwid = 0.040, max = 25)
#####
# minfrac <- minimaler Anteil an samples pro Gruppe, in der der Peak auftauchen muss, damit der Peak als gültiger Peak erkannt wird. = 0 immer = 1 nur, wenn in allen samples der Gruppe
# bw <- bandwidth (standard deviation or half width at half maximum) of gaussian smoothing kernel to apply to the peak density chromatogram
# mzwid <- width of overlapping m/z slices to use for creating peak density chromatograms and grouping peaks across samples
# max <- maximum number of groups to identify in a single m/z slice
#####
### fehlende Peaks auffüllen ###
#####
# -xset_filled <- fillpeaks(xset_final)
# optional
### Ausgabe als peaktabelle ###
#####
peaktable <- function(xs)
{
  if (nrow(xs@groups) > 0) {
    groupmat <- groups(xs)
    ts <- data.frame(cbind(groupmat, groupval(xs, "medret",
      "into")), row.names = NULL)
    cnames <- colnames(ts)
    if (cnames[1] == "mmed")
      cnames[1] <- "mz"
    else stop("peak information !?")
    if (cnames[4] == "rtmed")
      cnames[4] <- "rt"
    else stop("peak information !?")
    colnames(ts) <- cnames
  }
  else if (length(xs@samnames) == 1)
    ts <- xs@peaks
  else stop("First argument must be a xcmsSet with group information or contain only one sample.")
  ts
}

result<-peaktable(xset_final)
write.csv(result,file="filename.csv",row.names=F)
#####
```

Anhang 9: Verwendetes R-Skript zur ungerichteten Metabolitenanalyse.

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei meiner Betreuerin Prof. Dr. Sabine Rosahl für die wunderbare Doktorandenzeit bedanken. Ich werde die ausführlichen wissenschaftlichen Diskussionen, die harmonische Zusammenarbeit und auch die privaten Gespräche in guter Erinnerung behalten. Danke für die Geduld und den Enthusiasmus, der mir immer wieder auf die Beine geholfen hat.

Meinem Betreuer Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an diesem tollen Thema anzufertigen. Die Unterstützung auch in schwierigen Phasen der Arbeit hat mir sehr geholfen.

Großer Dank gilt Dr. Christoph Böttcher, der mir den entscheidenden Strohalm gereicht hat.

Prof. Dr. Bernhard Westermann und Angela Schaks für den Exkurs in die Organische Chemie und die Hilfe bei der Synthese der Metaboliten.

Dr. Lennart Eschen-Lippold danke ich für die Hilfe im Labor, die TEY-Westernblot-Analyse und die gelegentlichen Angelausflüge. Fabian danke ich für die Hilfe bei der Calciumanalyse.

Der Arbeitsgruppe „Induzierte Pathogenabwehr“ danke ich für das gute Arbeitsklima und alle offenen Ohren wenn es mal nicht so gut lief. Ein großes Dankeschön geht dabei an Ulrike, die für Alle alles macht und trotzdem noch Zeit findet „mal eben“ auszuhelfen. Danke an Linda und Jule für die Kaffeepausen und den ganz normalen Wahnsinn im Laboralltag. Dank geht auch an Ben und Ludwig für die tatkräftige Unterstützung.

Der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie sowie dem IPB danke ich für die großartigen Möglichkeiten wissenschaftlich voran zu kommen.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich, dass sie für mich da sind wenn ich sie brauche. Ich danke meinen Eltern, ohne deren Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre zu studieren.

Meiner Frau Kinga danke ich für alles andere.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt zu haben. Wörtlich oder inhaltlich aus anderen Arbeiten entnommene Stellen, habe ich als solche kenntlich gemacht. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule eingereicht wurde.

Halle den 29.11.2016

Andreas Matern

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 25.04.1984

Geburtsort: Apolda

Familienstand: verheiratet

Ausbildung

Hochschulbildung

2012-2016 Promotion mit dem Ziel Dr. rer. nat

Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Stress und Entwicklungsbiologie, AG Induzierte Pathogenabwehr.

Titel der Doktorarbeit: „Chemische Abwehr an der Zellperipherie von *Arabidopsis thaliana*.“

Voraussichtlicher Abschluss Ende 2016.

2006-2011 Studium Biochemie, Diplom

MLU Halle/ Wittenberg.

Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Stress und Entwicklungsbiologie, AG Molekulare Kommunikation in Pflanze-Pathogen-Interaktionen, Diplomarbeit mit dem Titel: „Untersuchung des putativen Effektorproteins RXP1 des Gerstenpathogen *Rhynchosporium commune*.“

2003-2006 Studium Prähistorische Archäologie | Geologie | Alte Geschichte
MLU Halle/ Wittenberg

Schulbildung

2002 Abitur am Johann Gutenberg Gymnasium Erfurt

Publikationen:

Kirsten S, A. Navarro-Quezada, D. Penselin, C. Wenzel, A. Matern, A. Leitner, T. Baum, U. Seiffert and W. Knogge (2012). "Necrosis-inducing proteins of *Rhynchosporium commune*, effectors in quantitative disease resistance." *Mol Plant Microbe Interact* 25(10):1314-25

Dobritsch, M., T. Lübken, L. Eschen-Lippold, K. Gorzolka, E. Blum, A. Matern, S. Marillonnet, C. Böttcher, B. Dräger and S. Rosahl (2016). "MATE transporter-dependent export of hydroxycinnamic acid amides." *The Plant Cell* 28(2): 583-596.