

Das Elicitorprotein NPP1 - Isolierung und Charakterisierung der korrespondierenden cDNA, heterologe Expression des Proteins und Studien zur Signalperzeption

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg

von Annette Romanski, geb. Zunker,
geb. am 17. Mai 1974 in Eberswalde

verteidigt am 21.11.2001

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel
2. Prof. Dr. Hans Ullrich Seitz
3. Prof. Dr. Gerd-Joachim Krauß

Halle (Saale), im Juli 2001

urn:nbn:de:gbv:3-000002859

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000002859>]

Inhalt

ABBILDUNGEN.....	IV
TABELLEN.....	IV
ABKÜRZUNGEN.....	V
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenabwehr.....	1
1.2 Elicitoren als Signale pflanzlicher Pathogenabwehr.....	4
1.2.1 Generelle Elicitoren.....	4
1.2.2 Rassenspezifische Elicitoren.....	6
1.3 Elicitorperzeption.....	8
1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	10
1.5 Die Interaktion von Petersilie und Phytophthora sojae – ein Modellsystem zum Studium der Nichtwirtsresistenz.....	11
1.6 Die Gattung Phytophthora – Phytopathogene mit hohem Schadenspotential.....	14
1.7 Ziel dieser Arbeit.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN.....	17
2.1 Chemikalien und Bioreagenzien.....	17
2.2 Methoden zur Kultivierung, und Behandlung von Pflanzenmaterialien.....	17
2.2.1 Kultivierung von Petersiliezellkulturen.....	17
2.2.2 Präparation und Elicitorbehandlung von Petersilieprotoplasten.....	17
2.2.3 Bestimmung der Vitalität der Petersilieprotoplasten.....	18
2.2.4 Mikrosomenpräparation aus Petersiliezellen.....	18
2.2.5 Bestimmung der Ethylenakkumulation in Petersiliezellen nach Elicitorgabe.....	18
2.2.6 Elicitorbehandlung von Tabakpflanzen.....	18
2.3 Kultivierung verschiedener Phytophthora-Spezies.....	18
2.3.1 Anzucht von <i>P. parasitica</i> in Flüssigkultur.....	19
2.3.2 Anzucht von <i>P. infestans</i> in Flüssigkultur.....	19
2.3.3 Anzucht von <i>P. sojae</i> in Flüssigkultur.....	19
2.4 Molekularbiologische Arbeiten.....	19
2.4.1 Bakterienstämme und Plasmide.....	19
2.4.2 Präparation und Behandlung von Plasmid-DNA.....	20
2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten.....	21
2.4.4 RT-PCR.....	21
2.4.5 DNA-Sequenzierung.....	21
2.4.6 Auswertung der Sequenzdaten.....	22
2.4.7 Isolierung der NPP1-cDNA.....	22
2.4.7.1 Isolation von RNA und polyA ⁺ -RNA aus verschiedenen <i>Phytophthora</i> -Spezies.....	22
2.4.7.2 RACE-Reaktion („Rapid Amplification of cDNA Ends“).....	22
2.4.8 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Phytophthora</i> -Myzel.....	23
2.4.9 Bakterielle Expression von NPP1 und seiner Derivate.....	23
2.4.9.1 Test-Expression.....	23

2.4.9.2 Präparative Expression.....	23
2.4.9.3 Affinitätsreinigung der Expressionsprodukte mittels Glutathion-Agarose.....	24
2.4.9.4 Affinitätsreinigung der Expressionsprodukte mittels Ni-NTA-Agarose.....	24
2.5 Proteinchemie.....	25
2.5.1 Peptidsynthese.....	25
2.5.2 Peptidsequenzierung.....	25
2.5.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	25
2.5.4 Antikörperproduktion.....	25
2.6 Proteinanalytische Methoden.....	26
2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	26
2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	26
2.6.3 Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	26
2.6.3.1 Silberfärbung.....	26
2.6.3.2 Coomassiefärbung von Proteinen.....	27
2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen.....	27
2.8 Radioaktive Markierung von NPP1.....	28
2.8.1 Iodierung von NPP1.....	28
2.8.2 [³⁵ S]-Markierung von NPP1.....	28
2.8.3 Radioaktive Phosphorylierung von NPP1.....	29
2.8.3.1 Klonierung von PKA-NPP1.....	29
2.8.3.2 Phosphorylierungsreaktion.....	29
2.8.3.3 Dünnschichtchromatographische Analyse der Phosphorylierungsreaktion.....	29
2.8.3.4 Filtrationsassay zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von [³² P]-NPP1.....	29
2.9 Bindungsstudien mit radioaktivem NPP1.....	30
2.9.1 Bindungsaktivität im Filtrationsbindungsassay.....	30
2.9.2 Proteinvernetzung zur Detektion einer Bindungsstelle.....	30
2.10 Elektrophysiologische Untersuchungen an planaren Lipidbilayern.....	30
2.11 Transformation von Phytophthora infestans mit NPP1-cDNA.....	31
2.11.1 Präparation von Zoosporen.....	31
2.11.2 Elektrotransformation und Regeneration der Transformanten.....	32
3 ERGEBNISSE.....	33
3.1 Klonierung der cDNA für das P.-parasitica-Elicitorprotein NPP1.....	33
3.2 Homologien der NPP1-cDNA zu bekannten Sequenzen.....	36
3.3 Elicitoraktivität von rekombinalem NPP1 bzw. seiner Deletionsderivate.....	38
3.3.1 Herstellung von rekombinalem NPP1 als GST-Fusionsprotein.....	38
3.3.2 Herstellung von rekombinalem NPP1 als Histidin ₁₀ -Fusion.....	39
3.3.3 Tests zur Elicitoraktivität von rekombinalem NPP1.....	40
3.3.4 Expression von NPP1-Deletionsderivaten als GST-Fusionsproteine.....	43
3.3.5 Test von NPP1-Deletionsproteinen auf Elicitoraktivität.....	46
3.4 Einfluss der Sekundärstruktur von NPP1 auf die Elicitoraktivität.....	48
3.5 Ethylenbildung in Petersiliezellen nach NPP1-Applikation.....	52
3.6 Radioaktive Markierung von NPP1.....	53
3.6.1 Markierung von NPP1 mit [¹²⁵ I].....	53
3.6.2 Markierung von NPP1 mit [³⁵ S].....	55
3.6.3 Markierung von NPP1 mit [³² P].....	56
3.6.3.1 Phosphorylierungsreaktion.....	57
3.6.3.2 Reinigung von [³² P]-NPP1.....	58

3.7 Bindungsstudien zur Detektion einer putativen Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen..	60
3.8 Porenbildung als möglicher Perzeptionsmechanismus für NPP1	62
3.9 Suppression von NPP1 in <i>P. infestans</i>	64
4 DISKUSSION.....	67
4.1 Herstellung von rekombinantem NPP1	67
4.1.1 Bakterielle Expression von NPP1	67
4.1.2 Identifizierung der elicitoraktiven Komponente von NPP1	69
4.2 Radioaktive Markierung des Elicitorproteins NPP1	72
4.3 Perzeptionsmechanismen für NPP1.....	74
4.4 Die endogene Funktion des Elicitorproteins NPP1	76
4.4.1 Sequenzvergleiche von NPP1 mit homologen Proteinen	76
4.4.2 Inaktivierung von NPP1 im Oomyceten <i>P. infestans</i>	78
5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	81
6 LITERATUR.....	83
7 ANHANG	104
Anhang 1: Sequenzen der für die RACE-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide.....	104
Anhang 2: Sequenzen der für die Klonierung von NPP1, NPP1-Derivaten und NPP1-Homologen verwendete Oligonukleotide	104
Anhang 3: Sequenzen der für die <i>in-vitro</i> -Mutagenese verwendeten Oligonukleotide	105
Anhang 4: Sequenzen der für die automatische Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide	105
Anhang 5: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte	105
Anhang 5a: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte aus GST-Fusionsexpression	105
Anhang 5b: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte aus His ₁₀ -Fusionsexpression	108

Abbildungen

Abb. 1-1: Hypothetisches Modell der induzierten Signaltransduktion in Petersilie.....	14
Abb. 3-1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der NPP1-cDNA aus <i>P. parasitica</i>	34
Abb. 3-2: Hydropathiediagramm des Proteins NPP1	35
Abb. 3-3: Vergleich der Aminosäuresequenz des <i>P.-parasitica</i> -Proteins NPP1 mit homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen.....	36
Abb. 3-4: Phylogenetische Analyse der NPP1-Homologen nach Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen.....	38
Abb. 3-5: Gelelektrophoretische Analyse ausgewählter exprimierter Proteinfragmente von NPP1.....	39
Abb. 3-6: Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsreinigung von rekombinantem His ₁₀ -NPP1	40
Abb. 3-7: Elicitoraktivität von NPP1	42
Abb. 3-8: Deletionsderivate von NPP1	44
Abb. 3-9: Gelelektrophoretische Analyse aller rekombinanten Deletionsderivate von NPP1.....	45
Abb. 3-10: Elicitoraktivität der NPP1-Deletionsderivate.....	47
Abb. 3-11: Aminosäuresequenz von NPP1 mit vorausgesagter Sekundärstruktur	49
Abb. 3-12: Heterologe Expression mutierter NPP1-Varianten in <i>E. coli</i> und gelelektrophoretische Analyse rekombinanter NPP1-Derivate	50
Abb. 3-13: Elicitoraktivität von NPP1 und den Substitutionsderivaten NPP1-M1 und NPP1-M2	51
Abb. 3-14: Ethylenbildung in Petersiliezellensuspensionskulturen nach Elicitorgabe.....	52
Abb. 3-15: Gelelektrophoretische Analyse der Iodierung von NPP1.....	55
Abb. 3-16: Gelelektrophoretische Analyse der Reinigung von rekombinantem [³⁵ S]-NPP1	56
Abb. 3-17: Autoradiographische Analyse der Phosphorylierungsreaktion von NPP1	58
Abb. 3-18: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phosphorylierungsreaktion von NPP1	59
Abb. 3-19: Bindungsstudien zur NPP1-Bindungsstelle in Petersiliemikrosomen	60
Abb. 3-20: Kovalente Verknüpfung von [³² P]-NPP1-PKA2 mit Proteinen in Petersiliemikrosomen mittels BS ³ 61	
Abb. 3-21: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der elektrophysiologischen Untersuchung an planaren synthetischen Lipiddoppelmembranen	62
Abb. 3-22: Effekt von NPP1 auf planare Lipiddoppelmembranen.....	63
Abb. 3-23: RT-PCR-Analyse der NPP1-Transkriptakkumulation in <i>P.-infestans</i> -Transformanten	64
Abb. 3-24: Immunoblotanalyse der NPP1-Suppression in <i>P.-infestans</i> -Transformanten.....	65

Tabellen

Tab. 1-1: Klassen pflanzlicher Resistenzgene gruppiert nach ihren strukturellen Merkmalen.....	6
Tab. 1-2: Charakterisierung pflanzlicher Elicitorrezeptoren	9
Tab. 2-1: verwendete <i>E.-coli</i> -Stämme.....	20
Tab. 2-2: verwendete Plasmide	20
Tab. 2-3: synthetisierte Peptide.....	25
Tab. 3-1: Verwandtschaft der NPP1-homologen Proteine	37

Abkürzungen

4-CL	4-Cumarat-CoA-Ligase	K _d	Affinitätskonstante
Abb.	Abbildung	kDa	Kilodalton
Amp ^r	Ampicillinresistenz	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
APS	Ammoniumperoxodisulfat	MAP	Mitogen aktivierte Proteinkinase
AS	Aminosäure	MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
ATP	Adenosintriphosphat	MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
avr-Gen	Avirulenzgen	M _r	Molekulargewicht
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tools“	mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)
		NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduzierte Form)
bp	Basenpaare	NEP1	Nekrosen- und Ethylen-induzierendes Peptid
BS ³	Bis-(Sulfosuccinimidyl)suberat		
BSA	Rinderserumalbumin	Ni-NTA-Agarose	Ni-Nitrilotriacetic-Acid-Agarose
<i>C. fulvum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>	NIP1	Nekrosen-induzierendes Protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat	NPP1	Nekrosen-induzierendes Protein von <i>Phytophthora</i> 1
cDNA	komplementäre DNA		
Ci	Curie	N-Terminus	Amino-Terminus
cpm	Zerfälle pro Minute	OD	Optische Dichte
C-Terminus	Carboxy-Terminus	<i>P. infestans</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
Da	Dalton	<i>P. parasitica</i>	<i>Phytophthora parasitica</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat	<i>P. sojae</i>	<i>Phytophthora sojae</i>
DMF	Dimethylformamid	PAL	Phenylalaninammoniaklyase
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PaNie	<i>Pythium aphanidermatum</i> Nekrosen-induzierender Elicitor
DNase	Desoxyribonuklease	PBS	Phosphate buffered saline
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat	PCD	„programmed cell death“
DPI	Diphenyliodonium	PCR	Polymerase chain reaktion (Polymerase Kettenreaktion)
dsRNA	doppelsträngige RNA	Pep-13	elicitoraktives Peptid mit der Sequenz VWN QPV RGF KVV E
DTT	Dithiothreitol	PGI	<i>Phytophthora</i> Genom Initiative
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PKA	Proteinkinase A
EC ₅₀	Effektorkonzentration zur Auslösung halbmaximaler Reaktion	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
		PR-Protein	„pathogenesis-related“-Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	pv.	pathovar
EST	„expressed sequence tag“	PyBOP	Benzotriazolyl-N-oxy-tris-pyrrolidinophosphoniumhexafluorophosphat
f. sp.	forma specialis	rfu	relative Fluoreszenzeinheiten
f. spp.	formae speziales	R-Gen	Resistenzgen
Fmoc-	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-	RLK	„Receptor like kinase“, putative Rezeptorkinase
G	Erdbeschleunigung (9,81 m x s ⁻²)	RNA	Ribonukleinsäure
Glu-C	Proteinase, die Proteine C-terminal vom Glutamin spaltet	RNAi	RNA-Interferenz
		RNase	Ribonuklease
G-Protein	GTP-bindendes Protein	ROS	reaktive Sauerstoffspezies
GSH	Glutathion	rpm	„revolutions per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
GST	Glutathion-S-Transferase		
h	Stunden		
HeLa-Zellen	humane Zelllinie		
HEPES	N-2(Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure, Natriumsalz		
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie		
HR	Hypersensitive Reaktion		
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid		
kb	Kilobasenpaare		

RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAR	„systemic acquired resistance“ systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
Tab.	Tabelle
tert.	tertiär
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D- galactopyranosid

1- und 3-Buchstabencode für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

Schon seit den Anfängen der Landwirtschaft ist Schädlingsbefall eine Hauptursache für Ernteverluste. Auch heute bedingen Pflanzenkrankheiten, ausgelöst durch Pathogene, jährlich große Schäden bei der Kultivierung von Nutzpflanzen (vgl. Oerke *et al.*, 1994, Baker *et al.*, 1997). Zu den herkömmlichen Methoden, Pflanzen vor Schädlingsbefall zu schützen, gehören die Züchtung resistenter Sorten und die Anwendung von Fungiziden, Insektiziden und Pestiziden. Der Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel kann Pflanzenkrankheiten zwar zurückdrängen, ist jedoch problematisch, da sowohl die Produktion dieser Substanzen als auch ihre Anwendung das ökologische Gleichgewicht stören können. Zudem wird zunehmend beobachtet, dass die Pathogene nach intensivem Gebrauch von Pflanzenschutzmitteln neue Resistenzen ausbilden.

Die Züchtung pathogenresistenter Kulturpflanzen kann helfen diese Probleme zu vermeiden. Der großflächige Anbau solcher Sorten birgt jedoch auch Probleme. So erhöht sich aufgrund der genetischen Uniformität der angebauten Pflanzen das Risiko von Krankheitsepidemien in Monokulturen. Außerdem wird der Selektionsdruck auf den Krankheitserreger erhöht und die gezüchtete Sorte muss durch eine andere ersetzt werden, nachdem das Pathogen die Resistenzmechanismen überwunden hat. Die gezielte Züchtung neuer resistenter Sorten durch Kreuzung und Rückkreuzung ist, ebenso wie die Entwicklung neuer Pflanzenschutzmittel, sehr kosten- und zeitintensiv. Es ist daher erforderlich, neue Konzepte zu entwickeln. Dabei ist die Erforschung der Signalmechanismen, die bei Schädlingsbefall und der Aktivierung pflanzlicher Abwehrreaktionen ablaufen, von großer Bedeutung. Ferner haben Molekularbiologie und Biotechnologie die Möglichkeit eröffnet, durch gezielte Transformation von Genen Merkmale von einer Pflanze auf eine andere zu übertragen. Durch das Zusammenspiel dieser Möglichkeiten einer schnelleren Züchtung durch den Einsatz der Gentechnik, verbunden mit dem Umsetzen neuer Strategien zur Resistenzvermeidung, wird ein dauerhafter Schutz von Wirtspflanzen angestrebt.

1.1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenabwehr

Pathogene wie Bakterien, Viren, Pilze und Oomyceten verursachen die Schädigung zahlreicher ökonomisch bedeutsamer Kulturpflanzen. Pilze und Oomyceten dominieren dabei unter den Erregern. Obwohl Pflanzen ständig dem Angriff von Pathogenen aus ihrer Umwelt ausgesetzt sind, sind sie unter natürlichen Bedingungen gegenüber den meisten potentiell pathogenen Mikroorganismen resistent (Bell, 1981). Dieses Phänomen wird als Nichtwirts- oder Basisresistenz bezeichnet (Prell, 1996, Buchanan *et al.*, 2000, Heath, 2000). Die Basisresistenz resultiert aus dem Unvermögen der meisten potentiellen Pathogene, die Abwehrbar-

rieren der Pflanze zu überwinden, da sie nicht über die für die Besiedlung der Pflanze erforderlichen Pathogenizitätsmerkmale verfügen. Die Pflanze kann das Pathogen aber auch durch die Induktion aktiver Abwehrmechanismen an der Parasitisierung hindern. Erst wenn die Basisresistenz der Pflanzen überwunden werden kann, wird die Pflanze zu einer Wirtspflanze für das entsprechende Pathogen. Diese Interaktion wird als kompatibel bezeichnet (Basiskompatibilität). Einige Kultivare einer Pflanzenspezies können jedoch gegenüber einzelnen Rassen eines Pathogens resistent sein (Wirts- oder Kultivarresistenz). Diese Wechselbeziehung eines avirulenten Pathogens mit einer resistenten Pflanze wird als inkompatibel bezeichnet (Prell, 1996).

Eine Vielzahl von Studien der vergangenen Jahre hat gezeigt, dass die Abwehrmechanismen der Wirts- und Nichtwirtsresistenz ähnlich, in vielen Fällen wahrscheinlich sogar identisch sind (Hammond-Kosack & Jones, 1996, Ebel & Scheel, 1997, Heath, 2000). In beiden werden konstitutive und induzierte Abwehrmechanismen unterschieden.

Erste Abwehrmaßnahmen der Pflanze, die dem Pathogenbefall entgegen wirken, sind strukturelle Barrieren an der Zelloberfläche (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Schutz bieten vor allem durch Lignineinlagerungen verstärkte Zellwände, die das Eindringen von Pathogenen in die Zellen erschweren (Ride, 1983). Außerdem können in der Zellwand gespeicherte antimikrobielle Substanzen (z.B. Phenolderivate, Saponine, cyanogene Glykoside, Acetophenone) das Wachstum eindringender Pathogene inhibieren (Bohlmann, 1994, Elstner *et al.*, 1996, Osbourn, 1996a, Osbourn, 1996b, Filippone *et al.*, 1999). Gelingt es dem Phytopathogen, z.B. durch enzymatischen Abbau der Zellwände und Detoxifikation der antimikrobiellen Substanzen, diese Barrieren zu überwinden, kommt es zu Wechselwirkungen an der Plasmamembran der Pflanzenzellen. Diese können zahlreiche Abwehrreaktionen aktivieren, die die weitere Ausbreitung des Pathogens verhindern helfen. Voraussetzung für diese induzierte Abwehr ist die Erkennung von Phytopathogenen. Dabei wird das auslösende Signal in ein zelleigenes Signal umgewandelt und in einer Signaltransduktionskaskade zum Ort der Auslösung von Abwehrreaktionen weitergeleitet (Ebel & Scheel, 1992, Scheel *et al.*, 2000, Heath, 2000, Feys & Parker, 2000).

Induzierte Abwehrreaktionen basieren beispielsweise auf der allosterischen Aktivierung spezifischer Enzyme. Diese können strukturelle Barrieren an der Penetrationsstelle durch oxidative Vernetzung von Zellwandkomponenten verstärken oder neue Barrieren aufbauen (Bradley *et al.*, 1992). Durch Aktivierung der Kallosesynthese kommt es zur Bildung einer Kallosepapille zwischen der Zellwand und der Plasmamembran der Pflanze (Kauss *et al.*, 1989, Messiaen *et al.*, 1995). Diese kann genau wie Lignin- oder Suberineinlagerung (Hammerschmidt, 1984, Scheel, 1992) das Wachstum der Pathogene sowie eine Sekundärinfektion verhindern. Ein weiterer Mechanismus der pflanzlichen Pathogenabwehr ist die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, „oxidative burst“, Otte & Barz, 1996, Hammond-

Kosack & Jones, 1996, Mehdy *et al.*, 1996, Doke, 1997, Lamb & Dixon, 1997, Piedras *et al.*, 1998). ROS (O_2^- , H_2O_2 , HO_2 und OH^-) werden vermutlich als Superoxidanionen (Jabs *et al.*, 1997) nach einem Mechanismus gebildet, der analog der Synthese von ROS in Makrophagen (Segal & Abo, 1993) eine NADPH-Oxidase einschließt (Doke, 1985). Außerdem können ROS in Pflanzen durch andere Oxidasen oder Peroxidasen gebildet werden (Bolwell *et al.*, 1995, Zhang *et al.*, 1995). Es konnte bislang nicht geklärt werden, ob diese unterschiedlichen Synthesewege in einer Pflanze kooperativ oder unabhängig voneinander arbeiten. Die ROS können direkt toxisch auf das Phytopathogen wirken oder in die Verstärkung der pflanzlichen Zellwand durch Quervernetzung der prolin- und hydroxyprolinreichen Glykoproteine involviert sein (Peng & Kuc, 1992, Keller, 1993, Baker & Orlandi, 1995, Lamb & Dixon, 1997). Daneben ist H_2O_2 als Reaktionspartner an der Ligninpolymerbildung beteiligt (Bolwell *et al.*, 1995).

Pflanzliche Abwehrreaktionen können auch durch die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen initiiert werden. Diese kodieren z.B. für lytische Enzyme, wie Chitinasen und Glukanasen, die mikrobielle und pilzliche Zellwände angreifen, oder für Enzyme des generellen Phenylpropanstoffwechsels, die eine der Ausgangsverbindungen der Phytoalexinbiosynthese (4-Cumaroyl-CoA) bereitstellen (Hahlbrock & Scheel, 1989, Dixon & Lamb, 1990, Kombrink & Somssich, 1995). Eine weitere Gruppe von Proteinen, deren Transkription nach einer Pathogeninfektion aktiviert wird, sind die PR-Proteine („pathogenesis-related proteins“). Diese kleinen, proteasestabilen Proteine mit meist saurem isoelektrischen Punkt wurden ursprünglich in Tabak (*Nicotiana tabacum*) nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV) identifiziert (van Loon & van Kammen, 1970). Sie kommen aber auch in anderen Pflanzen vor (Linthorst, 1991). Die konstitutive Expression von PR-Proteinen in transgenen Pflanzen führte zu erhöhter Resistenz gegenüber Pathogenen (Epple *et al.*, 1997, Kombrink & Somssich, 1997), die durch kombinierte Expression mehrerer PR-Proteine in einer Pflanze weiter gesteigert werden konnte (Zhu *et al.*, 1994, Jach *et al.*, 1995).

ROS scheinen auch an anderen Abwehrprozessen, wie der hypersensitiven Reaktion (HR), beteiligt zu sein. Die HR ist definiert als räumlich begrenztes, schnelles Absterben von Pflanzenzellen (Dangl *et al.*, 1996, Greenberg, 1997). Durch Nährstoffentzug wird dem infizierenden Pathogen die Existenzgrundlage genommen. Außerdem werden antimikrobielle Substanzen freigesetzt, die das eindringende Phytopathogen an seiner Ausbreitung hindern und in seinem Wachstum beschränken sollen. Ein kausaler Zusammenhang zwischen dem hypersensitiven Zelltod und der Induktion anderer Abwehrreaktionen konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden (Atkinson, 1993, Jakobek & Lindgren, 1993, Dangl *et al.*, 1996). Die genauen molekularen Mechanismen, die bei der HR ablaufen, sind ebenfalls nicht vollständig verstanden.

Das beschriebene Spektrum der Abwehrreaktionen ist in verschiedenen Pflanzenarten sehr ähnlich und wird in einem definierten räumlichen und zeitlichen Muster aktiviert (Ebel & Cosio, 1994, Ebel & Scheel, 1997). Die lokalen Reaktionen werden dabei in vielen Pflanzen von einer systemisch erworbenen Resistenz („systemic acquired resistance“, SAR) begleitet, die die gesamte Pflanze gegen nachfolgende Infektionen durch verschiedene Pathogene immunisiert (Ryals *et al.*, 1996, Hunt *et al.*, 1996, Sticher *et al.*, 1997, Alvarez *et al.*, 1998, Pieterse & van Loon, 1999).

1.2 Elicitoren als Signale pflanzlicher Pathogenabwehr

Grundlegende Voraussetzung für die Aktivierung von Abwehrreaktionen ist die Erkennung von Phytopathogenen durch die Pflanze. Die molekularen Determinanten, die diese Erkennung vermitteln, werden als Elicitoren bezeichnet (Ebel & Scheel, 1997). Ursprünglich bezeichnete der Begriff Elicitor Moleküle, die die Bildung und Akkumulation von Phytoalexinen, niedermolekularen, meist lipophilen Stoffen mit antimikrobieller Wirkung, induzieren (Keen *et al.*, 1975). Später wurde der Begriff auf alle Signalsubstanzen erweitert, die in Pflanzen Abwehrreaktionen auslösen (Ebel, 1986, Hahlbrock & Scheel, 1987). Man unterscheidet nach Art der Interaktion nichtrassenspezifische (generelle) und rassenspezifische Elicitoren. Generellen Elicitoren wird eine Rolle bei der Auslösung von Abwehrmechanismen in Nichtwirtspflanzen bzw. bei der Auslösung der nichtkultivarspezifischen Abwehrreaktionen in Wirtspflanzen zugeschrieben. Dagegen vermitteln rassenspezifische Elicitoren die Erkennung in der rassen-/kultivarspezifischen Form der Wirtsresistenz (De Wit, 1995, Boller, 1995, Ebel & Scheel, 1997).

1.2.1 Generelle Elicitoren

Generelle Elicitoren können strukturell sehr unterschiedliche Substanzen sein (Ebel & Cosio, 1994). So wurden z.B. Oligosaccharide (Sharp *et al.*, 1984), Glykoproteine (Parker *et al.*, 1991), Proteine (Scholtens-Toma & De Wit, 1988, Ricci *et al.*, 1989, Yu, 1995) und Fettsäuren (Bostock *et al.*, 1982) aus verschiedenen Pathogenen isoliert und deren Fähigkeit, pflanzliche Abwehrreaktionen auszulösen, nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass viele der gereinigten und charakterisierten Elicitoren anstelle des gesamten Pathogens hinreichend für die Induktion der multifaktoriellen Abwehr der Pflanze sind (Ebel & Scheel, 1997).

Man unterscheidet zwei Arten von Elicitoren. Exogene Elicitoren sind z.B. strukturelle Bausteine der Zellwand phytopathogener Mikroorganismen oder mikrobielle Sekretionsprodukte. Sie werden entweder vom Pathogen abgegeben oder durch die Wirkung hydrolytischer Enzyme der Pflanze freigesetzt (Granado *et al.*, 1995, Cervone *et al.*, 1997, Ebel & Scheel,

1997). Endogene Elicitoren sind meist Oligosaccharide sowie deren Grundbausteine (Ryan & Farmer, 1991), die durch die Einwirkung lytischer Enzyme des Pathogens aus pflanzlichen Zellwandpolymeren freigesetzt werden (Cervone *et al.*, 1997).

Eine charakteristische Klasse genereller Elicitoren stellen die Elicitine dar. Diese hochkonservierten, nicht glykosylierten 10-kDa Proteine kommen in *Phytophthora*-Spezies und in einigen *Pythium*-Spezies vor (Ricci *et al.*, 1989, Huet *et al.*, 1995, Yu, 1995, Ponchet *et al.*, 1999). Elicitine induzieren die HR in Tabakpflanzen (Ricci *et al.*, 1989, Kamoun *et al.*, 1993, Kamoun *et al.*, 1999, Ponchet *et al.*, 1999) und die Akkumulation von ROS in Tabak-suspensionszellkulturen (Pugin *et al.*, 1997). Die Nekrosebildung der HR wird von einer systemischen Resistenz der Pflanze gegen nachfolgende Infektionen mit virulenten Isolaten von *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* oder *Sclerotinia sclerotiorum* begleitet (Bonnet *et al.*, 1996, Keller *et al.*, 1996). Das Elicitin von *Phytophthora parasitica* (*P. parasitica*) ist α -Parasiticein und fehlt nur in virulenten Isolaten der Spezies *P. parasitica* f.sp. *nicotianae*. In Tabakpflanzen löst dieser Oomycet offensichtlich keine Basisresistenz aus, d.h. die Virulenz von *P. parasitica* f. sp. *nicotianae* korreliert invers mit der Elicitin-Sekretion. Das impliziert, dass Elicitine als Avirulenzfaktoren, als genusspezifische Erkennungsdeterminanten, für die Aktivierung der pflanzlichen Abwehr fungieren können (Kamoun *et al.*, 1994, Bonnet *et al.*, 1994). Dies wurde vor kurzem im Oomyceten *Phytophthora infestans* (*P. infestans*) demonstriert, in welchem die Elicitin-Bildung (Infestin) durch transgene Gegenstrangexpression ausgeschaltet werden konnte (van West *et al.*, 1999). Dadurch wurden diese Oomyceten auf der Nichtwirtspflanze *Nicotiana benthamiana* virulent (Kamoun *et al.*, 1998).

Außer für die Strukturbildner der Zellwand von Pilzen und Oomyceten, z.B. β -Glukanfragmente aus der Zellwand des Myzels von *Phytophthora sojae* (Sharp *et al.*, 1984, Ebel & Scheel, 1997), ist die endogene Funktion für die meisten Elicitoren nicht bekannt. Es wird vermutet, dass sie essentielle Aufgaben im Lebenszyklus und Infektionsprozess der Pathogene inne haben, da es für das Pathogen aus evolutionärer Sicht unvorteilhaft ist, ein Erkennungssignal zur Induktion der pflanzlichen Abwehr zu konservieren. Für Cryptogein konnte die Funktion als Sterol-Carrierprotein gezeigt werden (Mikes *et al.*, 1997). Der Nachweis, dass es sich dabei um eine essentielle Funktion für den Oomyceten *Phytophthora cryptogea* handelt, steht jedoch noch aus. Das GP42-Elicitorprotein aus *Phytophthora sojae* (Parker *et al.*, 1991), das die elicitoraktive Komponente Pep-13 enthält (Nürnberg *et al.*, 1994), weist eine Ca^{2+} -abhängige Transglutaminaseaktivität (EC 2.3.1.13) auf. Dieses extrazelluläre Enzym katalysiert die Bildung von Isopeptidbindungen und könnte eine Funktion in der Quervernetzung von Zellwandbestandteilen des Oomyceten haben (F. Brunner & T. Nürnberg, persönliche Mitteilung).

1.2.2 Rassenspezifische Elicitoren

Die Resistenz bestimmter Kultivare einer Wirtspflanze gegenüber bestimmten Rassen eines Pathogens kann durch die „Gen-für-Gen-Hypothese“ (Flor, 1956) erklärt werden (rasse-/kultivarspezifische Form der Wirtsresistenz). Nach diesem Modell findet man im Fall inkompatibler Interaktion zwischen der Pflanze und dem Phytopathogen für jedes (semi)-dominante pflanzliche Resistenzgen ein komplementäres (semi)dominantes Avirulenzgen im Pathogen (Flor, 1956, Ellingboe, 1984, Takken & Joosten, 2000, Heath, 2000, Feys & Parker, 2000). Beide Gene wirken konditional, das Resistenzgen (*R*) ist also nur dann wirksam, wenn im Pathogen ein dominantes Avirulenzgen (*avr*) vorhanden ist. Die einfachste biochemische Interpretation dieses genetischen Modells stellt das Signal-Sensor-Modell dar. Das Phytopathogen ist die Quelle eines Signals (Elicitor, kodiert durch das Avirulenzgen), das von einem Sensor (Rezeptor, kodiert durch das Resistenzgen) der Pflanze erkannt wird (Keen, 1990, De Wit, 1995). Der Ausfall nur eines dieser Gene würde die Basiskompatibilität wieder herstellen (De Wit, 1997).

Klasse	R-Gen ¹	Pflanze	avr-Gen ²	Struktur der R-Genprodukte	Referenz
I	<i>Cf-2</i> <i>Cf-4</i> <i>Cf-5</i> <i>Cf-9</i>	Tomate Tomate Tomate Tomate	<i>avr2</i> <i>avr4</i> <i>avr5</i> <i>avr9</i>	LRR ³ -TM ⁴ LRR-TM LRR-TM LRR-TM	Dixon <i>et al.</i> , 1996 Thomas <i>et al.</i> , 1997 Dixon <i>et al.</i> , 1998 Jones <i>et al.</i> , 1994
II	<i>Pto</i>	Tomate	<i>avrPto</i>	Proteinkinase	Martin <i>et al.</i> , 1993
III	<i>Xa21</i>	Reis		LRR-TM, Proteinkinase	Hammond-Kosack & Jones, 1997
IV	<i>HMI</i>	Mais		NADPH-Reduktase	Johal & Briggs, 1992
V	<i>Mlo</i>	Gerste		7 Transmembranhelizes	Devoto <i>et al.</i> , 1999
VI a	<i>RPS2</i> <i>RPM1</i> <i>I₂</i> <i>RPP8</i> <i>Pita</i>	Arabidopsis Arabidopsis Tomate Arabidopsis Reis	<i>avrRpt2</i> <i>avrRpm1</i> <i>avrRpp8</i> <i>avrPita</i>	LZ ⁵ -LRR-NBS ⁶ LZ-LRR-NBS LZ-LRR-NBS LZ-LRR-NBS LZ-LRR-NBS	Bent <i>et al.</i> , 1994 Grant <i>et al.</i> , 2000 Ori <i>et al.</i> , 1997 McDowell <i>et al.</i> , 1998 Jia <i>et al.</i> , 2000
VI b	<i>L6</i> <i>N</i> <i>RPP5</i>	Flachs Tabak Arabidopsis	<i>AL6</i> TMV-Replikase	TIR ⁷ -LRR-NBS TIR-LRR-NBS TIR-LRR-NBS	Lawrence <i>et al.</i> , 1995 Whitham <i>et al.</i> , 1994 Parker <i>et al.</i> , 1997

Tab. 1-1: Klassen pflanzlicher Resistenzgene gruppiert nach ihren strukturellen Merkmalen

(modifiziert nach Takken & Joosten, 2000)

¹Resistenzgen; ²Avirulenzgen; ³“leucin-rich repeat“ (leuzinreiche Domäne); ⁴“transmembrane region“ (Transmembrandomäne); ⁵“leucin zipper“ (Leuzin-Reißverschluss-Domäne); ⁶“nucleotide binding site“ (Nukleotidbindende Domäne); ⁷“Toll/interleukin receptor domain“ (Toll/Interleukinrezeptor-Domäne)

Gram-negative Bakterien nutzen das evolutionär konservierte Typ-III-Sekretionssystem, um Effektorproteine, darunter Avr-Proteine, ins Zytosol der Pflanzenzellen (Wirtszellen) zu exportieren, wo die Interaktion mit dem R-Genprodukt erfolgt. Bakterielle Pilusstrukturen ermöglichen dabei wahrscheinlich den Transport der Avr-Proteine durch die pflanzliche Zellwand (Alfano & Collmer, 1997, Galan & Collmer, 1999). Dagegen werden Pilze und Oomyceten offenbar an der pflanzlichen Plasmamembran erkannt. Es ist aber auch eine In-

jektion von Effektoren denkbar. So konnte z.B. kürzlich das Resistenzgenprodukt Pita aus Reis, das mit dem Avirulenzgenprodukt AvrPita des Reispathogens *Magnaporthe grisea* interagiert, als zytoplasmatisches Protein charakterisiert werden (Jia *et al.*, 2000).

R-Genprodukte, die Resistenz gegenüber Pathogenen verleihen, können nach ihren strukturellen Merkmalen in sechs Klassen eingeteilt werden: (I) jene mit einer Transmembran- und einer leuzinreichen Domäne („transmembrane - leucin-rich repeat“, TM-LRR), (II) die Proteinkinase-Klasse, (III) die Proteinkinase-Klasse mit leuzinreicher Domäne, (IV) eine Klasse von Proteinen mit NADPH-Reduktase-Aktivität, (V) die Klasse von Proteinen mit transmembranständigen Helizes, sowie (VI) jene mit nukleotidbindender, leuzinreicher Domäne („nucleotide binding – leucin-rich repeat, NB-LRR). Die letzte Klasse (VI) kann noch unterteilt werden nach Leuzin-Reißverschluss-Motiv („leucin zipper“, LZ) und Toll/Interleukinrezeptor-Motiv (TIR) (vgl. dazu Tab. 1-1 nach Takken & Joosten, 2000). Ähnliche strukturellen Merkmale findet man auch für Rezeptormoleküle in Insekten und Vertebraten. Es scheint also eine evolutionär konservierte Grundlage der Erkennung von Pathogenen zu geben, die angeborene Immunität („innate immunity“, Aderem & Ulevitch, 2000, Cohn *et al.*, 2001, Staskawicz *et al.*, 2001, Nürnberger & Scheel, 2001).

Die genetischen Grundlagen der „Gen-für-Gen-Hypothese“ sind durch zahlreiche Beispiele belegt. So wirken die Produkte der Avirulenzgene *avr4* und *avr9* des Pathogens *Cladosporium fulvum* (*C. fulvum*) nur auf den Genotyp *Cf-4* bzw. *Cf-9* der Tomate als Elicitoren der HR (van den Ackerveken *et al.*, 1992, Joosten *et al.*, 1994). Die Transformation von auf Genotyp *Cf-9* virulenten *C. fulvum*-Rassen mit *avr9* führt zur Ausbildung der Wirtsresistenz, während der Verlust des *avr9* die Virulenz auf *Cf-9* zur Folge hat (van den Ackerveken *et al.*, 1992, Marmeisse *et al.*, 1993). Jedoch ist die molekulare Wirkungsweise der Avirulenzgen- und Resistenzgenprodukte in den meisten Fällen nicht eindeutig geklärt. Die Zahl der Systeme, in denen beide Gene isoliert und die Interaktion zwischen beiden Genprodukten untersucht wurde, ist begrenzt (De Wit, 1997). Für das Paar AvrPto/Pto konnte eine physische Interaktion der zu den Genen korrespondierenden Proteine im Hefe-2-Hybridssystem gezeigt werden (Tang *et al.*, 1996). Befällt das pathogene Bakterium *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* eine Tomatenpflanze, so wird, falls es in diesem speziellen Bakterienstamm ausgebildet wird, das Avr-Protein (AvrPto) in die Pflanze injiziert. Im Zytosol interagiert AvrPto mit einer resistenzgenkodierten Serin/Threonin-Proteinkinase (Pto) (Martin *et al.*, 1993). Auch für das R-Genprodukt Pita und das Avirulenzgenprodukt AvrPita aus *Magnaporthe grisea* konnte eine *in-vitro*-Interaktion nachgewiesen werden (Jia *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu diesen experimentell bestätigten Interaktionen wurde für das Genprodukt *Cf-9* durch verschiedene biochemische Analysen gezeigt, dass es mit dem Avirulenzgenprodukt Avr9 keine physische Interaktion eingeht (Luderer *et al.*, 2001).

Für kein Resistenzgenprodukt konnte bisher die postulierte Funktion als pflanzlicher membranständiger Elicitorrezeptor für Avr-Proteine von Pilzen oder Oomyceten als Liganden nachgewiesen werden, obwohl strukturelle Merkmale, wie Transmembrandomänen und leuzinreiche Protein/Protein-Interaktionsdomänen (LRR), darauf hindeuten (De Wit, 1998). Mehr noch als bei den generellen Elicitoren ist für die rassenspezifischen Elicitoren die Frage nach ihrer essentiellen Funktion für das Pathogen offen. So bleiben z.B. die Deletion oder die Inaktivierung von *avr4* oder *avr9* in *C. fulvum* ohne nachweisbare negative Auswirkungen auf den Lebenszyklus und die Pathogenität des Pilzes (Joosten *et al.*, 1994, Lauge & De Wit, 1998).

Ein Beispiel, dass ein Avr-Protein auch toxische Aktivität in Nichtwirtspflanzen hat, ist NIP1 (necrosis inducing protein) aus *Rhynchosporium secalis*. Das Protein wirkt neben seiner Rolle als rassenspezifischer Elicitor (in nanomolarer Konzentration) in resistenten Gerstekultivaren (Resistenzgen *Rrs1*) offenbar auch als Virulenzfaktor (in mikromolarer Konzentration) in suszeptiblen Gerstensorten und anderen monokotyledonen und dikotyledonen Pflanzen (Hahn *et al.*, 1993, Rohe *et al.*, 1995, Knogge, 1996). Die nicht kultivarspezifische toxische Aktivität von NIP1 hängt vermutlich mit der Aktivierung einer plasmalemmagebundenen H⁺-ATPase zusammen (Wevelsiep *et al.*, 1993, Knogge, 1996).

1.3 Elicitorperzeption

Die enorme strukturelle Diversität der bisher gereinigten Elicitoren schließt die Existenz eines universellen strukturellen Motivs als allgemeines Signal für die Auslösung der pflanzlichen Pathogenabwehr aus (Boller, 1995, Ebel & Scheel, 1997). Die Tatsache, dass viele generelle und rassenspezifische Elicitoren pflanzliche Abwehrreaktionen bereits in nanomolaren Konzentrationen mit hoher Spezifität auslösen, deutet auf die Existenz von Elicitorrezeptoren hin (Sharp *et al.*, 1984, Cheong *et al.*, 1993, Nürnberger *et al.*, 1994, Hahn, 1997). Dabei erfolgt die rezeptorvermittelte Pathogenerkennung bakterieller Avr-Proteine im Zytosol (Bonas & van den Ackerveken, 1997), während Elicitoren von Oomyceten und Pilzen an plasmamembranständige Rezeptoren binden. Es konnten bereits einige Bindungsstellen in verschiedenen Pflanzen detektiert werden (vgl. Tab. 1-2 nach Nürnberger, 1999). Ein gemeinsames Merkmal aller untersuchten Bindungsstellen ist ihre relativ geringe Abundanz und die hohe Ligandenaffinität der Rezeptoren (K_d). In den meisten Fällen konnte eine quantitative und qualitative Korrelation zwischen der Fähigkeit dieser Elicitoren an einen Rezeptor zu binden und pflanzliche Abwehrreaktionen zu induzieren, nachgewiesen werden.

Ziel verschiedener Arbeitsgruppen ist es, Elicitorrezeptoren aus Pflanzen zu isolieren. Durch Proteinquervernetzung und Photoaffinitätsmarkierung konnte das Molekulargewicht und die Untereinheitenstruktur verschiedener Rezeptoren aufgeklärt werden. So wurden u.a.

ein Bindungsprotein (75 kDa) für den Chitooktaoseelicitor in Reis (Shibuya *et al.*, 1996), ein Bindungsprotein (66 kDa) für EIX in Tabak (Hanani & Avni, 1997), drei Bindungsproteine (75 kDa, 100 kDa, 170 kDa) für das Hepta- β -Glukosid in Soja (Frey *et al.*, 1993), ein Bindungsprotein (100 kDa) für Pep-13 in Petersilie (Nürnberger *et al.*, 1995) sowie ein Bindungsprotein (115 kDa) für Flg22 in Tomate (Meindl *et al.*, 2000) identifiziert. Bisher konnte jedoch nur das 75-kDa-Protein, das mit synthetischem Hepta- β -Glukan interagiert, mittels Affinitätschromatographie aus der Plasmamembran von Soja gereinigt und anschließend das kodierende Gen kloniert werden (Mithöfer *et al.*, 1996, Umemoto *et al.*, 1997). Da dieses Protein keine offensichtliche Transmembrandomäne bzw. Signaltransduktionsdomäne (Kinasedomäne, LRR usw.) aufweist, ist es wahrscheinlich nur ein Teil eines Proteinkomplexes, der als Rezeptor funktionell aktiv ist. Vermutlich sind die übrigen detektierten Glukan-Bindungsproteine ebenfalls Bestandteile dieses Rezeptorkomplexes. Es konnte gezeigt werden, dass der Hepta- β -Glukosid-Rezeptor aus Soja, wenn er in Tomatenzellen exprimiert wird, ebenfalls das Hepta- β -Glukan binden kann (Mithöfer *et al.*, 2000). Die ermittelte Bindungskonstante ist mit 130 nM jedoch deutlich größer als in Soja (4,5 nM), d.h. die Affinität der Bindungsstelle zum Liganden ist im heterologen Organismus geringer.

Elicitor	Typ	Pflanze	K _d ¹ [nM]	Referenz
Hepta- β -glukan ² (<i>Phytophthora sojae</i>) ³	g	Sojabohne	3,0	Cosio <i>et al.</i> , 1990 Cheong & Hahn, 1991
Glykopeptid (gp8) (Hefe)	g	Tomate	3,3	Basse <i>et al.</i> , 1993
Oligopeptid (Pep-13) (<i>Phytophthora sojae</i>)	g	Petersilie	2,4	Nürnberger <i>et al.</i> , 1994
Protein (Cryptogein) (<i>Phytophthora cryptogea</i>)	g	Tabak	2,0	Wendehenne <i>et al.</i> , 1995
Polypeptid (Avr9) (<i>Cladosporium fulvum</i>)	r	Tomate	0,07	Kooman-Gersmann <i>et al.</i> , 1996
Protein (EIX) (<i>Trichoderma viride</i>)	g	Tabak	6,2	Hanania & Avni, 1997
Chitooktaose	g	Reis	5,4	Shibuya <i>et al.</i> , 1993
Chitopentanose	g	Tomate	22,8	Baureithel <i>et al.</i> , 1994
Syringolid 1 (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>)	r	Sojabohne	8,7	Ji <i>et al.</i> , 1997
Harpin, (HrpZ) (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>)	g	Tabak	425	Lee <i>et al.</i> , 2001b
AvrPto (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>)	r	Tomate		Tang <i>et al.</i> , 1996
Flagellin (Flg22) (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tabaci</i>)	g	Tomate	2,0	Felix <i>et al.</i> , 1999 Meindl <i>et al.</i> , 2000

Tab. 1-2: Charakterisierung pflanzlicher Elicitorrezeptoren

(modifiziert nach Nürnberger, 1999)

¹Affinität der Bindungsstelle zum Elicitor; ²Struktur des Elicitors und der in der Referenz verwendete Name;

³Herkunft des Elicitors; g: genereller Elicitor; r: rassenspezifischer Elicitor

Außerdem wurde kürzlich eine Chitinase-verwandte, putative Rezeptorkinase (RLK, „receptor like kinase“) aus Tabak isoliert, deren Transkriptakkumulation nach Infektion mit *Phy-*

tophthora parasitica und TMV stimuliert wurde. Exprimiert im heterologen System humaner HeLa-Zellen ist diese Rezeptorkinase in der Plasmamembran lokalisiert (Kim *et al.*, 2000). Des Weiteren konnte aus *Arabidopsis thaliana* ein Gen für einen putativen Rezeptor für den bakteriellen Elicitor Flagellin identifiziert werden. Es kodiert wahrscheinlich ebenfalls für eine Rezeptorkinase (RLK), die Homologien zu R-Genprodukten aufweist (Gómez-Gómez & Boller, 2000, Gómez-Gómez *et al.*, 2001). Der Bindungsnachweis steht jedoch sowohl für die Chitin-bindende als auch für die Flagellin-bindende RLK noch aus.

1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Wie bereits erwähnt, ist das Muster induzierter und präformierter Abwehrreaktionen in der Wirts- und Nichtwirtsresistenz ähnlich. Diese Ähnlichkeit lässt sich auch bei den Mechanismen der Signalwandlung beobachten. So scheinen die Stimulierung von Ionenflüssen über die Plasmamembran, die durch spezifische Kanäle vermittelt werden, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Aktivierung von Serin/Threonin-Kinasen, Phosphatasen sowie GTP-bindenden Proteinen in diese Kaskaden involviert zu sein (Felix *et al.*, 1994, Dixon *et al.*, 1994, Kombrink & Somssich, 1995, Ebel & Scheel, 1997, Ligterink *et al.*, 1997, Scheel, 1998, Rajasekhar *et al.*, 1999, Kawasaki, *et al.*, 1999, Bischoff *et al.*, 1999, Nürnberger & Scheel, 2001). Diese Komponenten einer Signaltransduktionskaskade werden in tierischen Zellen nach Bindung entsprechender Liganden an G-Protein gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptorkinasen aktiviert. Auch in Pflanzenzellen scheinen ähnliche Rezeptormoleküle das extrazelluläre Signal zu erkennen und in ein intrazelluläres Signal umzuwandeln (Scheel, 1998). Das Arabidopsis-Genom-Projekt hat jedoch gezeigt, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren im Pflanzensystem im Vergleich zu Rezeptorkinasen relativ selten sind (Arabidopsis-Genom-Initiative, 2000). Im Gegensatz zu tierischen Rezeptorkinasen, zumeist Tyrosinkinasen, findet man in pflanzlichen Systemen vor allem Serin/Threonin-Kinasen (Braun & Walker, 1996, Arabidopsis-Genom-Initiative, 2000).

Als schnellste messbare Reaktionen der Pflanzenzellen nach Behandlung mit Elicitor zeigen sich ein Efflux von Cl⁻ und K⁺-Ionen, ein Influx von Protonen und Ca²⁺-Ionen und ein Anstieg der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration (Nürnberger *et al.*, 1994, Tavernier *et al.*, 1995, Jabs *et al.*, 1997, Pugin *et al.*, 1997, Blume *et al.*, 2000). Dabei scheint extrazelluläres Ca²⁺ essentiell für die Induktion der pflanzlichen Pathogenabwehr zu sein. Sowohl das Entfernen von Ca²⁺ aus dem Kulturmedium als auch das Blockieren des Ca²⁺-Influxes durch Inhibitoren hemmen die pflanzlichen Abwehrreaktionen (Tavernier *et al.*, 1995, Pugin *et al.*, 1997, Xu & Heath, 1998, Mithöfer *et al.*, 1999, Blume *et al.*, 2000, Grant *et al.*, 2000). Inwiefern auch intrazelluläre Ca²⁺-Speicher involviert sind, ist bislang unbekannt. Verschiedene Inhibitor- und Effektorstudien deuten darauf hin, dass G-Proteine und Proteinkinasen bei der Auslösung der Ionenflüsse eine Rolle spielen (Conrath *et al.*, 1991, Legendre *et al.*, 1992,

Felix *et al.*, 1994, Mathieu *et al.*, 1996, Gelli *et al.*, 1997). Auch die Beteiligung von MAP-Kinase-Kaskaden (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), wie sie für Hefe und tierische Organismen beschrieben wurden, konnte in Pflanzen nachgewiesen werden (Conrath *et al.*, 1997, Hirt, 1997, Zhang & Klessig, 1998, Romeis *et al.*, 1999, Cardinale *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2001, Frye *et al.*, 2001). Weiterhin wurde gezeigt, dass Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen (CDPK) an der Signaltransduktion beteiligt sind (Romeis *et al.*, 2000). Sie könnten als potentielle Interaktionspartner für zytosolische Ca^{2+} -Ionen wirken.

ROS haben neben ihrer direkten Abwehrwirkung auch eine wichtige Signalfunktion (Lamb & Dixon, 1997, Bolwell, 1999, Scheel, 2001). Inhibierungsstudien mit Diphenyleniodonium (DPI) haben gezeigt, dass nicht nur die Akkumulation der ROS, sondern auch andere Aspekte der Abwehrantwort ausbleiben. In einigen Systemen löst die Applikation von H_2O_2 die Abwehrantwort aus (Levine *et al.*, 1994, Kovtun *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2001), in anderen die Behandlung mit O_2^- (Jabs *et al.*, 1997, Alvarez *et al.*, 1998).

Auch Stickstoffmonoxid stellt eine Signalkomponente in der Aktivierung von Abwehrgenen und der Auslösung des programmierten Zelltods bei der pflanzlichen Pathogenabwehr dar (Delledonne *et al.*, 1998, Durner *et al.*, 1998, Clarke *et al.*, 2000, Wendehenne *et al.*, 2001). Weitere Elemente der pflanzlichen Abwehr gegen Pathogene sind Phytohormone wie Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Anderson *et al.*, 1997, Dong, 1998, Reymond & Farmer, 1998, Thomma *et al.*, 1998, Klessig *et al.*, 2000, McDowell & Dangl, 2000).

Die Ähnlichkeit der Muster in der pflanzlichen Pathogenabwehr sowohl in basisresistenten als auch in kultivarspezifisch resistenten Pflanzen steht im Gegensatz zur strukturellen Vielfalt der verschiedenen Elicitoren (Ebel & Scheel, 1997). So scheint die Spezifität von Pflanze-Pathogen-Interaktionen im Wesentlichen auf der Ebene der Signalperzeption determiniert zu sein. Im Hinblick auf neue Strategien der Pflanzenzüchtung, z.B. die Übertragung von Perzeptionssystemen für Pathogene von resistenten Pflanzen auf ökonomisch wichtige, susceptible Pflanzen, wird den Rezeptoren große Beachtung geschenkt. Von besonderer Bedeutung sind dabei Gene, die für Elicitorrezeptoren von Nichtwirtspflanzen kodieren, deren Transformation in Kulturpflanzen (Wirtspflanzen) eine relativ stabile Form der Resistenz zu erzeugen verspricht (Nürnberger & Nennstiel, 1998, Nennstiel, 1998).

1.5 Die Interaktion von Petersilie und *Phytophthora sojae* – ein Modellsystem zum Studium der Nichtwirtsresistenz

Die Interaktion von Petersilie (*Petroselinum crispum* L.) mit dem Oomyceten *Phytophthora sojae* (*P. sojae*) zeigt die typischen Merkmale einer Nichtwirtsresistenz. Durch die Infektion von Petersiliekeimlingen mit Zoosporen des Oomyceten *P. sojae* werden umfangreiche Abwehrreaktionen ausgelöst, z.B. der hypersensitive Zelltod, die Kallosebildung, die

transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen und die Phytoalexinbildung (Hauffe *et al.*, 1986, Jahnen & Hahlbrock, 1988, Schmelzer *et al.*, 1989, Somssich *et al.*, 1989). Eine Roh-elicitorpräparation aus der Zellwand bzw. aus dem Kulturmedium des *in vitro* kultivierten Oomyceten ist in der Lage, in suspensionskultivierten Petersiliezellen bzw. -protoplasten einen Teil dieser Reaktionen zu aktivieren. Dazu gehören u.a. die Expression von PR-Proteinen und die Phytoalexinbiosynthese. Petersiliezellen und -protoplasten können im Vergleich zur Ganzpflanze als ein experimentell leicht handhabbares Modellsystem eingesetzt werden. Sie ermöglichen biochemische und molekularbiologische Studien an biologisch identischem Material, das in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Ein 42-kDa-Glykoprotein (GP42), das nichtkovalent mit der Oomyceten-Zellwand assoziiert ist und in Petersiliezellen die gleichen Abwehrreaktionen wie der oben beschriebene Roh-elicitor auslöst, wurde als eine elicitoraktive Komponente von *P. sojae* identifiziert. Die Abwehr induzierende Determinante wird durch die Primärstruktur des Proteins bestimmt (Parker *et al.*, 1988, Parker *et al.*, 1991). Durch proteolytische Spaltung von GP42 wurde ein elicitoraktives 13mer Peptid (Pep-13) freigesetzt, das sich als hinreichend und notwendig für die Elicitoraktivität des Glykoproteins erwies (Nürnberger *et al.*, 1994, Sacks *et al.* 1995).

Mit [¹²⁵I]-Pep-13 war es möglich, Bindungsstudien an Plasmamembranpräparationen von Petersiliezellen durchzuführen, wobei eine Ligandenbindungskonstante (K_d) von 2,4 nM ermittelt wurde (Nürnberger *et al.*, 1994). Durch Verwendung von proteinvernetzenden Substanzen wurde das Molekulargewicht des Rezeptorproteins mit 100 kDa ermittelt (Nürnberger *et al.*, 1995). Außerdem gelang die Anreicherung des Bindeproteins durch Affinitätschromatographie (Nennstiel *et al.*, 1998).

Zur Charakterisierung der Pep-13-Bindungsstelle wurde eine Serie von Strukturanaloga (Alaninsubstitutionen) von Pep-13 eingesetzt. Es erfolgte ein Vergleich dieser Pep-13-Analoga hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Bindung von [¹²⁵I]-Pep-13 zu kompetieren bzw. die Phytoalexinbiosynthese in Petersilieprotoplasten zu aktivieren. Dabei konnte gezeigt werden, dass Liganden mit hoher Kompetitoraktivität im Rezeptor-Bindungsassay auch eine hohe Elicitoraktivität im Phytoalexinassay besaßen. Beispielsweise führte die Substitution der aromatischen Aminosäure Tryptophan-2 durch Alanin zum Ausbleiben von Rezeptorbindung und Abwehraktivierung (Nürnberger *et al.*, 1994, Zimmermann *et al.*, 1997).

Zu den frühesten Abwehrreaktionen von Petersiliezellen nach Pep-13-Behandlung zählen ein transienter Influx von Ca^{2+} (Jabs *et al.*, 1997, Blume *et al.*, 2000), eine Alkalinisierung des Kulturmediums durch H^+ -Influx, sowie ein Efflux von K^+ und Cl^- (Scheel *et al.*, 1991, Nürnberger *et al.*, 1994). Diese Ionenflüsse, die hinreichend und notwendig für die Induktion späterer Abwehrantworten sind (Scheel *et al.*, 1991, Sacks *et al.*, 1993, Nürnberger *et al.*, 1994, Jabs *et al.*, 1997), gehen vermutlich auf die Aktivierung elicitorresponsiver Ionenkanäle zurück. Ein derartiger elicitorresponsiver Ca^{2+} -Kanal, der in der Plasmamembran lokali-

siert ist, konnte mittels „patch-clamp“-Technik identifiziert und charakterisiert werden (Zimmermann *et al.*, 1997). Durch den Einsatz einer Petersiliezelllinie, die das Gen für den Ca^{2+} -Indikator Aequorin stabil exprimiert, wurde gezeigt, dass die Elicitorbehandlung mit Pep-13 zu einer zweiphasigen Ca^{2+} -Antwort im Zytosol führt, und ein kausaler Zusammenhang zur Aktivierung der Abwehrreaktionen besteht. Innerhalb kürzester Zeit ist ein starker, transienter Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} (auf etwa 1 μM) zu beobachten, dem in einer zweiten Phase eine Stabilisierung der Ca^{2+} -Konzentration auf erhöhtem Niveau (300 nM), verglichen mit dem Basalniveau (50-70 nM), folgt. Interessanterweise stellt nur diese zweite Phase der Reaktion das für die Signalkaskade notwendige Element dar (Blume *et al.*, 2000).

Es wurde außerdem gezeigt, dass der Ca^{2+} -Influx notwendig für die Aktivierung der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ist. Der schnelle Anstieg der Konzentration der ROS im Kulturmedium wird wahrscheinlich durch die Aktivität einer NADPH-Oxidase hervorgerufen. Wird der Inhibitor DPI eingesetzt, so werden die Pep-13-induzierte Bildung der ROS und die Phytoalexinbildung verhindert, die Ionenkanäle sind dagegen weiterhin aktiv. Setzt man dem Kulturmedium O_2^- zu, so wird die Phytoalexinbiosynthese in Abwesenheit des Elicitors stimuliert. Dies erfolgt nicht bei H_2O_2 -Applikation. Offensichtlich hat O_2^- eine Signalfunktion in der Aktivierung der Pathogenabwehr. Kürzlich wurde ein Petersiliegen mit Homologie zur katalytischen Untereinheit der O_2^- produzierenden NADPH-Oxidase aus Phagozyten (gp91^{phox}) isoliert. Nach Expression der korrespondierenden cDNA in Hefe konnte eine enzymatische NADPH-Oxidase-Aktivität nachgewiesen werden (Zinecker, 2001).

Weiterhin konnten drei Pep-13-induzierte MAP-Kinasen identifiziert werden, deren Aktivierung durch Ionenkanalinhibitoren, nicht jedoch durch DPI inhibiert wurde (Ligterink *et al.*, 1997, Jabs *et al.*, 1997, Kroj, 1999). Daraus ist zu schließen, dass die elicitorinduzierte Aktivierung der MAP-Kinasen abhängig von den Ionenflüssen über die Plasmamembran ist. Sie liegt im Signalweg jedoch oberhalb oder parallel zur O_2^- -Bildung. Welche Rolle die MAP-Kinasen in der Aktivierung der Abwehrreaktionen spielen, ist derzeit offen. Für eine MAP-Kinase (MPK3) konnte aber gezeigt werden, dass sie in den Kern transloziert wird. Daher ist zu vermuten, dass sie dort ihr Substrat, z.B. Transkriptionsfaktoren findet, die durch die Aktivierung selbst die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen stimulieren können (Ligterink *et al.*, 1997).

Diese Pep-13-induzierten Prozesse bilden eine Kaskade, die in Abb. 1-1 dargestellt ist. Durch rezeptorvermittelte Elicitorbindung werden zuerst Ionenflüsse, anschließend der „oxidative burst“ und später die Phytoalexinakkumulation induziert (Jabs *et al.*, 1997). Die Beteiligung von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsreaktionen in verschiedenen Stufen der Signalkaskaden sind durch zahlreiche Inhibitorstudien belegt (Dietrich *et al.*, 1990, Conrath *et al.*, 1991, Renelt *et al.*, 1993, Blume *et al.*, 2000). Alle Pep-13-Analoga wurden auch auf ihre Fähigkeit untersucht, Ionenflüsse und den „oxidative burst“ zu induzieren. Dabei

wurde gezeigt, dass aktive Derivate, die an den Rezeptor binden und die Phytoalexinbiosynthese auslösen, auch aktiv in Bezug auf die Stimulierung der Ionenflüsse und die Bildung der ROS sind, inaktive hingegen nicht (Nürnbergger *et al.*, 1994, Blume *et al.*, 2000). MAP-Kinasen können auch direkt über den Pep-13-Rezeptor aktiviert werden. Ihre Rolle in der Signaltransduktion wird gegenwärtig untersucht.

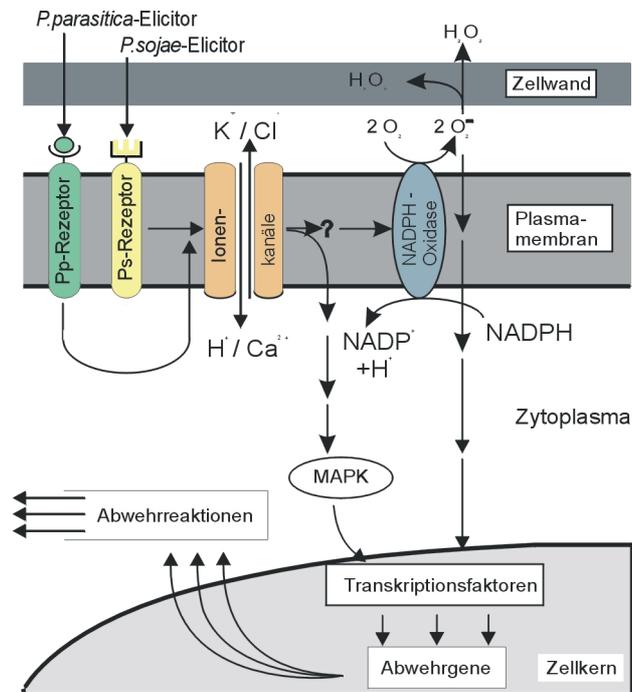


Abb. 1-1: Hypothetisches Modell der induzierten Signaltransduktion in Petersilie (modifiziert nach Jabs *et al.*, 1997)

1.6 Die Gattung *Phytophthora* – Phytopathogene mit hohem Schadenspotential

Der Begriff *Phytophthora* stammt aus dem Griechischen und bedeutet Pflanzenzerstörer. Traditionell zählte man die Oomyceten zu den Pilzen. Da sie sich jedoch strukturell und biochemisch von anderen Pilzklassen unterscheiden, werden sie heute mit einigen Braunalgen in eine eigene Gruppe, die Chromisten, eingeordnet (Dick, 1995, Alexopoulos *et al.*, 1996, Erwin & Ribeiro, 1996). Charakteristisch für diese Organismen ist das Fehlen von Chitin (Poly-N-acetylglucosamin) in der Zellwand und von Sterolen in den Membranen. Die Zellwand ist aus Zellulose und β -Glukanen aufgebaut (Fry, 1996).

Die meisten *Phytophthora*-Spezies verursachen Fäulnis in Wurzeln, Stängeln, Blättern und Früchten von Pflanzen, darunter auch landwirtschaftlich wichtige Kulturpflanzen. Einige, z.B. *Phytophthora parasitica* (*P. parasitica*), attackieren Hunderte verschiedener Kulturpflanzen. Andere, wie *Phytophthora infestans* (*P. infestans*), haben nur ein enges Wirtsspektrum (Kartoffel und Tomate), verursachen aber ebenfalls schwere Schäden in der Landwirtschaft. Der durch *Phytophthora*-Spezies jährlich allein in den USA verursachte wirtschaftliche Schaden wird auf mehrere Milliarden Dollar geschätzt und ist weltweit noch erheblich

höher (Erwin & Ribeiro, 1996). *P. infestans* ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule, die immer wieder zu großen Ernteverlusten führte. Bekannt ist unter anderem die Hungersnot in Irland um 1845, die durch große Verluste in der Kartoffelernte ausgelöst wurde. Von den Hauptnahrungsmittelpflanzen ist die Kartoffel auch heute noch von großen Ernteausfällen (ca. 20 %) betroffen, die durch Krankheiten, hauptsächlich durch die Kraut- und Knollenfäule verursacht werden (James, 1981). Der jährlich weltweit entstehende Schaden durch diese Krankheit wird auf ca. 5 Milliarden Dollar geschätzt.

Phytophthora-Infektionen sind schwer zu kontrollieren, da Oomyceten genetisch sehr flexibel sind und so gegen die meisten Fungizide Resistenzen entwickeln konnten (Davidse *et al.*, 1991, Spielmann *et al.*, 1991). Die Entdeckung neuer Pflanzenpathogene (Fry, 1996) macht außerdem deutlich, dass es weitere Pathogene in der Natur gibt, die noch nicht mit unseren Kulturpflanzen in Kontakt gekommen sind. Einige davon können möglicherweise erneut folgenschwere Epidemien auslösen. Daher ist es notwendig, nach alternativen Methoden zum Schutz von Nutzpflanzen vor dem Befall mit Oomyceten zu suchen. Zur Entwicklung solcher Strategien im integrierten Pflanzenschutz müssen zunächst die Signalprozesse zwischen Pflanze und Pathogen aufgeklärt werden. Dadurch können wichtige Bindeglieder in den Signalwegen, die zur Zerstörung des Wirts führen, erkannt werden. Dies schafft die Grundlage für die Entwicklung von Kontrollstrategien, die auf Eingriffen in diese Signalwege basieren. Solche Eingriffe können durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren aber auch durch genetische Modifikation des Wirts geschehen.

Bei der Interaktion von *P. parasitica* mit Petersiliezellen bzw. -protoplasten zeigen sich die typischen pflanzlichen Abwehrreaktionen, nämlich die Aktivierung von ROS, die Phytoalexinakkumulation und die Abwehrgenaktivierung. Außerdem werden Elemente der Signaltransduktionskaskade, z.B. Ionenflüsse, ein Anstieg der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration und MAP-Kinasen aktiviert. Es konnte durch Behandlung von Petersiliezellen mit einem Rohelicitor proteinogener Natur aus dem Kulturmedium des *in vitro* kultivierten Oomyceten gezeigt werden, dass ein qualitativ ähnliches Spektrum an Abwehrreaktionen wie durch Pep-13 aktiviert wird (vgl. Abb. 1-1). Unterschiede gibt es jedoch in Intensität und Kinetik der pflanzlichen Abwehr (Fellbrich *et al.*, 2000). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivierung der jeweiligen Signalkaskaden durch separate Perzeptionsmechanismen erfolgt.

1.7 Ziel dieser Arbeit

Dieser Arbeit vorausgegangene Studien haben ergeben, dass *P. parasitica* und andere *Phytophthora*-Spezies ebenfalls Elicitoren der Phytoalexinbiosynthese in Petersilie besitzen, die nicht identisch mit Pep-13 sind (Jahnen und Hahlbrock, 1988, Fellbrich *et al.*, 2000). Da die Infektion von Petersilie mit Zoosporen verschiedener *Phytophthora*-Spezies zur Ausprä-

gung einer hypersensitiven Reaktion führt (Jahnen und Hahlbrock, 1988), muss ein HR-Elicitor existieren. Um verschiedene Elicitorperzeptionssysteme studieren zu können und damit die Voraussetzung für die Analyse von Synergismen und Interferenzen verschiedener Signalwege zu schaffen, wurde ein Elicitor aus *P. parasitica* isoliert, der sowohl den hypersensitiven Zelltod als auch die *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen in Petersiliezellen induziert (Fellbrich, 2001). Es handelt sich dabei um das Elicitorprotein NPP1 (Nekrosenproduzierendes Protein aus *Phytophthora*). NPP1 ist nicht in der Lage, die Pep-13-Bindung an dessen Rezeptor zu kompetieren (Fellbrich, 2001), was auf die Existenz eines Pep-13-unabhängigen Perzeptionssystems in Petersilie hindeutet.

Die Sequenzen einiger Peptidfragmente von NPP1, die durch Proteaseverdau des Elicitorproteins erhalten wurden (Fellbrich, 2001), stellten den Ausgangspunkt dieser Arbeit dar. Da sich die biochemische Aufreinigung des Proteins als sehr aufwendig herausgestellt hatte (Fellbrich, 2001), sollte die PCR-gestützte Klonierung der für das Elicitorprotein kodierenden cDNA die Basis für die Herstellung von rekombinantem Protein bilden. Weitergehend sollte ein Element des Elicitorproteins NPP1 detektiert werden, das hinreichend und notwendig für die Elicitoraktivität ist. Dieser elicitoraktive Teil des Proteins sollte nach radioaktiver Markierung zur Charakterisierung einer putativen Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen eingesetzt werden. Durch chemische Proteinquervernetzung des radioaktiv markierten Liganden mit der putativen Bindungsstelle und nachfolgende Autoradiographie sollten Informationen über das Molekulargewicht des Bindungsproteins erhalten werden.

Neben diesen Studien sollten die experimentellen Voraussetzungen für die Inaktivierung des für NPP1 kodierenden Gens in *P. infestans* durch transgene Gegenstrangexpression geschaffen werden („gene silencing“). Die Analyse der Mutanten sollte Aufschluß über die endogene Funktion von NPP1 vermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Bioreagenzien

Die Laborchemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad und wurden, sofern nicht anders aufgeführt, von den Firmen Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Fluka (Deisenhofen), Riedel-de-Haën (Deisenhofen), Calbiochem (Bad Soden), Novabiochem (Bad Soden) und Difco (Detroit, USA) bezogen. Sterilfilter stammten von Sartorius (Göttingen). HPLC-reine Chemikalien lieferte J. T. Baker (Griesheim). Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten lieferten Stratagene (Heidelberg), Invitrogen (Groningen, Niederlande), Eurogentec (Seraing, Belgien), GibcoBRL (Eggenstein), Promega (Madison, USA) und Roche (Mannheim). Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (München) bezogen. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt. Radiochemikalien lieferte Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden).

2.2 Methoden zur Kultivierung, und Behandlung von Pflanzenmaterialien

2.2.1 Kultivierung von Petersiliezellkulturen

Zellsuspensionskulturen von Petersilie (*Petroselinum crispum* L.) wurden in modifiziertem Gamborg's B5-Medium mit 1 mg/ml 2,4-D (2,4-Dichlorphenoxyessigsäure) im Dunkeln bei 26°C geschüttelt (110 rpm/min) und alle 7 Tage in frisches Medium überführt (HA-Medium, Hahlbrock, 1975).

2.2.2 Präparation und Elicitorbehandlung von Petersilieprotoplasten

Die Isolierung der Petersilieprotoplasten erfolgte nach Dangl *et al.* (1987) mit 5 Tage alten Petersiliezellen.

Die Petersilieprotoplasten wurden nach ihrer Präparation unter sterilen Bedingungen mit B5-Saccharose-Medium (B5, 1 mg/ml 2,4-D, 0,4 M Saccharose, pH 5,5) auf eine Dichte von 5×10^5 Protoplasten/ml eingestellt. In Mikrotiterplatten mit geringer Eigenfluoreszenz (Cytoblate, Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden je 100 µl der Protoplastensuspension mit bis zu 6 µl Effektor für 24 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Zur Kontrolle der Elicitorbehandlung wurden die Petersilieprotoplasten mit einer Pep-13-Lösung behandelt (Nürnberger *et al.*, 1994), wobei die Endkonzentration des Elicitors 100 nM betrug.

Die Menge der durch die Petersilieprotoplasten gebildeten autofluoreszierenden Furanocoumarine (Phytoalexine) wurde nach 24 h Effektorbehandlung anhand der Fluoreszenz des

Kulturmediums (360 nm Excitation / 440 nm Emission) mit dem Cytofluor II (Biosearch, Bedford, USA) in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) bestimmt (Parker *et al.*, 1991).

2.2.3 Bestimmung der Vitalität der Petersilieprotoplasten

Die Vitalität der Petersilieprotoplasten wurde durch Doppelfärbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid bestimmt (Huang *et al.*, 1986). Der Vitalfarbstoff Fluoresceindiacetat wird nur in lebenden Protoplasten zu grün fluoreszierendem Fluorescein umgesetzt. Dagegen weist eine rote Fluoreszenz des Propidiumiodids im Zellkern auf tote bzw. membrangeschädigte Zellen oder Protoplasten hin, da Propidiumiodid die intakte Membran nicht passieren kann. Zu 100 µl Petersilieprotoplasten wurde 1 µl einer Fluoresceindiacetatlösung (5 mg/ml in Aceton) und 1 µl einer Propidiumiodidlösung (1 mg/ml) gegeben. Die Vitalität der Protoplasten konnte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica, Leitz DMLI, Wetzlar) bestimmt werden.

2.2.4 Mikrosomenpräparation aus Petersiliezellen

Mikrosomen wurden nach der Methode von Nürnberger *et al.* (1994) präpariert. Im Unterschied zum beschriebenen Protokoll wurden die mikrosomalen Membranen in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl resuspendiert.

2.2.5 Bestimmung der Ethylenakkumulation in Petersiliezellen nach Elicitorgabe

Durch die Behandlung von Petersiliezellen mit Elicitor wird die Ethylenbiosynthese induziert. Die Messung der freigesetzten Ethylenmenge (pmol/ml Zellkultur) erfolgte gaschromatographisch nach Chappell *et al.* (1984) in Zusammenarbeit mit Prof. Thomas Boller (Friedrich-Miescher-Institut Basel, Schweiz).

2.2.6 Elicitorbehandlung von Tabakpflanzen

In Blätter von 2-4 Wochen alten Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum*) wurden 40 µl der wässrigen Effektorlösung (2 µM) infiltriert. Die Nekrosebildung wurde nach 4-6 h durch Eintrocknen des Blattgewebes der Infiltrationsstelle sichtbar. 24-48 h nach Elicitorgabe waren die Nekrosen deutlich an der Gelb- bis Braunfärbung des Gewebes erkennbar.

2.3 Kultivierung verschiedener *Phytophthora*-Spezies

Zur Stammhaltung wurden alle verwendeten *Phytophthora*-Spezies auf Sakai-Medium (34 g Bohnenmehl, 17 g Hafermehl, 8,5 g Saccharose, 15 g Bactoagar ad 1 l H₂O) in 50 ml

Erlenmeyerschrägkölbcchen kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 16°C in der Dunkelheit. Nach 4-6 Wochen Kultivierung wurden Teile des Myzels auf frischem Medium subkultiviert.

2.3.1 Anzucht von *P. parasitica* in Flüssigkultur

Der Oomycet *P. parasitica*, Stamm 1828, von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (Braunschweig) wurde 4-6 Wochen auf 200 ml Flüssigmedium (Henninger, 1959) in Fernbachkolben bei 16°C in Dunkelheit angezogen.

2.3.2 Anzucht von *P. infestans* in Flüssigkultur

P. infestans, Stamm 88069 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Francine Govers, Wageningen Agricultural University, Niederlande), wurde 4-6 Wochen auf 200 ml Flüssigmedium (Henninger, 1959) in Fernbachkolben bei 18°C im Dunkeln kultiviert.

Kleine Kulturen von *P.-infestans*-Transformanten wurden auf modifiziertem Plich-Medium (0,5 g KH₂PO₄, 0,25 g MgSO₄, 1 g Asparagin, 1 mg Thiamin, 0,5 g Hefeextrakt, 10 mg β-Sitosterol und 25 g Glukose pro l unter Zusatz von 10 µg/ml Rifampicin) in Petrischalen (Ø 4 cm) für 1-2 Wochen bei 18°C in Dunkelheit angezogen.

2.3.3 Anzucht von *P. sojæ* in Flüssigkultur

Die Rasse 1 von *P. sojæ* von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur GmbH (Braunschweig) wurde 3-4 Wochen auf 200 ml flüssigem Asparaginmedium (Keen, 1975) in Fernbachkolben bei 16°C im Dunkeln kultiviert.

2.4 Molekularbiologische Arbeiten

Molekularbiologische Standardmethoden, die im Folgenden nicht einzeln erwähnt sind, wurden wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben durchgeführt.

2.4.1 Bakterienstämme und Plasmide

Für die molekularbiologischen Arbeiten wurden die folgenden *E.-coli*-Stämme (Tab.2-1) und Plasmide (Tab. 2-2) verwendet:

<i>E.-coli</i> -Stämme	Spezifikation	Referenz
DH5 α	supE44, Δ lacU169 (F80 lacI ^q ZAM15) hsdR17 recA1, end A1, gyrA96, thi-1 relA1	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
SURE	e14 ⁻ (mcrA), Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, umuC:Tn5(kan ^R) uvrC, supE44, lac, gyrA96, relA1, thi-1, endA1, [F', proAB ⁺ , lacI ^q ZAM15, Tn10(tet ^R)]	Invitrogen (Groningen, Niederlande)
BL21	F ⁻ ompT hsdSB(r _B -m _B ⁻)gal dcm	Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
BL21/D3	F ⁻ ompT hsdSB(r _B -m _B ⁻)gal dcm (DE3) pLysS (Cam ^R)	Invitrogen (Groningen, Niederlande)

Tab. 2-1: verwendete *E.-coli*-Stämme

Plasmid	Spezifikation	Wirt	Referenz
pGEM-T	f1ori, <i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , Sp6 und T7-Promotor	<i>E. coli</i> DH5 α , <i>E. coli</i> SURE	Promega (Madison, USA)
pGEX-5X-1	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI</i> q, tac-Promotor, RBS, GST	<i>E. coli</i> DH5 α , <i>E. coli</i> BL21	Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
pJC40	<i>colE1</i> ori, MCS, Amp ^r , <i>lacI</i> q, T7-Promotor, His10,	<i>E. coli</i> DH5 α , <i>E. coli</i> BL21D3	Clos <i>et al.</i> , 1994
pTH209	<i>colE1</i> ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , <i>HSP70</i> -Promotor, <i>Ham34</i> -Terminator, Neomycin ^r	<i>E. coli</i> DH5 α <i>P. infestans</i>	Judelson <i>et al.</i> , 1991

Tab. 2-2: verwendete Plasmide

2.4.2 Präparation und Behandlung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde aus Bakterien-Übernachtskulturen mit entsprechender Selektion unter Verwendung von „QIAprep“-Säulen der Firma Qiagen (Hilden) nach Herstellerprotokollen gereinigt.

Die Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern gespalten. Dazu wurden pro μ g DNA jeweils 5 Einheiten (5 U) Enzym zugesetzt und 1-3 h inkubiert (in der Regel bei 37°C).

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen (0,8-1,5 %) elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das Agarosegelblöckchen mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde ausgeschnitten. Unter Verwendung des „QIAquick gel extraction kit“ der Firma Qiagen (Hilden) wurde die entsprechende DNA nach Herstellerangaben reisoliert. Somit stand das gereinigte DNA-Fragment zur Klonierung in den gewünschten Vektor zur Verfügung.

2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) und Klonierung von PCR-Produkten

Für die PCR („Polymerase chain reaction“) wurden „Thermocycler“ der Firma Perkin Elmer (Boston, USA) verwendet. In der Regel wurde 1-10 ng DNA, 5 µM der jeweiligen Oligonukleotide, 20 nM dNTPs, 15 mM MgCl₂, 5 U/µl Taq-Polymerase und 10 x Reaktionspuffer nach Herstellerangaben (GibcoBRL, Eggenstein) im Volumen von 50 µl eingesetzt. Nach 1 min Denaturierung bei 94°C wurden 25-30 Zyklen von 20 s Denaturierung, 30 s Hybridisierung bei 45-68°C und 30 s bis 1 min 30 s Polymerisation bei 72°C durchlaufen. Anschließend wurde die Polymerisation 7 min bei 72°C fortgesetzt und darauf auf 4°C gekühlt. PCR-Produkte wurden mit „QIAquick-Säulchen der Firma Qiagen (Hilden) gereinigt und anschließend in den pGEM-T-Vektor kloniert. Dazu wurden Protokolle der Hersteller verwendet (Promega, Madison, USA).

Zur Klonierung gelelektrophoretisch gereinigter DNA-Fragmente (vgl. 2.4.2) wurden diese mit linearisiertem, dephosphoryliertem Vektor gemischt. Die DNA-Moleküle hybridisieren über kompatible einzelsträngige Bereiche und werden durch die T4-DNA-Ligase kovalent verbunden. Diese Reaktion erfolgte über Nacht bei 12°C.

Die Transformation der Plasmid-DNA in *E. coli* erfolgte nach Hanahan (1983).

2.4.4 RT-PCR

RT-PCR-Experimente zur Analyse der Transkriptakkumulation wurden unter der Verwendung von „Ready-to-goTM“-Beads (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde 1 µg Gesamt-RNA für die reverse Transkription eingesetzt (30 min, 42°C). Nach 5 minütiger Inkubation bei 95 °C wurde eine PCR-Reaktion nach 2.4.3 durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Fragmente wurden im 1,5 %igen Agarosegel analysiert.

2.4.5 DNA-Sequenzierung

PCR-Reaktionen zur Sequenzierung von DNA wurden mit dem „SequiTherm EXCELTM Long-ReadTM DNA Sequencing kit“ der Firma Epicentre Technologies, bezogen über BIOzym Diagnostik GmbH (Oldendorf), oder dem „ThermiSequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit“ der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) durchgeführt. Die Auftrennung und Analyse der Sequenzreaktion erfolgte mit einem DNA-Sequenzierautomaten (LICOR 4000L bzw. LONGREADER 4200) der Firma MWG-Biotech (München). Für die Detektion der DNA-Fragmente enthielten die verwendeten Oligonukleotide 5`-Fluoreszenzmarkierungen („IRD800“ bzw. IRD700“, MWG-Biotech, München).

2.4.6 Auswertung der Sequenzdaten

Zur Auswertung der Sequenzdaten wurde das Programm „DNASIS 2.1“ (Hitachi, Tokio, Japan) genutzt. Sequenzvergleiche mit Datenbanken erfolgten mit Hilfe von Programmen, die den BLAST-Algorithmus („Basic Local Alignment Search Tool“) verwenden (Altschul *et al.*, 1990, Altschul *et al.*, 1997). Genutzt wurde dazu der angebotene Service vom „National Centre for Biotechnological Information“ (www.ncbi.nlm.nih.gov).

2.4.7 Isolierung der NPP1-cDNA

2.4.7.1 Isolation von RNA und polyA⁺-RNA aus verschiedenen *Phytophthora*-Spezies

Die Isolation der RNA aus dem Myzel der Oomyceten erfolgte nach Logemann *et al.* (1987). PolyA⁺-RNA wurde unter Verwendung des „PolyA TractTM mRNA Isolation System“ der Firma Promega (Madison, USA) nach Herstellerprotokollen isoliert.

Die Qualität der RNA wurde durch gelelektrophoretische Analyse bestimmt. Für das Agarosegel wurde 1 g Agarose mit 10 ml 10 x MOPS (0,2 M MOPS, pH 7,0, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA) und 87 ml H₂O erhitzt. Nach Abkühlen wurde 5,1 ml 37 % Formaldehyd zugesetzt und das Agarosegel gegossen. Die RNA-Proben (2-5 µl) wurden mit 10-15 µl Probenpuffer (720 µl Formamid, 150 µl 10 x MOPS, 240 µl 37 % Formaldehyd, 100 µl H₂O, 100 µl Glycerol, 80 µl 10 % Bromphenolblau) gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach kurzer Inkubation bei 4°C wurden die Proben gelelektrophoretisch aufgetrennt (bei 50 V).

2.4.7.2 RACE-Reaktion („Rapid Amplification of cDNA Ends“)

Die Isolierung von 5'- und 3'-RACE-Fragmenten der NPP1-cDNA wurde mit dem „SMARTTM RACE cDNA Amplification kit“ der Firma Clontech (Palo Alto, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden die internen Oligonukleotide der cDNA des Elicitorproteins „RACE 5-1“ und „RACE 3-1“ (s. Anhang 1) sowie die Oligonukleotide des „SMARTTM RACE cDNA Amplification kit“ (5'-Race [5'CDS], 3'-Race [3'CDS], SmartII, UP, NUP, s. Anhang 1) und polyA⁺-RNA verwendet. Nach der reversen Transkription wurde eine vom Hersteller empfohlene „touch down“-PCR angewandt, ein Gradient mit 3 Stufen abfallender Temperatur (68°C, 64°C und 61°C) für die Hybridisierung der Oligonukleotide mit dem entsprechenden DNA-Fragment. Die erhaltenen 5'- und 3'-PCR-Fragmente wurden in den Vektor pGEM-T kloniert und sequenziert. Aus den erhaltenen Sequenzdaten wurden Oligonukleotide abgeleitet, die zur Isolierung der Gesamt-cDNA mittels PCR (vgl. 2.4.3) eingesetzt werden konnten (PpexpEcoRI/1, PpexpEcoRI/2 und PpexpXhoI/1, Anhang 2).

2.4.8 Isolierung von genomischer DNA aus *Phytophthora*-Myzel

Die Isolierung der genomischen DNA aus dem Myzel verschiedener *Phytophthora*-Spezies erfolgte nach Raeder & Broda (1985).

2.4.9 Bakterielle Expression von NPP1 und seiner Derivate

Zur bakteriellen Expression von NPP1 bzw. entsprechenden Derivaten wurden der Vektor pGEX-5X-1 (GST-Fusion) der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) und/oder der Vektor pJC40 (Histidin₁₀-Fusion, Clos *et al.*, 1994) verwendet. Die Expressionsprodukte ließen sich deshalb durch Affinitätschromatographie an Glutathion-Agarose (GSH-Agarose für GST-Fusion) bzw. Ni-NTA-Agarose (für His₁₀-Fusion) aufreinigen.

Die offenen Leserahmen wurden zur Einführung geeigneter Spaltstellen mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Die Nukleotidsequenzen der verwendeten Oligonukleotide für NPP1 und seine Derivate sind im Anhang 2 zusammengefasst. Von Einzelkolonien wurde Plasmid-DNA isoliert und sequenziert. Fragmente mit korrekter Sequenz wurden in die Vektoren pGEX-5X-1 und/oder pJC40 subkloniert. Die Suche nach positiven Kolonien erfolgte mittels PCR unter Einsatz genspezifischer Oligonukleotide. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde isoliert und mittels Restriktionsanalyse untersucht. Die erhaltenen Plasmide mit der korrekten Sequenz wurden in *E. coli* BL21 (pGEX-5X-1) oder in *E. coli* BL21D3 (pJC40) transformiert und Einzelkolonien zur Test-Expression eingesetzt.

2.4.9.1 Test-Expression

Zur Proteinexpression wurden 5 ml LB-Medium (10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl pro 1 H₂O) mit Ampicillinselektion (100 µg/ml) mit 500 µl einer Bakterien-Übernachtskultur beimpft und bei 37°C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert bis die OD₆₀₀ ca. 0,6 betrug. Die Induktion der Proteinbiosynthese erfolgte durch Zugabe von IPTG (0,4-2 mM). Anschließend wurden die Bakterien weitere 3 h bei 37°C (180 rpm) geschüttelt. Dann wurden je 2 ml der Expressionskultur in ein Mikrozentrifugengefäß überführt und pelletiert (10 min, 4000 x g). Das Bakterienpellet wurde in 2 x Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) aufgenommen und lysiert sowie 10 min bei 100°C inkubiert. Nach Zentrifugation (2 min, 10000 x g) wurden die Proben in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse der Proben erfolgte mit Coomassiefärbung (vgl. 2.6.3.2) und im Immunoblot (vgl. 2.6.4).

2.4.9.2 Präparative Expression

Übernachtskulturen der Bakterien wurden 100-fach in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 vermehrt. Zur

Induktion der Proteinbiosynthese wurde 0,4 mM IPTG zugesetzt. Anschließend wurde weitere 4 h bei 30°C (für GST-Fusionsproteine) oder 5 h bei 37°C (für His₁₀-Fusionsproteine) unter starkem Schütteln (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet (10 min, 4000 x g) und je nach Fusionsprotein weiter bearbeitet.

2.4.9.3 Affinitätsreinigung der Expressionsprodukte mittels Glutathion-Agarose

Die Bakterien wurden in PBS (10 mM NaH₂PO₄, 1,8 mM K₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 7,5) unter Zusatz von 10 mM DTT und 0,001% PMSF resuspendiert und Lysozym (Endkonzentration: 100 µg/ml) zugesetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde 10 % Laurylsarcosin (Endkonzentration: 1 %) zugesetzt. Nach Ultraschall-Behandlung (3 x 20 s, bei 4°C) wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (20 min, 4°C, 5000 x g) sedimentiert und der Überstand mit 10 % Triton-100 (Endkonzentration: 2 %) und GSH-Agarose (0,2 % v/v) versetzt. Nach 4-12-stündigem Schütteln bei 4°C wurde die GSH-Agarose durch Zentrifugation (2 min, 4°C, 2000 x g) abgetrennt. Anschließend wurde die GSH-Agarose 3 mal mit 1 M NaCl in PBS und 5 mal mit PBS gewaschen. Eluiert wurde das Fusionsprotein durch 10-minütige Behandlung der GSH-Agarose mit Elutionspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 8, 10 mM Glutathion). Die Abspaltung der Glutathion-S-Transferase (GST) erfolgte durch 16-stündige Inkubation bei RT mit der Protease Faktor Xa (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden), wobei 10 U Protease pro mg Protein eingesetzt wurden. Anschließend wurde das Protein durch Dialyse gegen H₂O entsalzt und konnte nach der Bestimmung des Proteingehaltes (vgl. 2.6.1) für biologische Tests eingesetzt werden.

2.4.9.4 Affinitätsreinigung der Expressionsprodukte mittels Ni-NTA-Agarose

Resuspendiert wurden die Bakterien in 45 ml Puffer 1 (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 8 M Harnstoff, pH 8,0). Nach 15 bis 30 min Inkubation bei RT wurden die Zellfragmente durch Zentrifugation (20 min, RT, 5000 x g) abgetrennt. Nach Zugabe von Imidazol (Endkonzentration: 20 mM) und Ni-NTA-Agarose (0,2 % v/v) wurde 3-4 h bei RT geschüttelt. Die Ni-NTA-Agarose wurde durch Zentrifugation (2 min, RT, 2000 x g) abgetrennt und unspezifisch gebundene Proteine wurden durch 4 Waschschrte entfernt. Die dazu verwendeten Puffer waren: Puffer 2 (50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 8 M Harnstoff, pH 6,3), Puffer 2 (2 M Harnstoff), Puffer 2 (0,5 M Harnstoff), Puffer 2 (0,1 M Harnstoff). Eluiert wurde das Protein durch Zugabe von 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaCl, 250 mM Imidazol (2 mal). Nach Dialyse gegen H₂O wurde der His₁₀-Teil des Proteins durch Faktor Xa (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) abgespalten.

2.5 Proteinchemie

2.5.1 Peptidsynthese

Die Synthese der verwendeten Peptide erfolgte mit dem Economy Peptide Synthesizer EPS 221 der Firma ABIMED (Langenfeld) nach dem Protokoll des Herstellers. Es handelt sich um einen automatischen Durchflusssyntheseapparat, in dem Säulen (Amid-Träger oder Fmoc-Aminosäure-Träger) der Firma ABIMED (Langenfeld) verwendet wurden. Nach der Synthese wurden die Peptide vom Trägerharz abgespalten (90 % Trifluoressigsäure, 5 % H₂O, 5 % Triethylsilan), durch Zugabe von 5 Volumen tert.-Butylmethylether bei 0°C gefällt, in Wasser resuspendiert und lyophilisiert. Die Reinheit der Peptide wurde mittels „Reversed-phase“-HPLC und die Aminosäuresequenz durch Peptidsequenzierung überprüft (Nennstiel *et al.*, 1998).

Peptid	Sequenz
Pep-13	VWNQPVRGFKVYE
Peptid 1	NGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCK
Peptid 9	AVSPSAHSGYNIYPPESNTIDGYSKVDY
PKA-Peptid	RHMKLEFLRRASLGDVISH

Tab. 2-3: synthetisierte Peptide

2.5.2 Peptidsequenzierung

Die N-terminale Sequenzierung der Peptide erfolgte auf einem G1000A Proteinsequencer (Hewlett Packard, Avondale, USA) mit Chemikalien und nach Protokollen des Herstellers.

2.5.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Für die analytische HPLC-Trennung von Peptiden und Proteinen wurde eine Vydac C4-Säule (300Å, 5 µm, 4,6 x 250, The Separation Group, Hesperia, CA) auf einer HP1100 (Agilent Technologies, Waldbronn) verwendet. Die Detektion der Peptide erfolgte bei 214 nm und 280 nm über einen Diodenarraydetektor (nach Nennstiel *et al.*, 1998).

2.5.4 Antikörperproduktion

Die für die Antikörperproduktion synthetisierten Peptide (Peptid 1 und Peptid 9, vgl. Tab. 2-3) wurden von der Firma Eurogentec (Seraing, Belgien) an BSA gekoppelt und für die Immunisierung von jeweils einem Kaninchen pro Peptid verwendet. Die Bereiche aus denen die Peptide gewählt wurden, waren nach Jameson-Wolf-Analyse (Jameson & Wolf, 1988) als besonders antigen eingestuft worden. Nach der ersten Immunisierung der Kaninchen wurde die Injektion nach 14, 28 und 56 Tagen wiederholt. Es wurde Blut vor der Immunisierung

(Präimmunserum) und 38, 66 und 80 Tage nach der ersten Injektion entnommen. Nach Tests der Güte der Antikörper wurde in allen Experimenten der Antikörper AK152 vom Peptid 1 in einer Verdünnung von 1:5000 verwendet, da der AK168 vom Peptid 9 unspezifische Banden detektierte.

Die verwendeten sekundären Anti-Kaninchen-Antikörper gekoppelt mit alkalischer Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase stammten von der Firma BioRad (Hercules, USA), der mit alkalischer Phosphatase gekoppelte Anti-Ziege-Antikörper wurde von Sigma (Deisenhofen) bezogen.

2.6 Proteinanalytische Methoden

2.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinbestimmungen erfolgten mit dem BCA-Proteinassay-Reagenz der Firma Pierce (Rockford, USA), dem beiliegenden Protokoll folgend. Der Proteingehalt wurde anhand einer mit BSA (0-20 µg) erstellten Eichkurve ermittelt.

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In Minigelapparaturen „Mighty Small“ der Firma Hoefer (San Francisco, USA) wurden 10-15 %ige Polyacrylamidgele vorbereitet, die nach Protokollen von Laemmli (1970) hergestellt wurden. Die präparierten Proteinextrakte wurden mit 0,2 Volumen 5 x Probenpuffer (500 mM Tris/HCl, pH 6,8, 25 % Glycerol, 10 % SDS, 25 % β -Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau) versetzt und 5 min auf 95°C erhitzt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine bei 10-60 mA wurden die Gele gefärbt oder auf Nylon-Membranen (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren) transferiert.

2.6.3 Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE

2.6.3.1 Silberfärbung

Zur Färbung der Proteinbanden mit Silbernitrat (Blum *et al.*, 1987) wurden die Polyacrylamidgele für 30 min in Fixierer (50 % Methanol, 12 % Essigsäure) inkubiert und anschließend für 3 x 20 min in 50 % Ethanol neutralisiert. Es folgte eine einminütige Inkubation mit 0,02 % Natriumthiosulfat. Nach kurzem Waschen mit Wasser (3 x 20 s) wurde für 20 min mit Silbernitratlösung (2 g/l AgNO₃, 0,1 % Formaldehyd) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde das Gel mit Entwickler (60 g/l Na₂CO₃, 0,05% Formaldehyd) gefärbt und die Farbreaktion durch Ansäuern mittels Zugabe von Fixierer beendet.

2.6.3.2 Coomassiefärbung von Proteinen

Zur Färbung wurden die Polyacryamidgele mit „Coomassie Blue G250“-Lösung (0,25 g Coomassie Blue G250, 45 % Methanol, 45 % Wasser, 10 % Essigsäure) 1 h inkubiert und anschließend mit Entfärberlösung (45 % Methanol, 45 % Wasser, 10 % Essigsäure) wieder entfärbt.

Zur Aufbewahrung wurden die Gele über Nacht in 5 % Methanol, 1 % Glycerol inkubiert und anschließend zwischen 2 Cellophanblättern getrocknet.

2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Nach der SDS-PAGE wurden Proteine durch „Semi-Dry“-Transfer mit einer Apparatur von BioTech Fischer (Reiskirchen) auf Nitrozellulosemembranen (Porablot NCL, Macherey-Nagel, Düren) übertragen. Der Transfer erfolgte nach Burnette (1981) bei einer Stromstärke von 1 mA/cm^2 Membran über 2 h. Der Aufbau des Blots geschah von der Anode zur Kathode in der Reihenfolge: 2 Lagen dickes, in Puffer 1 (300 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % Methanol) äquilibriertes Filterpapier, 1 Lage in Puffer 2 (25 mM Tris/HCl, pH 10,4, 20 % Methanol) getränktes dickes Filterpapier, die in Puffer 2 äquilibrierte Nitrozellulosemembran, das vom Sammelgel befreite Proteingel sowie 3 Lagen dickes, in Puffer 3 (25 mM Tris/HCl, pH 9,4, 20 % Methanol, 40 mM 6-Aminocapronsäure, 0,01 % SDS) getränktes Filterpapier. Membran und Filterpapier hatten Gelgröße. Die Kontrolle des Transfers erfolgte durch gefärbte Markerproteine der Firma BioRad (Hercules, USA). Die Membranen wurden mit 5 % fettfreier Trockenmilch in PBS (80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 , 100 mM NaCl, pH 7,5) 2-12 h geblockt. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem entsprechenden Antiserum in Blocklösung. Nach intensivem Waschen (mindestens 3 x 20 min) mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (ein Konjugat mit alkalischer Phosphatase (AP) oder Meerrettich-Peroxidase). Im Anschluss wurde erneut mindestens 3 x 20 min mit PBS gewaschen. Für die Reaktion der alkalischen Phosphatase wurde die Membran 3 min in AP-Reaktionspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit frisch bereiteter Substratlösung nach Angaben des Herstellers (NBT-BCIP, Promega, Madison, USA) überschichtet und im Dunkeln inkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von Wasser. Für die Detektion mittels „Meerrettich“-Peroxidase gekoppelter Antikörper wurde der „ECL Plus Kit“ der Firma Amersham-Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden) verwendet, wobei ebenfalls nach den Instruktionen des Herstellers verfahren wurde. Durch Chemilumineszenz konnten die entsprechenden Proteinbanden auf Röntgenfilmen (Kodak, Rochester, USA) detektiert werden.

2.8 Radioaktive Markierung von NPP1

2.8.1 Iodierung von NPP1

Die Iodierung von NPP1 erfolgte mit Hilfe von „Iodobeads“ der Firma Pierce (Rockford, USA) nach den Angaben des Herstellers. Die Reaktionsperlen wurden in PBS (10 mM NaH_2PO_4 , 1,8 mM K_2HPO_4 , 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, pH 6,8) äquilibriert und danach wieder getrocknet. Anschließend wurden 0,25 nmol, 0,5 nmol oder 1 nmol NaI zugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT oder 4°C wurden 0,5 nmol NPP1 zugesetzt. Nach 0, 15, 30 und 90 s, sowie nach 2 und 5 min Inkubation bei RT oder 4°C wurde die Iodierung durch Entfernen der Reaktionsperlen beendet.

Des Weiteren wurde eine andere Methode zur Iodierung des Proteins eingesetzt. Dazu wurden mit „IODOgen“ beschichtete Reaktionsgefäße der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Die Aktivierung von NaI, d.h. die Bildung von I^+ , erfolgte durch Zugabe von NaI zum Oxidationsmittel in das beschichtete Reaktionsgefäß. Anschließend wurde das aktivierte I^+ aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in ein neues Gefäß zum zu iodierenden Protein His₁₀-NPP1 gegeben. Die Iodierung erfolgte mit 0,5 nmol NPP1 und 0,25 nmol bzw. 0,5 nmol NaI nach den Angaben des Herstellers in 100 µl Ansätzen, wobei eine Zeitabhängigkeit der Reaktion (0, 30 s, 1, 5 und 10 min) untersucht wurde.

Aliquots von beiden Iodierungsverfahren wurden jeweils in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert.

2.8.2 [³⁵S]-Markierung von NPP1

Für die Markierung des Proteins mit [³⁵S] wurden die Expressionskulturen während der Proteinbiosynthese vor IPTG-Gabe mit [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein (Verhältnis: 80/20) behandelt (vgl. auch 2.4.9).

Übernachtskulturen der Bakterien wurden 100-fach in LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin) verdünnt und unter Schütteln (180 rpm) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien bei RT zentrifugiert (10 min, 2000 x g) und das Bakterienpellet in Wasser resuspendiert. Nach weiterer 4-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien erneut zentrifugiert (RT, 10 min, 2000 x g) und im gleichen Volumen M9-Medium (50 mM Na_2HPO_4 , 10 mM KH_2PO_4 , 10 mM NH_4Cl , 5 mM NaCl, 1 mM MgSO_4 , 0,1 mM CaCl_2 , 20 % Glukose) aufgenommen. Nach weiterer 2-stündiger Inkubation bei 37°C oder Übernachtskultivierung bei 30°C wurden 20 mM aller Aminosäuren (außer Methionin) zugegeben und es wurde wieder bei 37°C inkubiert. Zur Induktion der Proteinbiosynthese wurden 0,4 mM IPTG zugesetzt. Gleichzeitig wurde 10 µCi [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein pro ml Zellen appliziert. Nach 20-minütiger Inkubation erfolgten die Zugabe von Rifampicin (200 µg/ml) und eine 10-minütige Inkubation bei 42°C im Wasserbad. Anschließend wurden

die Bakterien weitere 4 h bei 37°C stark geschüttelt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (10 min, RT, 4000 x g) geerntet und das markierte Protein wurde nach Aufschluss der Bakterien durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (vgl. 2.4.9.4).

2.8.3 Radioaktive Phosphorylierung von NPP1

2.8.3.1 Klonierung von PKA-NPP1

Die Phosphorylierung des Proteins wurde durch Einbau einer spezifischen Phosphorylierungsstelle ermöglicht. Ein Peptid der Sequenz LRRASLG wurde durch die entsprechenden Oligonukleotide PKA1 und PKA2 (s. Anhang 2) in einer PCR-Reaktion N-terminal bzw. C-terminal mit dem NPP1-Expressionsprotein fusioniert. Die Klonierung erfolgte in den Vektor pJC40 als His₁₀-Fusion, was die Aufreinigung des Expressionsproduktes durch Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose ermöglichte.

2.8.3.2 Phosphorylierungsreaktion

Zur Phosphorylierungsreaktion wurde die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) der Firma New England Biolabs (Beverly, USA) verwendet. Äquimolare Mengen von Protein und [γ -³²P]ATP sowie 1 U PKA Enzym/pmol Protein wurden für die Reaktion eingesetzt, die routinemäßig für 2-3 h bei 30°C erfolgte. In einigen Experimenten wurden Inkubationszeiten bis 5 h untersucht.

2.8.3.3 Dünnschichtchromatographische Analyse der Phosphorylierungsreaktion

Zur Analyse der Phosphorylierungsexperimente wurden Aliquots der Reaktionsansätze dünnschichtchromatographisch untersucht (nach Kieffer *et al.*, 1993). Je 2 µl eines Ansatzes wurden auf Polyethylenimin-Zellulose-beschichtete (PEI-Zellulose) Glasplatten (10 x 20 mm) der Firma Merck (Darmstadt) aufgetragen. Als Laufmittel diente 0,8 M NaH₂PO₄, pH 4. Die Chromatographie erfolgte für 1 h bei RT. Nach dem Lauf wurde die Platte leicht getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen (30 min).

2.8.3.4 Filtrationsassay zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität von [³²P]-NPP1

Der Phosphorylierungsreaktionsansatz wurde mit 25 % TCA und 1 % Casaminsäuren für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend durch einen Whatman GF/B Glasfaserfilter (Whatman, Maidstone, England) auf einer Schleicher & Schuell Manifold Filtrationseinheit

(Dassel, Deutschland) filtriert. Das auf dem Filter gebundene präzipitierte Protein wurde 2 mal mit 5 ml eiskalter 5 %iger TCA gewaschen. Anschließend wurde die filtergebundene Radioaktivität durch Scintillationsspektrometrie in 3 ml Aquasol (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) bestimmt. Die Hintergrundaktivität (unspezifische Bindung von [γ - ^{32}P]ATP) wurde im Phosphorylierungsansatz ohne Zusatz der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) bestimmt. Die spezifische Radioaktivität wurde als Differenz beider Werte errechnet.

2.9 Bindungsstudien mit radioaktivem NPP1

2.9.1 Bindungsaktivität im Filtrationsbindungsassay

Mikrosomen (300 μg) wurden in 100 μl Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0,1 % BSA, 100 μM Leupeptin) resuspendiert und die Bindung des Elicitors an die Bindungsstelle wurde durch Zugabe von 2 und 10 nM [^{32}P]-NPP1-PKA1 bzw. [^{32}P]-NPP1-PKA2 gestartet. Nach 60-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Bindung durch Zugabe von 5 ml eiskaltem Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl) gestoppt und der freie Ligand von rezeptorgebundenem Liganden durch Filtration durch einen Whatman GF/B Glasfaserfilter (Whatman, Maidstone, England) auf einer Schleicher & Schuell Manifold Filtrationseinheit (Dassel) getrennt. Die Filter wurden 2 mal mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Radioaktivität auf den Filtern durch Scintillationsspektrometrie ermittelt. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart von 2 μM unmarkiertem NPP1 bestimmt.

2.9.2 Proteinvernetzung zur Detektion einer Bindungsstelle

Für die Proteinvernetzung mit dem homobifunktionellen Reagenz BS_3 (Bis-(Sulfo-succinimidyl)suberat, Pierce, Rockford, USA) wurden Petersiliemikrosomen (300 μg) in Bindungspuffer mit 2 nM [^{32}P]-NPP1 (+/- 2 μM NPP1 als Kompetitor) für 60 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mikrosomen pelletiert (90 s, 10000 x g), das Pellet wurde mit 1 ml Bindungspuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (90 s, 10000 x g) in 100 μl Bindungspuffer resuspendiert. Die Proteinquervernetzung wurde durch Zusatz von BS_3 (8 mM) gestartet und die Reaktion für 30 min bei RT durchgeführt. Die Ansätze wurden jeweils mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert.

2.10 Elektrophysiologische Untersuchungen an planaren Lipidbilayern

Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Birgit Klüsener (Ruhr-Universität Bochum) nach Klüsener & Weiler (1999) durchgeführt. In der Öffnung einer Pipette bildet sich durch Eintauchen in eine Lipidlösung eine proteinfreie Lipiddoppelmembran aus 80 % 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphatidylcholin und 20 % 1,2-Dioleoyl-glycero-3-phosphatidylethanolamin. In einer Küvette befindet sich 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0. Mittels Elektroden wird ein elektrisches Potential an die Küvette angelegt. Gibt man einen Porenbildner in eines der Kompartimente, wird es den vorhandenen Ionen ermöglicht, die Membran durch eine gebildete Pore zu passieren, was man durch die Bestimmung der Leitfähigkeit ermitteln kann. Für die Experimente wurden wässrige Lösungen (5-10 μ M) von NPP1 und GST als Kontrolle verwendet (Endkonzentration: 10-20 nM).

2.11 Transformation von *Phytophthora infestans* mit NPP1-cDNA

Die Transformation von *P. infestans* erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Irma Vijn, im Labor von Prof. Francine Govers (Wageningen Agricultural University, Niederlande), modifiziert nach van West *et al.* (1999).

2.11.1 Präparation von Zoosporen

Zur Elektrotransformation wurden Zoosporen von *P. infestans* präpariert. Dazu wurden vier 15 cm Roggen/Saccharose-Medium-Petrischalen (Medium nach van West *et al.*, 1998) mit dem entsprechenden Stamm (*P. infestans* 88069) beimpft und bei 18°C im Dunkeln inkubiert. Nach 8-10 Tagen wurde zu jeder Petrischale 25 ml vorgekühltes (10°C), modifiziertes Petri-Medium (0,25 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, 1 mM KH₂PO₄, 0,8 mM KCl) gegeben. Die mit Parafilm verschlossenen Petrischalen wurden für 2,5–3 h bei 10°C gelagert.

Anschließend wurde die Flüssigkeit mit einer sterilen Pipette abgenommen und über einen 50 μ m Filter in ein Becherglas gegeben. Nach kurzem Mischen wurde die Suspension in 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 1/50 Vol. 5 M LiCl zugegeben. Nach vorsichtigem Invertieren wurde zügig aber vorsichtig mit 5 ml 33 %igem Percoll in modifiziertem Petri-Medium unterschichtet. Danach wurde mit 5 ml 140 % Percoll (unter der Sterilbank einengen bis 140 % erreicht sind) unterschichtet. Exakt 5 min nach Zugabe des 5 M LiCl wurde die Zentrifugation (4°C, 5 min, 1200 x g) gestartet.

Nach der Zentrifugation war ein brauner Ring der Zoosporen zu erkennen. Es wurde zuerst die 140 %ige Percoll-Schicht mit einer langen Pipette entfernt. Anschließend konnten die Zoosporen entnommen und in ein gekühltes 10 ml Gefäß überführt werden.

2.11.2 Elektrotransformation und Regeneration der Transformanten

10 µg linearisierte NPP1-cDNA von *P. infestans* im Vektor pGEM-T und 10 µg des Resistenzplasmids pTH209 (Judelson *et al.*, 1991) wurden in Elektroporationsküvetten (4 mm, Invitrogen, Groningen, Niederlande) auf Eis vorgelegt.

Nach Zugabe von 500 µl Zoosporen ($0,5-2 \times 10^7$) wurde 2-3 mal auf und ab pipettiert, um die DNA mit den Zoosporen zu mischen. Die Elektroporation erfolgte bei 500 V, 50 µF. Zügig wurden die Zoosporen in 15 ml Regenerationsmedium (flüssiges Roggen/Saccharose-Medium (nach van West *et al.*, 1998) mit 100 mM Mannitol, 1 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 250 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Vancomycin, 10 µg/ml Amphotericin B) gegeben und 12 h bei 18°C im Dunkeln gelagert.

Nach 24-48 h bei 18°C wurden die regenerierten Zoosporen auf Selektivmedium (Roggen/Saccharose-Agar mit 1 µg/ml Geneticin, 250 µg/ml Ampicillin, 10 µg/ml Rifampicin, 25 µg/ml Vancomycin, 10 µg/ml Amphotericin B) ausplattiert (7 ml Regenerationsmedium pro 15 cm Petrischale) und bei 18°C im Dunkeln kultiviert. 24-36 h danach wurde die überschüssige Flüssigkeit vorsichtig abgenommen und verworfen. 10-14 d später waren wachsende Kolonien sichtbar. Sie wurden auf neuen Roggen/Saccharose-Agar mit höherer Antibiotikakonzentration übertragen und erneut bei 18°C in Dunkelheit kultiviert.

Putative Transformanten wurden zur Analyse der gebildeten Proteine im Immunoblot (vgl. 2.6.4) und zur Isolierung von RNA für eine RT-PCR (vgl. 2.4.7.1, 2.4.4) und genomischer DNA (vgl. 2.4.8) in 4 cm Petrischalen in Plich-Medium kultiviert (vgl. 2.3.2).

3 Ergebnisse

Studien zur Signalperzeption und –transduktion erfordern eine ausreichende Menge einer homogenen Ligandenpräparation. Deshalb war es erforderlich, das für den Elicitor NPP1-kodierende Gen zu klonieren, das Protein in *E. coli* zu exprimieren und durch Affinitätschromatographie zu reinigen. Weiterhin sollten partielle cDNA-Fragmente von NPP1 dazu dienen, ein Minimalmotiv zu finden, das hinreichend und notwendig für die Elicitoraktivität ist. Ziel war es, neben dem elicitoraktiven Pep-13 aus *P. sojae*, ein weiteres Signalmolekül für Rezeptor-Liganden-Bindungsexperimente zur Verfügung zu haben, um Perzeptionsmechanismen und den Aufbau bzw. die Interferenz von Signalwegen, die von unterschiedlichen Elicitoren ausgelöst werden, zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Pep-13 an mikrosomale Membranen aus Petersilie nicht durch NPP1 kompetiert wird (Fellbrich *et al.*, 2000), so dass die Vermutung der Existenz eines Pep-13-unabhängigen Perzeptionssystems für NPP1 nahe lag.

Weiterhin wurden erste Experimente durchgeführt, die Hinweise auf die endogene Funktion des Elicitorproteins geben können. Dies sollte durch Inaktivierung des für NPP1-kodierenden Gens durch transgene Gegenstrangsynthese („gene silencing“) im Oomyceten *P. infestans* erfolgen (nach van West *et al.*, 1999).

3.1 Klonierung der cDNA für das *P.-parasitica*-Elicitorprotein NPP1

Zur Klonierung der für NPP1-kodierenden cDNA wurden Proteinsequenzinformationen benötigt. Das aus dem Kulturmedium des Oomyceten *P. parasitica* gereinigte Elicitorprotein wurde mit der Endoproteinase Glu-C proteolytisch gespalten und das Peptidgemisch durch „Reversed-phase“-HPLC aufgetrennt. Die dabei isolierten Peptide wurden sequenziert (Fellbrich, 2001). Aus der Aminosäuresequenz von 3 Peptiden (ELI1, ELI2 und ELI3), die in Abb. 3-1 gelb unterlegt sind, wurden degenerierte Oligonukleotide (eli1, eli2 und eli3, s. Anhang 1) abgeleitet und zur PCR-Reaktion eingesetzt. Der Einsatz der Oligonukleotide eli2 und eli3 ergab ein PCR-Fragment von 534 bp, welches kloniert und sequenziert wurde. Aus den erhaltenen Nukleotidsequenzdaten konnten weitere Oligonukleotide (RACE3-1, RACE5-1, s. Abb. 3-1 blau unterlegt und Anhang 1) abgeleitet werden. Sie wurden in Kombination mit dem Oligonukleotid UP (Clontech, Palo Alto, USA, s. Anhang 1) zur 5'- und 3'-RACE-Reaktion eingesetzt, um die unbekannt Bereiche der für NPP1 kodierenden cDNA des 5'- bzw. 3'-Terminus zu isolieren. Dabei wurde die vom Hersteller empfohlene „touch down“-PCR angewandt. In einem Gradienten wurden 3 Stufen abfallender Temperatur (68°C, 64°C und 61°C) für die Hybridisierung der Oligonukleotide mit der zu amplifizierenden DNA verwendet. Anschließend wurde eine zweite PCR-Reaktion durchgeführt, in welcher die PCR-

Fragmente der ersten Reaktion als Ausgangsmaterial zur Amplifikation eingesetzt wurden. Neben den Oligonukleotiden RACE3-1 und RACE5-1 kam in dieser PCR-Reaktion das Oligonukleotid NUP (Clontech, Palo Alto, USA, s. Anhang 1) zum Einsatz. Die erhaltenen DNA-Fragmente für den 5'- und den 3'-Bereich der für NPP1 kodierenden cDNA wurden ebenfalls kloniert und sequenziert. Die daraus abgeleiteten Oligonukleotide PpexpEcoRI/1 und PpexpXhoI/1 (Abb. 3-1 orange unterlegt und Anhang 2) waren die Voraussetzung für die Isolierung der vollständigen NPP1-cDNA mit einem offenen Leserahmen von 714 bp (Abb. 3-1).

1	ATG AAC GTC CTT ACG TTC	CTC ATA GCA GCC GCA GTA TCA CTC GCT	45	PpexpEcoRI/1
	<i>M N V L T F</i>	<i>L I A A A V S L A</i>		
46	GTC GTC CAA GCC GAC GTG ATC TCG	CAC GAT GCC GTT GTC CCG TTC	90	ELI1
	<i>V V Q A D V I S</i>	<i>H D A V V P F</i>		
91	GCC CAA CCC ACA GCC ACC ACT ACG	GAA CAG AAG GCT GGT GTC AAG	135	
	<i>A Q P T A T T T</i>	<i>E Q K A G V K</i>		
136	TTC AAA CCG CAG ATC CAC ATC TCG	AAC GGC TGT CAT CCG TAT CCT	180	ELI2
	<i>F K P Q I H</i>	<i>I S N G C H P Y P</i>		
181	GCA GTG GAT GCG AAC GGC AAT ACC	AGT GGC GGT CTG AAG CCT ACC	225	RACE 3-1
	<i>A V D A N G N T</i>	<i>S G G L K P T</i>		
226	GGT TCC TCT AGT GCG GGC TGC AAG	GGC TCC GGA TAC GGC AGT CAA	270	
	<i>G S S S A G C K</i>	<i>G S G Y G S Q</i>		
271	GTC TAC GGT CGA GTG GCT ACG TAC	AAT GGC GTC TAC GCT ATC ATG	315	
	<i>V Y G R V A T Y</i>	<i>N G V Y A I M</i>		
316	TAC TCG TGG TAT TTC CCT AAG GAC	TCG CCA GTC ACT GGA CTG GGG	360	
	<i>Y S W Y F P K D</i>	<i>S P V T G L G</i>		
361	CAT CGC CAC GAC TGG GAG CAC GTG	GTC GTC TGG GTC GAC GAT ATC	405	
	<i>H R H D W E H V</i>	<i>V V W V D D I</i>		
406	AAA CTC GAT AGT CCG TCG ATC ATC	GCT GTG TCG CCT TCT GCC CAC	450	
	<i>K L D S P S I I</i>	<i>A V S P S A H</i>		
451	AGT GGC TAC AAC ATC TAC TAT CCA	CCC GAA TCC AAC ACC ATC GAC	495	
	<i>S G Y N I Y Y P</i>	<i>P E S N T I D</i>		
496	GGC TAC AGT GCC AAG GTG GAC TAC	TCG TCC AGT TGG GTG GTG ATC	540	
	<i>G Y S A K V D Y</i>	<i>S S S W V V I</i>		
541	AAT CAC GCG CTG GAC AGC ACG ACG	GAC GCT GGA GAA ACC CAG GAT	585	RACE 5-1
	<i>N H A L D S T T</i>	<i>D A G E T Q D</i>		
586	CTG ATC ATG TGG GAT CAA	CTC ACG GAC GCA GCA CGC ACG GCG	630	
	<i>L I M W D Q L T</i>	<i>D A A R T A L</i>		
631	GAA AAT ACG GAC TTC GGC GAC GCT	AAC GTC CCC ATG AAG GAC GGC	675	ELI3
	<i>E N T D F G D A N V P M</i>	<i>K D G</i>		
676	AAT TTC CTA ACC AAG GTA GGC	AAC GCT TAC TAC GCT TAG	714	PpexpXhoI/1
	<i>N F L T K V G N</i>	<i>A Y Y A *</i>		

Abb. 3-1: Nukleotid- und abgeleitete Aminosäuresequenz der NPP1-cDNA aus *P. parasitica*

Eine eukaryotische Sekretionssignalsequenz (von Heijne & Abrahmsén, 1989) mit 19 Aminosäuren ist kursiv dargestellt.

Gelb unterlegt sind Peptide, deren Aminosäuresequenzen durch Sequenzierung HPLC-gereinigter Peptide (ELI1, ELI2, ELI3) nach Proteasespaltung (Glu-C) des aus dem Kulturmedium gereinigten NPP1 bestimmt wurden. Aus diesen wurden degenerierte Oligonukleotide (eli1, eli2, eli3, s. Anhang 1) zur Klonierung eines für NPP1 kodierenden cDNA-Fragments abgeleitet.

Blau unterlegt sind die Oligonukleotide (RACE 3-1, RACE 5-1), die zur RACE-Reaktion eingesetzt wurden, um den 5'- und den 3'-Bereich der für NPP1 kodierenden cDNA zu isolieren.

Orange unterlegt sind die Oligonukleotide (PpexpEcoRI/1, PpexpXhoI/1) zur Klonierung der vollständigen cDNA korrespondierend zum Elicitorprotein NPP1.

Die aus der isolierten cDNA für das Elicitorprotein NPP1 abgeleitete Aminosäuresequenz enthielt alle ermittelten Aminosäuresequenzen der durch Proteaseverdau erhaltenen Peptide

(Fellbrich, 2001), inklusive des Aminoterminus (Asparaginsäure), der unmittelbar auf die Konsensussequenz für ein eukaryotisches Sekretionssignal folgt (von Heijne & Abrahmsén, 1989). Die Erkennungssequenz für eine entsprechende Signalpeptidase folgt dem „-3,-1-Muster“ mit kleinen ungeladenen Aminosäureresten in den Positionen -3 und -1 vor der Schnittstelle der Signalpeptidase (hier: Valin [-3] und Alanin [-1]).

Das berechnete Molekulargewicht des prozessierten Proteins mit 218 Aminosäuren beträgt 23,461 kDa. Glykosylierungsstellen oder andere strukturelle Motive des Proteins wurden nicht gefunden. Dies ist konsistent mit den ermittelten Daten zum nativen NPP1, in dem keine Glykosylierung des Proteins nachgewiesen werden konnte (Fellbrich, 2001). Der theoretisch ermittelte isoelektrische Punkt (pI) beträgt 4,94. Das Hydropathiediagramm (Abb. 3-2) zeigt, dass NPP1 ein hydrophiles Protein ist, das neben der Sekretionserkennungssequenz nur einen kleinen putativ hydrophoben Bereich aufweist.

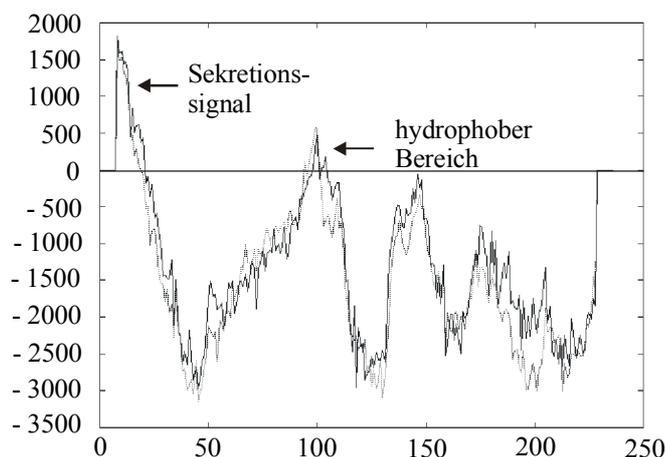


Abb. 3-2: Hydropathiediagramm des Proteins NPP1

Das Diagramm wurde nach dem Eisenbergalgorithmus erstellt (Eisenberg *et al.*, 1984). Auf der x-Achse ist die Zahl der Aminosäuren angezeigt, auf der y-Achse geben positive Werte putative membranständige Domänen an.

Durch Datenbankanalysen wurden Teilsequenzen von NPP1-homologen Proteinen aus der EST-Bank der *Phytophthora*-Genom-Initiative (PGI, Waugh *et al.*, 2000) für *P. sojae* und *P. infestans* ermittelt. Es gelang mittels 5'- und 3'-RACE-Experimenten und anschließender PCR-Reaktion, die vollständigen cDNAs der NPP1-Homologen NPP1_{*P. sojae*} und NPP1_{*P. infestans*} zu isolieren. Für beide homologen Proteine wurde ebenfalls eine Sekretionssignalsequenz identifiziert, die dem „-3,-1-Muster“ entspricht (vgl. Abb. 3-3). Das prozessierte Protein NPP1_{*P. sojae*} mit 218 Aminosäuren hat ein Molekulargewicht von 23,583 kDa und ein pI-Wert von 6,2. Dagegen ist das Protein NPP1_{*P. infestans*} mit 219 Aminosäuren um eine Aminosäure länger als das NPP1 aus *P. parasitica* (NPP1_{*P. parasitica*}) und weist ein Molekulargewicht von 23,607 kDa auf. Der theoretisch ermittelte pI-Wert beträgt 5,13.

3.2 Homologien der NPP1-cDNA zu bekannten Sequenzen



Abb. 3-3: Vergleich der Aminosäuresequenz des *P. parasitica*-Proteins NPP1 mit homologen Proteinen aus verschiedenen Organismen

Die konservierten Bereiche sind im Sequenzvergleich gelb unterlegt. Die beiden orange markierten Cysteinreste bilden möglicherweise eine Disulfidbrücke aus. Die eukaryotischen Sekretionssignalsequenzen (von Heijne & Abrahmsén, 1989) sind in Kursivschrift dargestellt. Der Pfeil deutet jeweils auf die erste Aminosäure der prozessierten Proteine.

Durch Vergleich der Aminosäuresequenz in einer Datenbankanalyse (BLAST, Altschul *et al.*, 1990, Altschul *et al.*, 1997) wurden Homologien von NPP1 zu anderen Nekrose-induzierenden Proteinen und Elicitorproteinen gefunden. Das Protein weist Ähnlichkeiten zu NEP1 (Bailey, 1995), einem Nekrose- und Ethylen-induzierenden Peptid aus *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli* (AAC97382), zu einem ähnlichen Protein aus *Bacillus halodurans* (BAB04114, Takami *et al.*, 1999) und zum Elicitorprotein PaNie (Veit *et al.*, 2001) aus

Pythium aphanidermatum (AAD53944) auf. Das Homologe NPP1 aus *P. sojae* (NPP1_{*P. sojae*}) wurde von Qutob *et al.* (2000) isoliert (AAK01636). Es weist in der Aminosäuresequenz keine Unterschiede zum NPP1_{*P. sojae*} auf, das in unserem Labor isoliert wurde. Die konservierten Bereiche der Aminosäuresequenzen sind in Abb. 3-3 gelb unterlegt. Der N-terminale Bereich des Proteins enthält in den konservierten Bereichen zwei Cysteinreste, die in allen 6 homologen Proteinen vorhanden sind und möglicherweise eine Disulfidbrücke ausbilden. Sie haben in den isolierten NPP1-Homologen einen Abstand von 25 Aminosäuren.

Organismus	Homologie gegenüber NPP1 _{<i>P. parasitica</i>} (prozessiert)		M _r [kDa]	Anzahl der Aminosäuren	
	Identität	Ähnlichkeit		prozessiert	gesamt
<i>P. parasitica</i> (AAK19753)	100%	100%	23,461	237	218
<i>P. infestans</i> (AAK25828)	91%	97 %	23,607	238	219
<i>P. sojae</i> (AAK01636)	76 %	82 %	23,583	237	218
<i>Pythium aphanidermatum</i> (AAD53944)	51 %	65 %	23,279	234	213
<i>Bacillus halodurans</i> (BAB04114)	49 %	64 %	23,818	238	214
<i>Fusarium oxysporum</i> (AAC97382)	37 %	53 %	23,990	253	222

Tab. 3-1: Verwandtschaft der NPP1-homologen Proteine

Die phylogenetische Analyse (Abb. 3-4) zeigt ebenfalls die Verwandtschaft von NPP1 zu seinen Homologen. Die größten Gemeinsamkeiten findet man für die Proteine innerhalb der Gattung *Phytophthora* (Identität von 76 % gegenüber NPP1_{*P. sojae*} und Identität von 91 % gegenüber NPP1_{*P. infestans*} vgl. Tab. 3-1). Für das Elicitorprotein aus *Pythium aphanidermatum* (PaNie) konnten 51 % Homologie ermittelt werden, wohingegen die Homologie zum NEP1 aus *Fusarium oxysporum* noch 37 % beträgt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass ein halophiles Bakterium wie *Bacillus halodurans* ebenfalls ein NPP1-homologes Protein bildet, das 49 % Identität gegenüber NPP1 aufweist. Im Gegensatz zu den NPP1-Homologen der Oomyceten haben die Proteine der anderen Organismen im N-terminalen Bereich eine höhere Homologie zu NPP1 als im C-terminalen Abschnitt. Besonders deutlich ist dieser Unterschied für das Homologe aus *Bacillus halodurans*, bei welchem der N-Terminus des Proteins 58 % Identität aufweist, wogegen im C-terminalen Bereich nur 40 % Identität vorliegen. Für NEP1 sind die Differenzen jedoch ähnlich (N-terminaler Bereich: 45% Identität, C-terminaler Bereich: 29 % Identität).

Alle prozessierten Proteine (ohne Sekretionssignalsequenz) haben annähernd die gleiche Anzahl Aminosäuren (213-222) und ungefähr das gleiche Molekulargewicht von ca. 23 kDa (vgl. Tab. 3-1). Im theoretisch ermittelten pI-Wert unterscheiden sich die NPP1-Homologen

etwas, wobei jedoch für das *Fusarium*-Protein NEP1 mit einem pI-Wert von 8,36 die größte Abweichung gefunden wurde. Für die anderen Homologen liegt der pI-Wert unter 7.

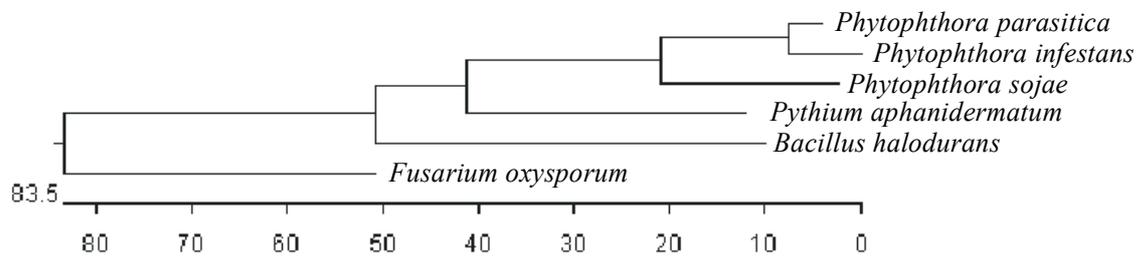


Abb. 3-4: Phylogenetische Analyse der NPP1-Homologen nach Sequenzvergleich der Aminosäuresequenzen. Die Skala zeigt die Distanz zwischen den einzelnen Sequenzen, wobei die Zahl der Substitutionen von Aminosäuren abzulesen ist.

3.3 Elicitoraktivität von rekombinantem NPP1 bzw. seiner Deletionsderivate

3.3.1 Herstellung von rekombinantem NPP1 als GST-Fusionsprotein

Die zum prozessierten NPP1 korrespondierende cDNA wurde zur Herstellung von rekombinantem Protein in *E. coli* eingesetzt. Der offene Leserahmen wurde in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert, wobei die Oligonukleotide PpexpEcoRI/2 und PpexpXhoI/1 (s. Anhang 2) für die PCR-Reaktion verwendet wurden. Die Klonierung in diesen Vektor erlaubte die Expression von NPP1 als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST). Durch die Bindung des Fusionsproteins an Glutathion-Agarose (GSH-Agarose) wird die Affinitätschromatographische Aufreinigung des rekombinanten Proteins ermöglicht.

Das Protein NPP1 ließ sich in relativ großen Mengen exprimieren. Nach der Lyse der Bakterien lag das GST-Fusionsprodukt in löslicher Form vor. Die Analyse der Bakterienlysate ausgewählter Expressionsprodukte in einer SDS-PAGE ist in Abb. 3-5A/B dargestellt. Es wurde deutlich, dass die Proteinbiosynthese durch IPTG induziert werden konnte und somit das Fusionsprotein GST-NPP1 (III) gebildet wurde. Das Expressionsprodukt konnte durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose gereinigt werden, wobei die Elution durch einen Überschuss von freiem Glutathion (10 mM) erfolgte. Durch Proteaseverdau mit Faktor Xa wurde der GST-Anteil aus dem Fusionsprotein abgespalten, wodurch die freie GST (26 kDa) und das freie NPP1 (23 kDa) gebildet wurden (Abb. 3-5C). Obwohl das Protein ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 23 kDa aufweist, ist eine mit NPP1 korrespondierende Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von 29 kDa detektierbar. Dies ist konsistent mit dem beobachteten Laufverhalten des nativen Proteins in der SDS-PAGE (vgl. Fellbrich, 2001).

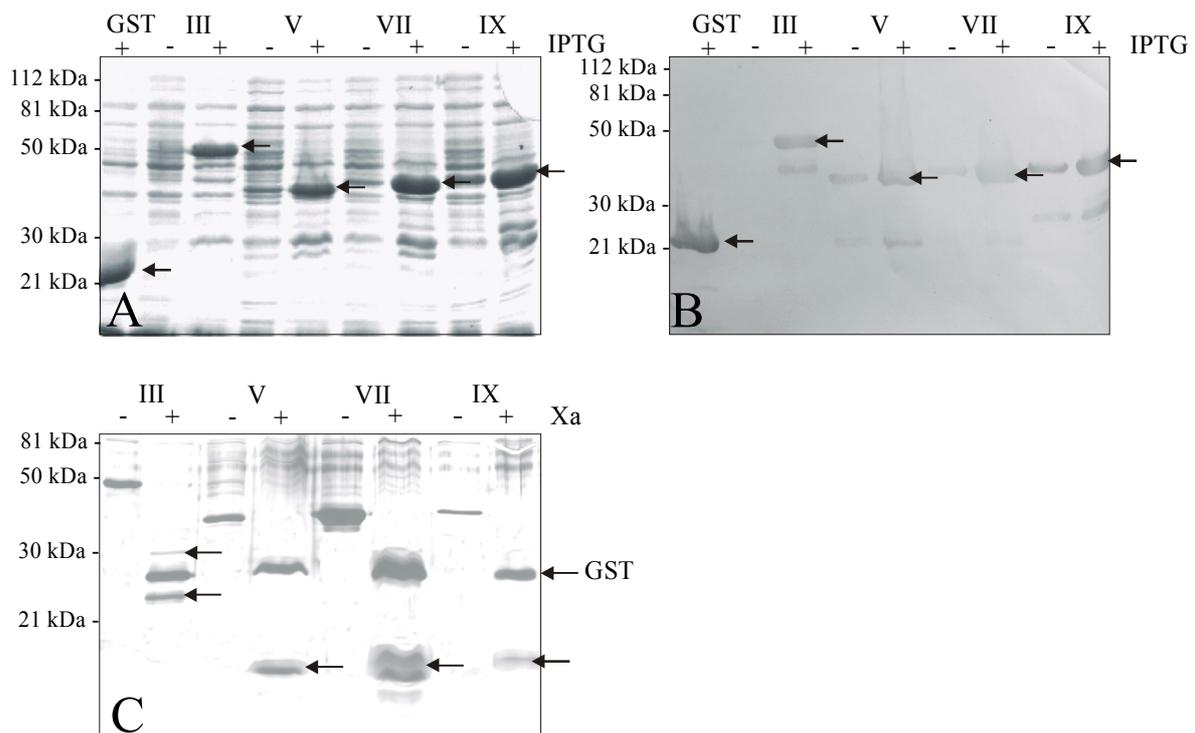


Abb. 3-5: Gelelektrophoretische Analyse ausgewählter exprimierter Proteinfragmente von NPP1

Die Expression der rekombinanten Proteinfragmente in *E. coli* (GST-Fusionsprodukte) wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das bakterielle Pellet wurde lysiert und ein Aliquot des löslichen Überstandes in einer SDS-PAGE analysiert. (GST: Glutathion-S-Transferase; III: rekombinantes NPP1; V, VII, IX: Deletionsderivate von NPP1, vgl. Abb. 3-7) Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist jeweils links vom Proteingel angegeben. Die Proteinbanden für NPP1 und seine Derivate sind durch Pfeile markiert.

(A) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Bakterienlysate zur Analyse der Expression der GST-Fusionsproteine mit (+) und ohne (-) Zugabe von IPTG zur Induktion der Proteinbildung.

(B) Immunoblot der Bakterienlysate zur Analyse der GST-Fusionsprodukte von NPP1 und seiner Derivate mit (+) und ohne (-) Zugabe von IPTG. Als primärer Antikörper diente ein Anti-GST-Antikörper und als sekundärer Antikörper ein an alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Ziege-Antikörper, was den Nachweis der GST-Fusionsproteine erlaubte. Die Detektion erfolgte mit dem NBT-BCIP-Substrat.

(C) Silber-gefärbte SDS-PAGE der affinitätsgereinigten GST-Fusionsproteine vor (-) und nach (+) Spaltung mittels Faktor Xa. Die gebildeten Teilproteine sind durch Pfeile markiert. Für Fragment III (GST-NPP1) wurden 2 Proteinbanden detektiert, die beide in späteren Experimenten vom NPP1-spezifischen Antikörper AK152 erkannt wurden (vgl. Abb. 3-9).

3.3.2 Herstellung von rekombinantem NPP1 als Histidin₁₀-Fusion

Die Präparation des rekombinanten NPP1 als GST-Fusion hatte zur Folge, dass die Elicitorpräparation sowohl das freie NPP1 als auch die freie GST enthielt. Versuche, durch erneuten Einsatz der GSH-Agarose GST affinitätschromatographisch aus der Präparation zu entfernen, ermöglichten keine vollständige Trennung beider Proteine. Auch andere biochemische Reinigungsmethoden brachten keinen Erfolg, vermutlich weil die Eigenschaften von GST und NPP1 sehr ähnlich sind.

Aus diesem Grund wurde neben der Expression als GST-Fusionsprotein die Expression als Histidin₁₀-Fusionsprotein (His₁₀-NPP1) durchgeführt. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, Elicitorpräparationen zur Verfügung zu haben, die ausschließlich NPP1 enthalten.

Der offene Leserahmen von NPP1 wurde, ebenfalls ohne Signalpeptid, in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert und exprimiert. Für die dazu notwendige PCR-Reaktion wurden die Oligonukleotide PpexpEcoRI/2 und PpexpBamHI/1 (s. Anhang 2) verwendet. Die Klonierung in den Vektor pJC40 ermöglichte die Expression von NPP1, das N-terminal mit 10 Histidinresten (His₁₀-NPP1) fusioniert war. So konnte eine Affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten Proteins mittels Ni-NTA-Agarose erfolgen. Eine Übersicht über die Schritte dieser Reinigung zeigt das SDS-Polyacrylamidgel in Abb. 3-6. Nach Elution des Proteins von der Affinitätsmatrix ist nur ein Hauptprodukt in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE detektierbar. Dieses Protein wurde durch Immunoblotanalyse als NPP1 identifiziert (nicht dargestellt).

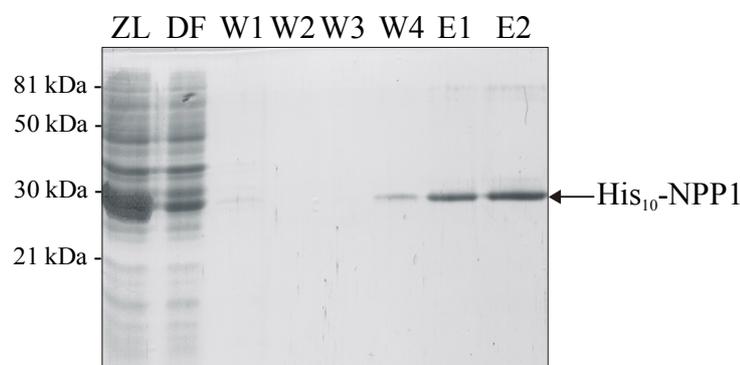


Abb. 3-6: Gelelektrophoretische Analyse der Affinitätsreinigung von rekombinatem His₁₀-NPP1. Die Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli* (His₁₀-Fusion) wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das bakterielle Pellet wurde lysiert und die löslichen Bestandteile des Überstands durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Die Elution des Proteins von der Säulenmatrix erfolgte durch 250 mM Imidazol. Die Reinigungsfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteinbanden mit Coomassie angefärbt. ZL: Zellysate; DF: Durchfluss; W1-W4: Waschfraktionen; E1, E2: Elutionsfraktionen. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist links vom Proteingel angegeben.

3.3.3 Tests zur Elicitoraktivität von rekombinatem NPP1

Die rekombinanten Varianten der NPP1-Fusionsproteine (GST-NPP1 und His₁₀-NPP1) wurden für verschiedene Bioassays eingesetzt. Dabei konnte mit dem rekombinanten NPP1, genau wie mit dem nativen Protein, die Phytoalexinbildung in Petersilieprotoplasten ausgelöst werden (Abb. 3-7). In diesen Experimenten zum Test der biologischen Aktivität wurden Suspensionen von Petersilieprotoplasten mit Elicitor behandelt und 24 h nach der Applikation des Wirkstoffs die Fluoreszenz der gebildeten Phytoalexine ermittelt. Zur Kontrolle wurde Pep-13, die elicitoraktive Komponente des 42-kDa-Elicitorproteins aus *P. sojae* (GP42), eingesetzt und die gebildete Phytoalexinmenge als 100 % definiert. Sowohl GST-NPP1 als auch His₁₀-NPP1 erreichten, ebenso wie das native gereinigte NPP1, 80 % der Phytoalexinmenge, die Pep-13 in Petersilieprotoplasten maximal induziert (Abb. 3-7A). Diese Beobachtung konnte in allen Experimenten bestätigt werden. Auch eine Steigerung der NPP1-Menge (2 μM) bewirkte keinen weiteren Zuwachs der Phytoalexinakkumulation. Auffällig war, dass

das Fusionsprotein GST-NPP1 ohne die Proteasebehandlung mittels Faktor Xa zur Spaltung von GST und NPP1 nur geringe Elicitoraktivität aufwies (nicht dargestellt). Es konnte lediglich 15-20 % der Phytoalexinakkumulation gegenüber den Pep-13-behandelten Petersilieprotoplasten beobachtet werden, wogegen nach der Proteasespaltung 80 % erzielt wurden. Aus diesem Grunde wurde für alle weiteren Experimente GST-NPP1 eingesetzt, das mittels Faktor Xa gespalten war. Nur zur Unterscheidung der Herkunft der rekombinanten Proteine ist im Folgenden das Fusionsprodukt mit angegeben. Das gleiche Ergebnis liefert auch das rekombinant produzierte Elicitorprotein GST-NIP1 aus *Rhynchosporium secalis* (Gierlich *et al.*, 1999).

Ferner wurden für GST-NPP1 und His₁₀-NPP1 Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinakkumulation erstellt (Abb. 3-7B). Dazu wurde in Petersilieprotoplasten 24 h nach Zugabe von unterschiedlichen Konzentrationen des Elicitors die gebildete Phytoalexinmenge in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) ermittelt. Die ermittelten EC₅₀-Werte von 2 nM für GST-NPP1 und 10 nM für His₁₀-NPP1 liegen im gleichen Größenbereich und korrelieren mit dem EC₅₀-Wert von nativem NPP1 (8,5 nM, vgl. Fellbrich, 2001).

Anders als Pep-13 löst NPP1 in Petersilieprotoplasten oder Tabakblättern den Zelltod aus. Durch Doppelfärbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid konnte die Zahl lebender und toter Petersilieprotoplasten 24 h nach Elicitorgabe ermittelt werden (nach Huang *et al.*, 1986). Während der Vitalfarbstoff Fluoresceindiacetat nur in lebenden Zellen zu grünfluoreszierendem Fluorescein umgesetzt wird, weist eine rote Fluoreszenz des Propidiumiodids im Zellkern auf tote oder membrangeschädigte Zellen bzw. Protoplasten hin, da diese Substanz intakte Membranen nicht passieren kann. Da Pep-13 und GST keinen Zelltod induzieren, zeigten die Petersilieprotoplasten nach Applikation mit diesen Effektoren grüne Fluoreszenz. Dagegen waren 24 h nach Zugabe von NPP1 nur rot-gefärbte (tote) Petersilieprotoplasten zu beobachten (Abb. 3-7C). Dies gilt sowohl für das gereinigte, native NPP1 als auch für die rekombinanten Proteine (GST-NPP1 und His₁₀-NPP1).

Bei Infiltration des Proteins in Tabakblätter konnte nach 4-6 h ein Eintrocknen des Blattgewebes an der Infiltrationsstelle beobachtet werden. Nach 24 h waren die Nekrosebildungen eindeutig zu erkennen (Abb. 3-7D). Ebenso wie für die rekombinanten Proteine konnte diese Beobachtung auch für das native NPP1 gemacht werden. GST, die als Negativkontrolle diente, induzierte keine Nekrosen in Tabakblättern, keinen Zelltod in Petersilieprotoplasten und nur geringe Mengen an Phytoalexinen in Petersilieprotoplasten.

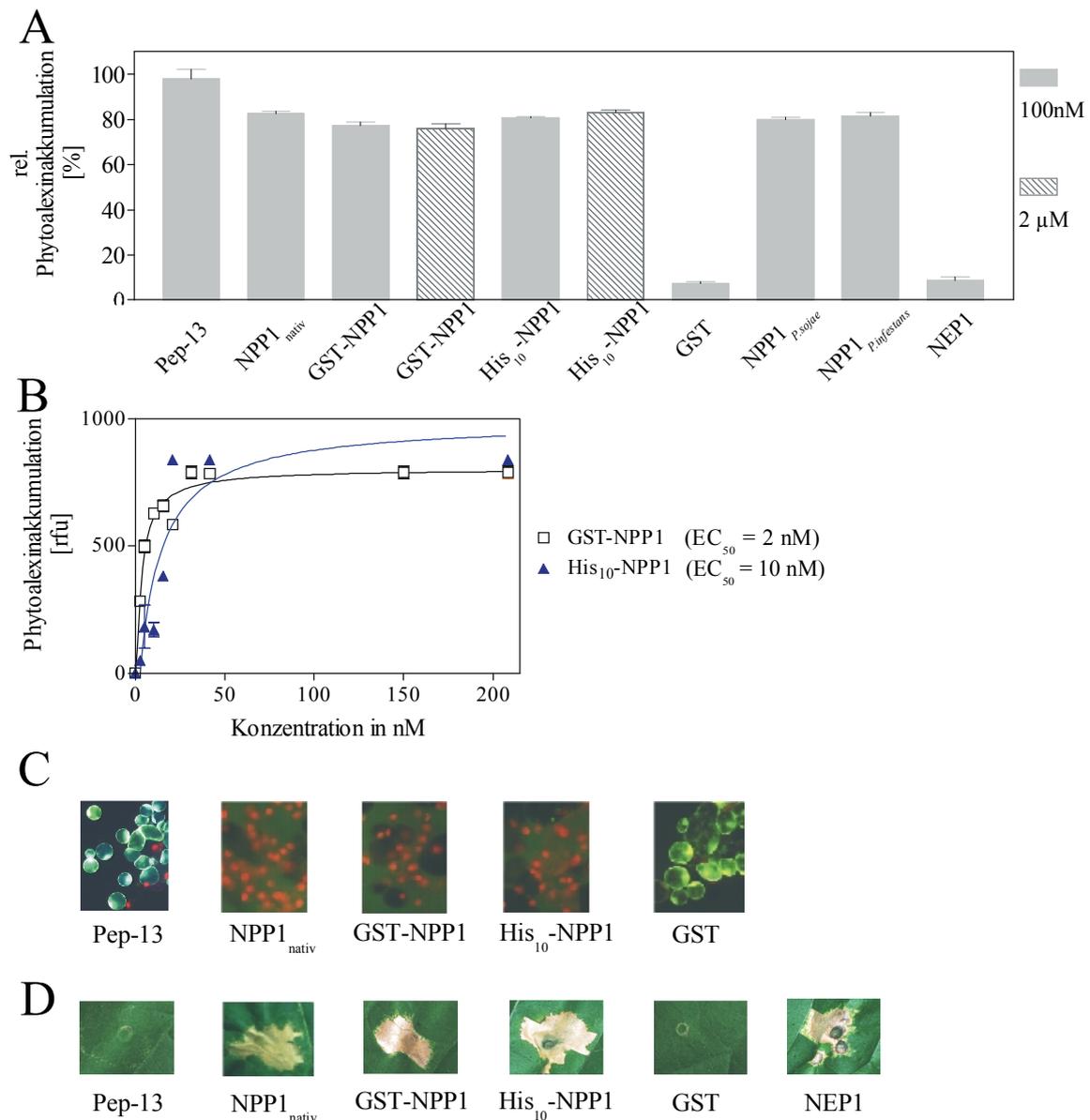


Abb. 3-7: Elicitoraktivität von NPP1

Untersucht wurde die Elicitoraktivität von affinitätsgereinigtem, rekombinanten NPP1 (GST-Fusion und His₁₀-Fusion) im Vergleich mit Pep-13 und nativem, gereinigtem NPP1 als Positivkontrolle sowie GST als Negativkontrolle. Die Ergebnisse der Experimente mit Petersilieprotoplasten resultieren aus 3-fach Bestimmungen, wogegen in Tabakblättern 2-fach Bestimmungen durchgeführt wurden. Die Fusionsbereiche der Proteine, wie His₁₀ und GST wurden durch Behandlung mit Faktor Xa abgespalten und sind nur zur Unterscheidung der Herkunft von NPP1 mit angegeben.

(A) 100 nM oder 2 μM des angegebenen Effektors wurden auf Induktion der Phytoalexinbiosynthese in 100 μl Petersilieprotoplastensuspension (5×10^5 /ml) getestet. Die durch Pep-13 induzierte Phytoalexinakkumulation wurde als 100 % Elicitoraktivität definiert.

(B) Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplastensuspensionen nach Applikation der rekombinanten Proteine GST-NPP1 und His₁₀-NPP1. Petersilieprotoplasten (5×10^5 /ml) wurden mit steigenden Konzentrationen von GST-NPP1 und His₁₀-NPP1 behandelt. Nach 24 h wurde die Fluoreszenz der gebildeten Phytoalexine in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) bestimmt.

(C) Nach 24 h Inkubation mit dem angegebenen Elicitor wurde die Vitalität der Petersilieprotoplasten von (A) durch Doppelfärbung mit Fluoresceindiacetat (50 μg/ml) und Propidiumiodid (10 μg/ml) untersucht. Lebende Petersilieprotoplasten zeigen grüne Fluoreszenz, rot-fluoreszierende Zellkerne entsprechen toten Protoplasten.

(D) Wässrige Lösungen der angegebenen Elicitoren (2 μM) wurden in Tabakblätter infiltriert und 24-48 h nach Applikation die Nekrosebildung analysiert. Eintrocknete gelbe bis braune Bereiche in den Blattausschnitten zeigen die Nekrosebildung an.

Die beiden unterschiedlichen Expressionssysteme ermöglichten die Präparation von Elicitor, der verschiedenen experimentellen Ansprüchen genüge. Durch die Expression von NPP1 als GST-Fusionsprotein konnten relativ große Mengen einheitlichen Elicitormaterials präpariert werden, was für Untersuchungen zur Signaltransduktion von Bedeutung war. Auch zur Ermittlung eines minimalen elicitoraktiven Fragmentes von NPP1 konnte dieses Expressionssystem verwendet werden. Nachteilig für Ligandenmarkierung bzw. Bindungsexperimente war die Tatsache, dass das Teilprotein GST des Fusionsproduktes GST-NPP1 nach der Spaltung durch die Protease Faktor Xa nicht vollständig vom NPP1 zu trennen ist. Dennoch waren diese Präparationen zum Einsatz in Signaltransduktionsstudien geeignet, da sie verlässlich große Mengen elicitoraktiven Proteins lieferten. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass freie GST, selbst in hohen Konzentrationen (2 μ M), keine pflanzlichen Abwehrreaktionen induziert (nicht dargestellt).

Zur radioaktiven Markierung von NPP1 wurden jedoch elicitoraktive Präparationen von His₁₀-NPP1 verwendet, da in diesen Fällen eine zusätzliche Proteinkomponente (GST) zu radioaktiv markierten Nebenprodukten geführt hätte. Mit diesem Expressionssystem war es jedoch nicht möglich, Elicitormengen im Umfang des GST-Fusionsproteins zu produzieren, so dass His₁₀-NPP1 nur für Experimente eingesetzt wurde, in denen die GST gestört hätte.

Für die rekombinanten Proteine (GST-Fusion) der Homologen zu NPP1_{*P.parasitica*}, NPP1_{*P.sojae*} und NPP1_{*P.infestans*} wurde ebenfalls die Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten und der Zelltod nach Infiltration in Tabakblätter experimentell ermittelt. NPP1_{*P.sojae*} und NPP1_{*P.infestans*} zeigten in beiden Assays die gleiche Aktivität wie NPP1_{*P.parasitica*}. So waren 24 h nach Applikation in Tabakblätter deutliche Nekrosen sichtbar. NPP1_{*P.sojae*} induziert 96 % und NPP1_{*P.infestans*} 98 % der Phytoalexinakkumulation von NPP1_{*P.parasitica*} in Petersilieprotoplasten (vgl. Abb. 3-7A), also ca. 80 % der Phytoalexinmenge, die durch Pep-13 induziert wird. Dies entspricht der experimentellen Schwankungsbreite, so dass von der gleichen Aktivität dieser homologen Proteine der *Phytophthora*-Spezies ausgegangen werden kann.

Daneben wurde außerdem die Elicitoraktivität von rekombinantem NEP1 (GST-Fusion) dem Strukturhomologen aus *Fusarium oxysporum* in Petersilieprotoplasten und Tabakblättern geprüft. Interessanterweise induziert dieses Protein die Phytoalexinbiosynthese in Petersilieprotoplasten nicht (Abb. 3-7A). Es löst jedoch sowohl in Petersilieprotoplasten als auch in Tabakblättern den Zelltod aus (Abb. 3-7 D).

3.3.4 Expression von NPP1-Deletionsderivaten als GST-Fusionsproteine

Zur Detektion des elicitoraktiven Teils des Proteins wurden die in der schematischen Darstellung gezeigten NPP1-Derivate als GST-Fusionsproteine exprimiert (Abb. 3-8). Die mittels PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert. Dazu wurden die Oligonukleotide aus Anhang 2 verwendet. Anschließend erfolgte die

Expression der Proteine in *E. coli* BL21. Zuerst wurden die Deletionsderivate des NPP1-Elicitorproteins hergestellt, die ca. 50% der Sequenz umfassten, um sich der elicitoraktiven Komponente des Proteins anzunähern. Dazu gehörten die N-terminale Hälfte des Proteins (Fragment IX), die C-terminale Hälfte (Fragment VII) und ein mittlerer Abschnitt (Fragment V). Diese Expressionsproteine wurden in Petersilieprotoplasten und Tabakblättern auf Elicitoraktivität getestet. Da sich zeigte, dass diese Deletionsproteine inaktiv waren, wurden weitere Deletionsfragmente präpariert, denen nur kürzere Peptide im N- und/oder C-Terminus von NPP1 fehlten (vgl. Abb. 3-8).

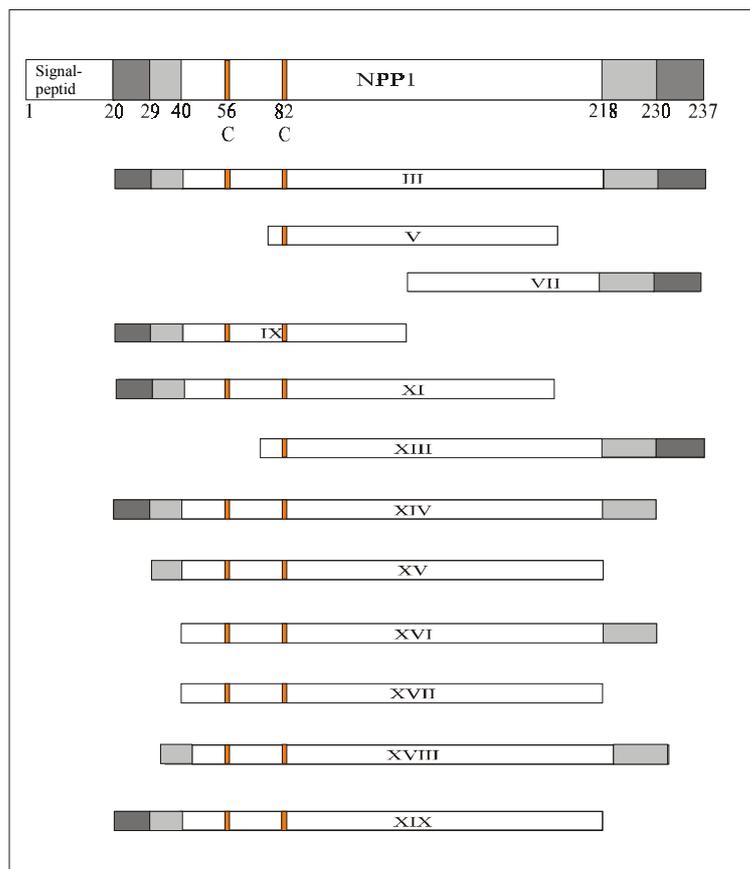


Abb. 3-8: Deletionsderivate von NPP1

Dargestellt ist das Gesamt-Protein (oberster Balken) und die relative Lage der verschiedenen Deletionsderivate, deren cDNAs in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert wurden. Das ermöglichte die Expression der NPP1-Derivate als GST-Fusionsprotein. Die Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte sind im Anhang 5a zusammengefasst, die zur Klonierung der DNA-Konstrukte verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang 2 enthalten.

Die Deletionsderivate XI und XIII konnten durch Kombination der Oligonukleotide präpariert werden, die schon zur Klonierung der Fragmente V, VII und IX verwendet worden waren. Für die Oligonukleotide zur Klonierung der Fragmente XIV-XIX wurden günstig gelegene Sequenzbereiche ausgewählt, die nur geringe Veränderungen zur Umwandlung in die für die Klonierung notwendigen Restriktionsschnittstellen erforderten. Diese Deletionsderiva-

te (XIV-XIX) sind im Vergleich zum Gesamtprotein NPP1 wenig verkürzt. Die Aminosäuresequenzen der Deletionsderivate von NPP1 sind im Anhang 5a zusammengefasst.

Alle GST-Fusionsprodukte der Deletionsderivate konnten in nahezu gleicher Menge exprimiert werden wie GST-NPP1 (vgl. ausgewählte Beispiele [V, VII, IX] in Abb. 3-5A). Sie lagen alle in löslicher Form vor und konnten durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose gereinigt werden. Der GST-Anteil wurde in allen Fusionsprodukten durch Proteaseverdau mit Faktor Xa abgespalten. Die erhaltenen rekombinanten Proteine (NPP1 und seine Deletionsderivate) wurden mittels SDS-PAGE (Abb. 3-9) analysiert.

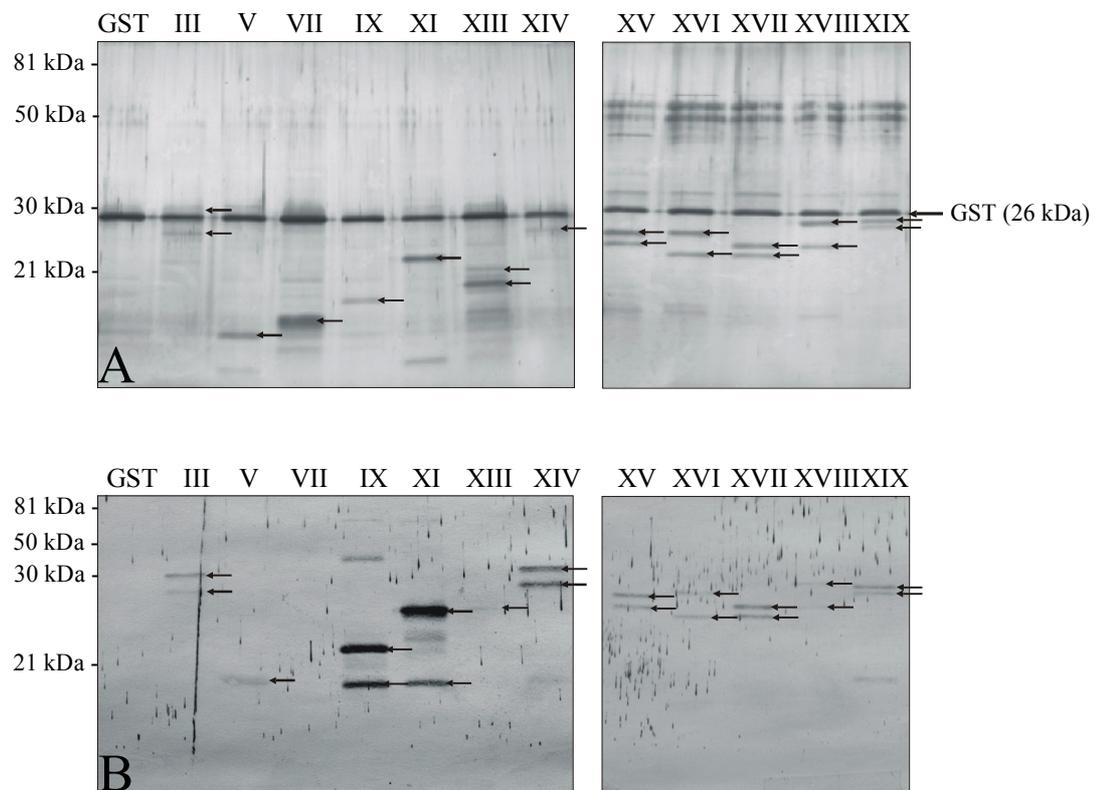


Abb. 3-9: Gelelektrophoretische Analyse aller rekombinanten Deletionsderivate von NPP1

Die Expression der rekombinanten Proteinfragmente in *E. coli* (GST-Fusionsprodukte) wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das bakterielle Pellet wurde lysiert, die löslichen Bestandteile des Überstands durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose gereinigt und der GST-Anteil der Fusionsprodukte durch Proteasebehandlung mit Faktor Xa abgespalten. Aufgetragen wurde 0,5 µg Gesamtprotein. GST: Glutathion-S-Transferase; III: rekombinantes NPP1; V, VII, IX, XI, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX: Deletionsderivate von NPP1, vgl. Abb. 3-8 und Anhang 5a, die Pfeile deuten auf die entsprechenden Proteinfragmente. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist jeweils links vom Proteingel angegeben.

(A) Silber-gefärbte SDS-PAGE der affinitätsgereinigten NPP1-Expressionsprodukte nach Proteasespaltung mit Faktor Xa.

(B) Immunoblotanalyse der affinitätsgereinigten NPP1-Expressionsprodukte nach Proteasespaltung mit Faktor Xa. Als primärer Antikörper diente der spezifische Anti-NPP1-Peptidantikörper (AK152) und als sekundärer Antikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper. Die Detektion erfolgte mit dem NBT-BCIP-Substrat.

Nach Jameson-Wolf-Analyse (Jameson & Wolf, 1988) des Proteins wurden zwei besonders antigene Peptide (Peptid 1 [AS54-AS83] und Peptid 9 [AS144-AS173], Abb. 3-1) aus-

gewählt und zur Generierung der Antikörper (AK152 und AK168) eingesetzt. Routinemäßig wurde in Immunoblotanalysen der Antikörper AK152 verwendet, da der Antikörper AK168 unspezifische Proteinbanden detektierte.

Für die meisten Deletionsfragmente erhält man wie für NPP1 zwei Proteinbanden, die durch den NPP1-spezifischen Peptid-Antikörper (AK152) detektiert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Abbauprodukte des Elicitorproteins handelt. Nach Elution der Fusionsproteine konnte in SDS-PAGE-Analysen jeweils nur eine Proteinbande detektiert werden, die dem GST- Fusionsprotein entsprach (vgl. Abb. 3-5C). Dagegen waren nach Spaltung mit Faktor Xa neben der GST-Bande zwei weitere Proteinbanden zu beobachten (Abb. 3-9A), die durch den NPP1-spezifischen Antikörper AK152 erkannt wurden (Abb. 3-9B). Die Abbauprodukte könnten durch die Wirkung von Proteasen entstanden sein, nicht jedoch durch die Protease Faktor Xa, da keine spezifische Spaltstelle für dieses Enzym in NPP1 enthalten ist. Lediglich für das Deletionsderivat VII war es nicht möglich, mittels Immunoblot bei Einsatz des Antikörpers AK152 ein Protein zu detektieren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in diesem Teilprotein das Peptid 1, welches zur Antikörperproduktion eingesetzt wurde, fehlt.

3.3.5 Test von NPP1-Deletionsproteinen auf Elicitoraktivität

Die Expressionsprodukte der NPP1-Deletionsderivate wurden nach Affinitätsreinigung und Trennung der GST vom NPP1 durch Faktor-Xa-Spaltung dialysiert. Auf diese Weise wurden Salze entfernt, die die Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten stören. Zur Bestimmung der Elicitoraktivität wurde 24 h nach Zugabe der Deletionsderivate die Fluoreszenz der gebildeten Phytoalexine in Suspensionen von Petersilieprotoplasten bestimmt. Mit Ausnahme des Gesamtproteins NPP1 (III) und eines verkürzten Fragments (XIV), dem nur 8 Aminosäuren am C-Terminus fehlen, konnte für kein anderes Deletionsprotein die *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen in Petersilieprotoplasten beobachtet werden (Abb. 3-10A). In den dargestellten Experimenten wurde die nach NPP1-Zugabe gebildete Phytoalexinmenge als 100 % definiert und für die NPP1-Derivate die relative Phytoalexinakkumulation bestimmt. GST diente zur Bestimmung der unspezifischen Phytoalexinakkumulation. Sie betrug 10-15 % der maximalen Phytoalexinmenge, die mit NPP1 erreicht wird. Für alle Deletionsderivate (100 nM) außer den Fragmenten III und XIV wurde eine relative Elicitoraktivität von 15-30 % ermittelt. Dies entspricht annähernd der Hintergrundaktivität von GST. Für das elicitoraktive Deletionsfragment XIV konnte 97 % der maximalen Phytoalexinmenge im Vergleich zum NPP1 ermittelt werden. Die Positivkontrolle Pep-13 löste im dargestellten

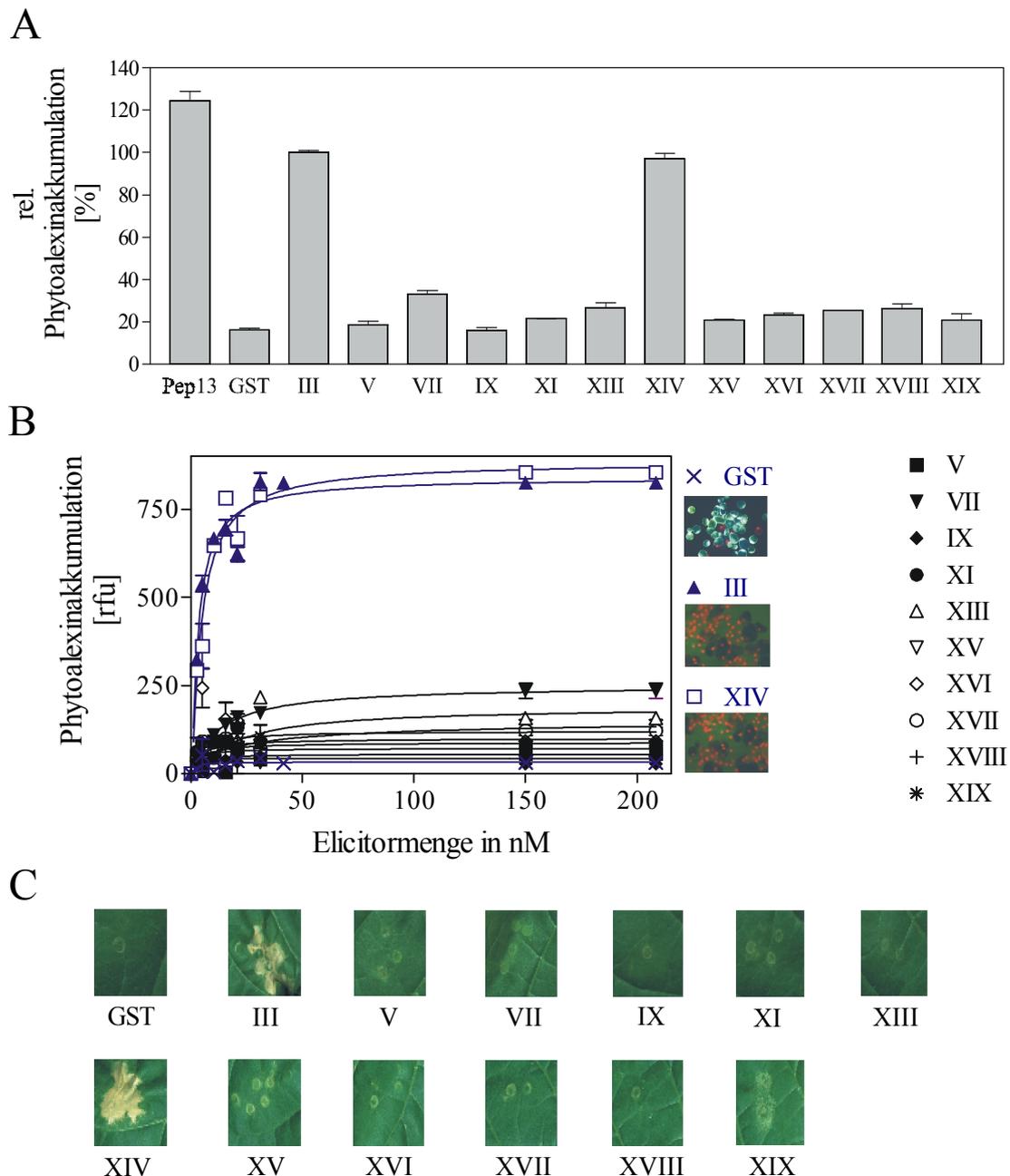


Abb. 3-10: Elicitoraktivität der NPP1-Deletionsderivate

Untersucht wurde die Elicitoraktivität von affinitätsgereinigten, rekombinanten NPP1-Deletionsproteinen.

(A) Je 100 nM des angegebenen Deletionsderivates von NPP1 wurden auf Induktion der Phytoalexinbiosynthese in Petersilieprotoplasten (5×10^5 /ml) getestet. Als Kontrollen dienten das elicitoraktive Pep-13 (100 nM) und GST (100 nM). Zum Vergleich der Elicitoraktivität wurde die durch NPP1 (Fragment III) induzierte Phytoalexinmenge als 100 % definiert.

(B) Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten (5×10^5 /ml) nach Applikation der rekombinanten Deletionsderivate von NPP1. Petersilieprotoplasten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der Expressionsprodukte von NPP1-Derivaten behandelt. Nach 24 h wurde die Fluoreszenz der gebildeten Phytoalexine in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) bestimmt.

Für ausgewählte Beispiele (GST, III und XIV) ist rechts die Vitalitätsfärbung der Petersilieprotoplasten dargestellt. Die Färbung erfolgte als Doppelfärbung mit Fluoresceindiacetat (50 μ g/ml) und Propidiumiodid (10 μ g/ml). Lebende Petersilieprotoplasten werden durch grüne Fluoreszenz dargestellt, rot-fluoreszierende Zellkerne weisen auf tote Petersilieprotoplasten hin.

(C) Wässrige Lösungen der angegebenen Deletionsderivate (2 μ M) wurden in Tabakblätter infiltriert und 24-48 h nach Applikation die Nekrosebildung analysiert. Eintrocknete gelbe bis braune Bereiche in den Blattausschnitten zeigen die Nekrosebildung an. Die Infiltrationsstellen erscheinen in einigen Fällen wie kleine Nekrosen (XI, XV, XVII, XIX), dies täuscht jedoch durch die Bilddokumentation.

Experiment im Vergleich zu NPP1 eine relative Phytoalexinakkumulation von 127 % aus, was konsistent mit früheren Ergebnissen ist (vgl. 3.3.3).

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass NPP1 in Petersiliezellen bzw. -protoplasten den Zelltod induziert. Deshalb wurde die Vitalität der Petersilieprotoplasten 24 Stunden nach Behandlung mit den Deletionsderivaten von NPP1 bestimmt. Deletionsfragmente, die die *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen auslösten (III, XIV), induzierten auch den Zelltod der Petersilieprotoplasten (Abb. 3-10B). Dagegen konnten nach Applikation der anderen Deletionsderivate ausschließlich lebende Petersilieprotoplasten beobachtet werden (nicht dargestellt). Elicitoraktives Pep-13, das keinen Zelltod in Petersilieprotoplasten induziert (Sacks *et al.*, 1995, Nürnberger *et al.*, 1994), und GST dienten als Kontrolle.

Ferner wurden die Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinbildung in Petersilieprotoplasten nach Zugabe der NPP1-Deletionsderivate ermittelt (Abb. 3-10B). Für die elicitoraktiven Proteine III und XIV konnten EC_{50} -Werte von 2 nM (III, NPP1) und 6 nM (XIV, Deletionsderivat) ermittelt werden. Der EC_{50} -Wert für das Deletionsderivat liegt im gleichen Bereich wie der EC_{50} -Wert des Gesamtproteins, so dass von voller biologischer Aktivität dieses Derivates ausgegangen werden kann.

Die Elicitorproteine NEP1, PaNie und NPP1 induzieren in dikotyledonen Pflanzen den Zelltod (Bailey, 1995, Veit *et al.*, 2001, Fellbrich, 2001). Zur Untersuchung der Induktion der Abwehr in der Ganzpflanze, wurden wässrige Lösungen der Deletionsderivate von NPP1 (2 μ M) in Tabakblätter infiltriert. Nach 4-6 h konnte bei den Fragmenten III und XIV das Eintrocknen des Blattgewebes an der Infiltrationsstelle beobachtet werden. Nach 24 h waren für die Proteine III und XIV Nekrosen im behandelten Blattgewebe deutlich sichtbar. Die anderen Deletionsfragmente induzieren genau wie GST in Tabakblättern keine nekrotischen Läsionen (Abb. 3-10C).

Aus den dargestellten Ergebnissen lässt sich ableiten, dass es kein Deletionsfragment von NPP1 gibt, das Elicitoraktivität aufweist und gleichzeitig wesentlich kürzer als das Gesamtprotein NPP1 ist. Lediglich das Deletionsderivat (XIV), dem 8 Aminosäuren im C-Terminus des Proteins fehlen, zeigt noch Elicitoraktivität. Dies lässt vermuten, dass die Sekundärstruktur des Gesamtproteins für die Induktion der pflanzlichen Abwehr ausschlaggebend ist.

3.4 Einfluss der Sekundärstruktur von NPP1 auf die Elicitoraktivität

Zur Untersuchung der sekundären Strukturmerkmale des Proteins wurden Datenbankanalysen durchgeführt (Frishman & Argos, 1996). Dabei konnten lediglich kurze Bereiche mit putativen Strukturmerkmalen identifiziert werden. Neben der α -Helix-Struktur der Sekretionssignalsequenz findet man im mittleren Abschnitt 3 putative β -Faltblattbereiche, wogegen

der C-Terminus vermutlich wieder 2 α -Helizes ausbildet. Der Großteil des Proteins scheint jedoch keine bestimmte Struktur aufzuweisen (C, „random coiled“, Abb. 3-11).

MNVLTFLIAA	AVSLAVVQAD	VISHDAVVPF	AQPTATTTEQ	KAGVKFKPQI	HISNGCHPYP	60
CC HHHHHHHH	HHHHHHHH EE	EECCCCCCCC	CCCCCCC HHH	HHHHH CCCCE	EECCCCCCCC	
AVDANGNTSG	GLKPTGSSSA	GCKGSGYGSQ	VYGRVATYNG	VYAIMYSWYF	PKDSPVTGLG	120
CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	CCCCCCCCC	EEEEEEEE CC	EEEEEEEE CC	CCCCCCCCC	
HRHDWEHVVV	WVDDIKLDSP	SIIAVSPSAH	SGYNIYYPPE	SNTIDGYSAK	VDYSSSWVVI	180
CCCCC EEEE	EE CCCCCCCC	EEEEEE CCC	CCCEEEEC	CC EE CCC EE	EEEE CCCCC	
NHALDSTTDA	GETQDLIMWD	QLTDAARTAL	ENTDFGDANV	PMKDGNFLTK	VGNAYYA	237
CEEECCCCC	CCCCCCC HH	HCC HHHHHH C	CCCCCCCCC	CCCCC HHHH	HHHHH CC	

Abb. 3-11: Aminosäuresequenz von NPP1 mit vorausgesagter Sekundärstruktur

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von NPP1 im Einbuchstabencode sowie die daraus resultierende vorausgesagte Sekundärstruktur des Proteins nach Frishman & Argos (1996). H: α -Helix; C: Zufallsstruktur („random coiled“); E: β -Faltblatt. Gelb unterlegt sind Bereiche, die vermutlich α -Helix-Strukturen aufweisen, blau unterlegt sind putative β -Faltblatt-Bereiche.

Das Protein NPP1 enthält jedoch zwei Cysteinreste in den Positionen 56 und 82, die in allen bisher isolierten NPP1-Homologen hochkonserviert sind (vgl. Abb. 3-3 und Abb. 3-12A). Sie weisen einen Abstand von 25 Aminosäuren auf. Um den Einfluss einer möglichen Disulfidbrücke zwischen beiden zu untersuchen, wurden diese Cysteinreste durch Serinreste einzeln substituiert (NPP1-M1, [C₅₆→S₅₆] und NPP1-M2, [C₈₂→S₈₂]). Die Substitution erfolgte durch den Einsatz von Oligonukleotiden mit entsprechendem Nukleotidaustausch (s. Anhang 3) in einer PCR-Reaktion. Diese eine Punktmutation enthaltenden Varianten der für NPP1 kodierenden cDNA wurden in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert. Die Expression sowie die Reinigung der GST-Fusionsproteine (NPP1-M1 und NPP1-M2) erfolgte erneut durch Affinitätsreinigung an GSH-Agarose. Abbildung 3-12B zeigt die affinitätsgereinigten Expressionsprodukte nach Proteaseverdau mit Faktor Xa sowohl als Silber-gefärbte SDS-PAGE (I) als auch in einer Immunoblotanalyse (II). Neben der Proteinbande, die der GST entspricht, wurden für jedes NPP1-Derivat 2 Proteinbanden detektiert, die vom Anti-NPP1-Antikörper AK152 erkannt wurden.

Die Elicitoraktivität der erhaltenen rekombinanten Proteine NPP1-M1 und NPP1-M2 wurde in Petersilieprotoplasten und Tabakblättern getestet. Es zeigte sich, dass die mutierten Varianten NPP1-M1 und NPP1-M2 im Gegensatz zu NPP1 in Suspensionen von Petersilieprotoplasten die Phytoalexinakkumulation nur in der Schwankungsbreite der GST-Kontrolle (10-20 % der Elicitoraktivität von NPP1) induzieren (Abb. 3-13A). Des Weiteren wurde beobachtet, dass der Zelltod der Petersilieprotoplasten nach Zugabe der mutierten NPP1-Versionen ebenso ausbleibt (nicht dargestellt) wie die Nekrosebildung in Tabakblättern (Abb. 3-13C).

Durch eine Konzentrationsreihe sollten die EC₅₀-Werte von NPP1-M1 und NPP1-M2 (M1 und M2 in Abb. 3-13B) ermittelt werden. Die für NPP1-M1 und NPP1-M2 erhaltenen

Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinakkumulation sind fast deckungsgleich mit der Kurve der Negativkontrolle GST (Abb. 3-13B). Daraus ist zu schließen, dass sie nahezu keine spezifische Elicitoraktivität aufweisen und demzufolge eine Angabe von EC_{50} -Werten unmöglich ist. Aus dem Verlust der Elicitoraktivität von NPP1 nach Einzelsubstitution der beiden konservierten Cysteinreste lässt sich ableiten, dass die Sekundärstruktur des Protein vermutlich Einfluss auf die biologische Aktivität hat. Möglicherweise wird zwischen beiden eine strukturegebende Disulfidbrücke ausgebildet.

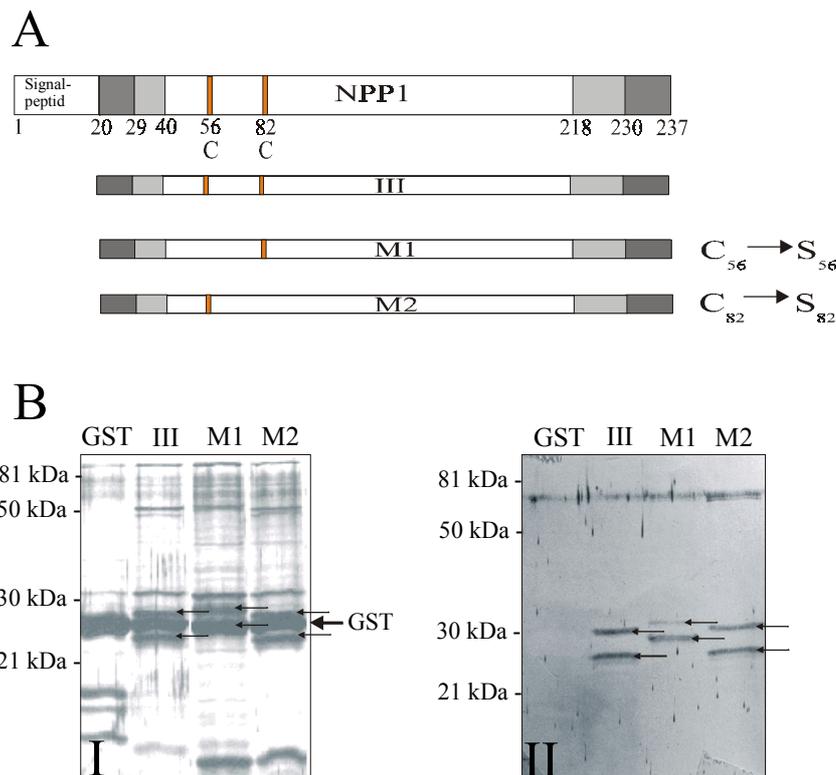


Abb. 3-12: Heterologe Expression mutierter NPP1-Varianten in *E. coli* und gelelektrophoretische Analyse rekombinanter NPP1-Derivate

(A) Dargestellt ist NPP1 (III, oberster Balken) und die relative Lage der substituierten Cysteinreste in den mutierten Varianten des NPP1-Elicitorproteins. M1: NPP1-M1 [Substitution in Position 56 der Aminosäuresequenz] und M2: NPP1-M2 [Substitution in Position 82 der Aminosäuresequenz], wobei jeweils ein Austausch des Cysteins durch Serin erfolgte). Die DNA-Konstrukte wurden in den Expressionsvektor pGEX-5X-1 kloniert, was die Expression als GST-Fusionsprotein erlaubte. Die Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte sind im Anhang 5a zusammengefasst, die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind in Anhang 2 und 3 enthalten.

(B) Die Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli* (GST-Fusionsprodukte) wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das bakterielle Pellet wurde lysiert, die im Überstand enthaltenen Proteine wurden durch Affinitätschromatographie an GSH-Agarose gereinigt und der GST-Anteil der Fusionsprodukte durch Proteasebehandlung mit Faktor Xa abgespalten. Dargestellt ist die gelelektrophoretische Auftrennung der Expressionsprodukte mit anschließender Silberfärbung (I) oder Immunoblotanalyse (II), wobei als primärer Antikörper der Anti-NPP1-Peptidantikörper (AK152) und als sekundärer Antikörper ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet wurde. Die Detektion erfolgte mit dem NBT-BCIP-Substrat. Aufgetragen wurde 1 μ g Gesamtprotein. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist jeweils links vom Proteingel angegeben. Die Proteinbanden für NPP1 und seine Derivate sind durch Pfeile markiert.

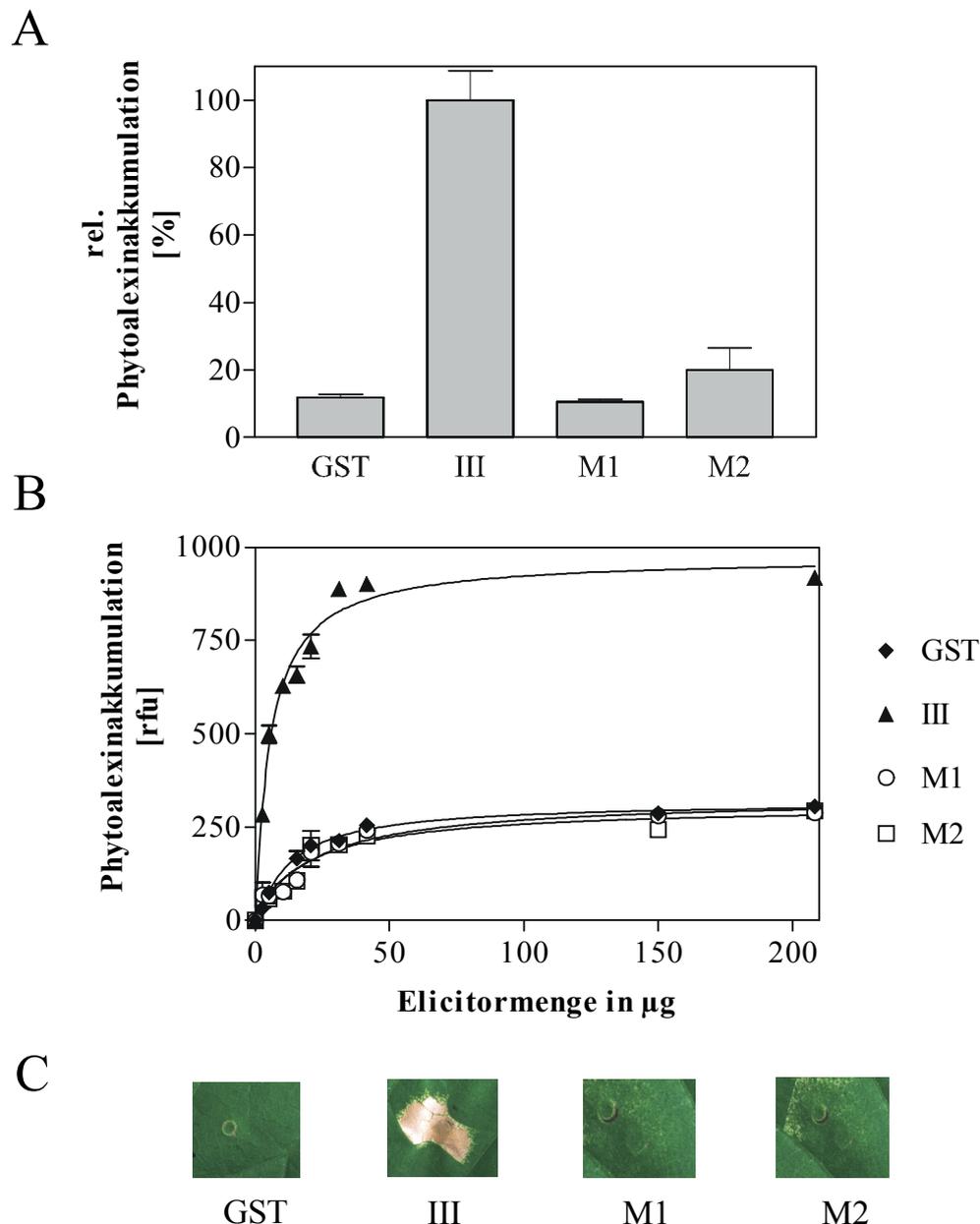


Abb. 3-13: Elicitoraktivität von NPP1 und den Substitutionsderivaten NPP1-M1 und NPP1-M2

Untersucht wurde die Elicitoraktivität von affinitätsgereinigten, rekombinanten NPP1-Derivaten (GST-Fusion) im Vergleich mit NPP1 als Positivkontrolle und GST als Negativkontrolle. GST: Glutathion-S-Transferase; III: NPP1; M1: NPP1-M1 (C₅₆→S₅₆); M2: NPP1-M2 (C₈₂→S₈₂). Die Ergebnisse der Experimente in Petersilieprotoplasten resultieren aus 3-fach Bestimmungen, in Tabakblättern wurden 2-fach Bestimmungen durchgeführt.

(A) Je 100 nM des entsprechenden Proteins wurden auf Induktion der Phytoalexinbiosynthese in 100 µl Petersilieprotoplasten (5×10^5 /ml) getestet. Zum Vergleich der Elicitoraktivität der Expressionsprodukte wurde die durch NPP1 (Fragment III) induzierte Phytoalexinmenge als 100 % definiert.

(B) Dosis-Wirkungskurven der Phytoalexinakkumulation in Suspensionen von Petersilieprotoplasten (5×10^5 /ml) nach Zugabe von rekombinanten NPP1 und seiner Derivate. 100 µl Petersilieprotoplastensuspension wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen der Expressionsprodukte behandelt. Nach 24 h wurde die Fluoreszenz der gebildeten Phytoalexine in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) bestimmt.

(C) Wässrige Lösungen der angegebenen NPP1-Derivate (2 µM) wurden in Tabakblätter infiltriert und 24-48 h nach Applikation die Nekrosebildung analysiert. Eintrocknete gelbe bis braune Bereiche in den Blattausschnitten zeigen die Nekrosen an.

3.5 Ethylenbildung in Petersiliezellen nach NPP1-Applikation

Für NEP1 aus *Fusarium oxysporum* ist bekannt, dass dieses Protein die Ethylenbiosynthese in verschiedenen dikotyledonen Pflanzen induziert (Bailey, 1995, Jennings *et al.*, 2000). Aufgrund der Ähnlichkeit zwischen NPP1 und NEP1 wurde die Induktion der Ethylenbildung durch NPP1 in Petersiliezellkulturen untersucht. Die Ethylenbestimmung erfolgte nach Chappell *et al.* (1984) in Kooperation mit Prof. T. Boller (Friedrich-Miescher-Institut Basel, Schweiz). Pep-13, das ebenfalls die Ethylenbildung induziert (Nürnberger *et al.*, 1994), wurde als Kontrolle eingesetzt. Nach Elicitorgabe wurden Gasproben aus der inneren Atmosphäre der Kulturkolben von Petersiliezellensuspensionen entnommen, die mit entsprechenden Efektoren behandelt waren. Diese Proben wurden gaschromatographisch analysiert und die gebildete Ethylenmenge in pmol/ml Zellkultur bestimmt.

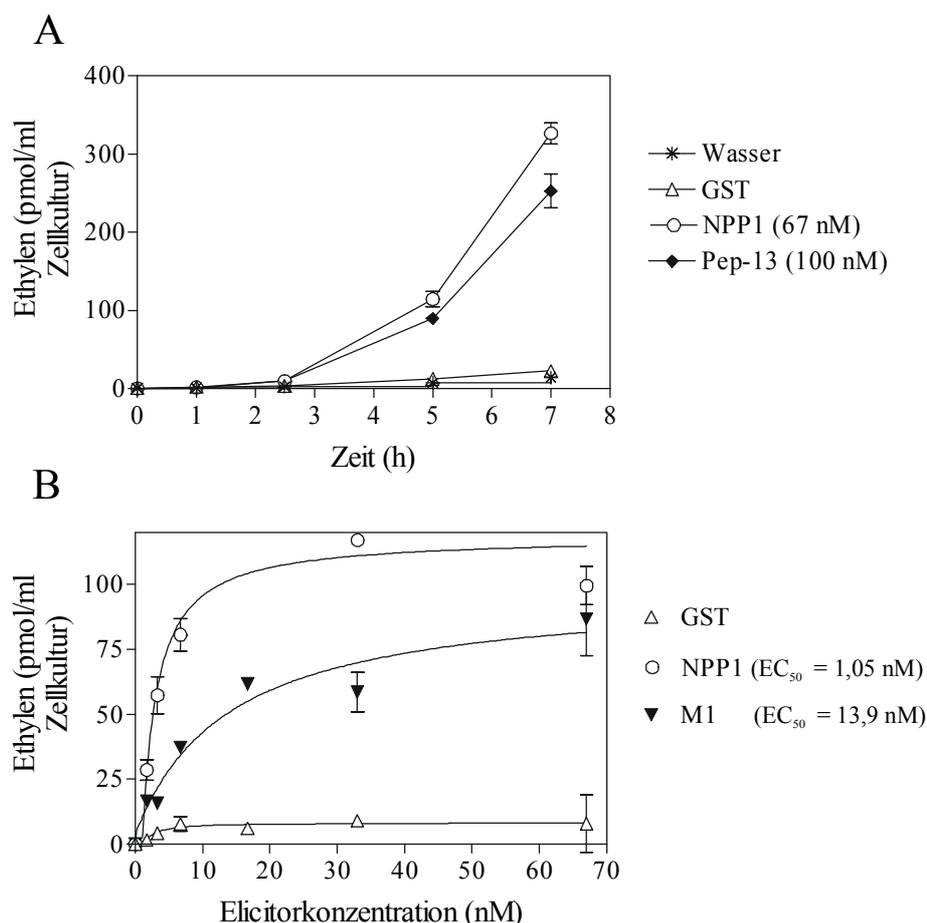


Abb. 3-14: Ethylenbildung in Petersiliezellensuspensionskulturen nach Elicitorgabe

(A) Untersucht wurde die Zeitabhängigkeit der Induktion der Ethylenbiosynthese in Petersiliezellensuspensionskulturen nach Applikation von Pep-13 (100 nM), NPP1 (67 nM), GST (100 nM) und Wasser. Petersiliezellen (1 g/10 ml Medium) wurden mit dem entsprechenden Elicitor behandelt. 1 ml Gasproben der inneren Atmosphäre der Kulturkolben wurden mittels Gaschromatographie analysiert und der Ethylengehalt in pmol/ml Zellkultur bestimmt.

(B) Dosis-Wirkungskurve der Ethylenbiosynthese von Petersiliezellen nach Zugabe von GST, NPP1 und NPP1-M1. 5 h nach Applikation des entsprechenden Elicitors wurde die gebildete Ethylenmenge (pmol/ml Zellkultur) mittels Gaschromatographie ermittelt. GST: Glutathion-S-Transferase; NPP1: Fragment III; M1: NPP1-M1.

Es wurde deutlich, dass neben Pep-13 (100 nM) auch NPP1 (67 nM) die Ethylenbildung in Petersiliezellen induziert (Abb. 3-14). Die Freisetzung von Ethylen begann ca. 2,5 h nach Zugabe des Elicitors und stieg bis 7 h nach Elicitorgabe deutlich an (Abb. 3-14A). GST induziert die Ethylenbiosynthese nicht. Für NPP1 und NPP1-M1 wurde außerdem die Konzentrationsabhängigkeit der Ethylenbildung ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven der gebildeten Ethylenmenge sind in Abb. 3-14B dargestellt. Der EC_{50} -Wert der Ethylenbildung beträgt für NPP1-M1 13,9 nM. Im Vergleich zu NPP1 ($EC_{50} = 1,05$ nM) ist er ca. 13-fach geringer. Das Substitutionsderivat NPP1-M1 scheint im Gegensatz zu anderen pflanzlichen Abwehrreaktionen die Ethylenbiosynthese zu induzieren. Jedoch ist das Ausmaß der Ethylenbildung deutlich geringer als für das nicht veränderte NPP1. Die Unterschiede in der Menge des von Petersiliezellen freigesetzten Ethylen nach NPP1- und NPP1-M1-Applikation könnten auf die veränderte Sekundärstruktur des Proteins nach Substitution des Cysteinrestes durch Serin zurückzuführen sein (vgl. 3.4).

3.6 Radioaktive Markierung von NPP1

Zur Detektion einer putativen Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliezellen oder in mikrosomalen Membranen von Petersilie war es nötig, den Liganden radioaktiv zu markieren. Die Charakterisierung hochaffiner Bindungsstellen verlangt einen Liganden mit sehr hoher spezifischer Radioaktivität (Hulme & Birdsall, 1990). Für verschiedene NPP1-induzierte Abwehrreaktionen konnten EC_{50} -Werte von ca. 1 nM (Ethylenbiosynthese in Petersiliezellensuspensionskulturen) bis 10 nM (Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten) ermittelt werden. In einer rezeptorvermittelten Signaltransduktionskette sollte die Dissoziationskonstante (K_d) des Rezeptor-Liganden-Komplexes im gleichen Größenbereich liegen wie die ermittelten EC_{50} -Werte der verschiedenen Abwehrreaktionen. Zur Detektion einer Bindungsstelle mit einer Bindungskonstante von 1-10 nM ist deshalb erfahrungsgemäß eine spezifische Radioaktivität des Liganden im Bereich von 100-1000 Ci/mmol Voraussetzung. Für die Versuche zur Markierung von NPP1 wurde rekombinantes His₁₀-NPP1 verwendet (vgl. 3.3.2).

3.6.1 Markierung von NPP1 mit [¹²⁵I]

Die Iodierung von Proteinen mit [¹²⁵I] ermöglicht eine Ligandenmarkierung mit einer spezifischen Radioaktivität bis 2200 Ci/mmol. Durch einen elektrophilen Angriff von aktiviertem I^+ an die Metaposition im Phenylring von Tyrosinresten kann die Kopplung von [¹²⁵I] an Proteine und Peptide erfolgen. Für die Iodierung von NPP1 stehen 14 Tyrosinreste zur Verfügung (vgl. Abb. 3-1). Da jeder Phenylring im Tyrosin zwei Iod-Atome binden kann, besteht die theoretische Möglichkeit des Einbaus von bis zu 28 Iodresten in das Protein

NPP1. Die Testiodierung von NPP1 mittels „Iodobeads“ der Firma Pierce (Rockford, USA) und nicht radioaktiv markiertem NaI erfolgte nach Herstellerangaben. Das Iodierungsreagenz N-Chlor-Benzylsulfonamid-Natriumsalz ist auf der Oberfläche einer Polystyrolperle immobilisiert. Es handelt sich um ein oxidierendes Reagenz, das jedoch milder als das häufig verwendete Chloramin-T wirkt (Markwell, 1982). Zuerst wurde NaI (2,5 μM oder 5 μM) durch Zugabe zur Reaktionsperle aktiviert und anschließend das Protein His₁₀-NPP1 (5 μM) zugegeben. Das Zwei-Phasen-System der Reaktion soll den direkten Kontakt des Proteins mit dem Oxidationsmittel verringern, um eine für das Protein schonende Reaktion zu ermöglichen. Untersucht wurde die Zeitabhängigkeit der Iodierungsreaktion, indem Aliquots nach 0 s, 15 s, 30 s, 90 s, 2 min und 5 min entnommen wurden. Zur Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit und Reduzierung der Zahl der eingebauten Iod-Atome erfolgte die Reaktion bei 4°C statt bei RT. Die aus dem Iodierungsreaktionsansatz entnommenen Aliquots wurden in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Schon nach 15 s der Iodierungsreaktion war kein NPP1 mehr nachweisbar (nicht dargestellt), so dass andere Möglichkeiten der Iodierung von NPP1 getestet wurden. Es wurde vermutet, dass N-Chlorbenzolsulfonamid-Natriumsalz zu aggressiv auf das Protein NPP1 wirkt und durch Oxidation einzelner Aminosäurereste die Inaktivierung des Proteins bewirkt wird (Rehm, 1996).

Deshalb wurden in einem weiteren Versuch „IODOgen“-beschichtete Reaktionsgefäße der Firma Pierce eingesetzt. Das verwendete Iodierungsreagenz 1,3,4,6-tetrachloro-3 α -6 α -diphenyl-glycoluril wird als mildes Festphasen-Oxidationsmittel beschrieben (Fraker & Speck, 1978, Salacinski *et al.*, 1981). Es ermöglicht ebenso schonende Reaktionsbedingungen wie enzymatische Reaktionsmittel, z.B. Lactoperoxidase. Dies sollte eventuelle Präzipitationen oder Inaktivierungen des Proteins verhindern, auch weil der direkte Kontakt des Proteins mit der reaktionsaktivierenden Substanz entfällt. Die Bildung von aktiviertem I⁺ erfolgte durch Zugabe von NaI in ein mit dem Oxidationsmittel beschichtetes Reaktionsgefäß. Anschließend wurde das I⁺ aus dem Reaktionsgefäß entnommen und in eine neues Gefäß gegeben, das das zu iodierende Protein His₁₀-NPP1 enthielt. Die Testreaktion erfolgte ebenfalls bei 4°C in einer Kinetik (0 s, 30 s, 1 min, 5 min, 10 min). Der Verlauf der Reaktion wurde erneut in einer SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung analysiert. Auch bei Verwendung dieses Iodierungssystems war nach kurzer Inkubation (30 s) kein NPP1 mehr detektierbar (Abb. 3-15).

Mit beiden Methoden war es nicht möglich, einen iodierten biologisch aktiven Liganden herzustellen. Dieser ist jedoch für Rezeptorbindungsstudien unerlässlich. Der Einbau von bis zu 28 Iod-Atomen an 14 Tyrosinresten könnte zur Veränderung der Konformation von NPP1 führen, so dass das Protein aggregiert, präzipitiert und somit inaktiviert wird. NPP1-Aggregate könnten eventuell die in Abb. 3-15 nach 5 und 10 min Reaktion beobachteten Proteinbanden im oberen Bereich der SDS-PAGE (60-70 kDa) sein. Für sie ist eine deutliche Zu-

nahme der Intensität in Abhängigkeit von der Reaktionszeit zu verzeichnen. Eine limitierte Iodierung von einzelnen Resten, die durch die kurzen Reaktionszeiten (unter 10 min) und eine niedrige Reaktionstemperatur (4°C) erreicht werden sollte, war nicht möglich. Deshalb sollten andere Verfahren zur Markierung des Liganden geprüft werden.

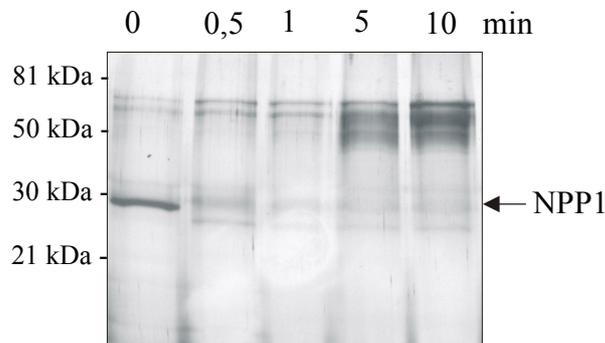


Abb. 3-15: Gelelektrophoretische Analyse der Iodierung von NPP1
5 μ M His₁₀-NPP1 und 2,5 μ M NaI wurden für die Iodierung mittels „IODOgen“-beschichteter Reaktionsgefäße eingesetzt. Nach 0, 30 und 60 s, sowie nach 5 und 10 min wurde die Reaktion beendet und die Hälfte jedes Ansatzes zur gelelektrophoretischen Analyse mit anschließender Silberfärbung eingesetzt. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist links vom Proteingel angegeben.

3.6.2 Markierung von NPP1 mit [³⁵S]

In einem weiteren Versuch, das Protein NPP1 radioaktiv zu markieren, sollte ein Einbau von [³⁵S]-Methionin während der Expression von His₁₀-NPP1 in *E. coli* erfolgen. Da Bakterien wie *E. coli* auf einem alternativen Syntheseweg das Schwefelmolekül eines Cysteinrestes für die Bildung eines Methionins nutzen können, wurde zur Proteinbiosynthese ein Aminosäuregemisch aus [³⁵S]-Methionin/[³⁵S]-Cystein (Verhältnis: 80/20) eingesetzt. Dies sollte die Möglichkeit eröffnen, eine höhere spezifische Radioaktivität des Liganden durch die bakterielle Proteinexpression zu erreichen. Die spezifische Radioaktivität des Aminosäuregemisches betrug >1000 Ci/mmol. Das Protein NPP1 enthält 3 Methioninreste und 2 Cysteinreste, die gegebenenfalls radioaktiv markiert werden können, so dass theoretisch eine hohe spezifische Radioaktivität erzielt werden kann, die für Rezeptor-Bindungsstudien erforderlich ist.

Die Reinigung des His₁₀-Fusionsproteins erfolgte erneut durch Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose. Die Autoradiographie des SDS-Polyacrylamidgels der Reinigungsstufen für [³⁵S]-NPP1 zeigt, dass nach der Affinitätschromatographie in den Elutionsfraktionen nur ein radioaktiv markiertes Protein ([³⁵S]-NPP1) detektierbar ist (Abb. 3-16). Mit dieser Methode konnte [³⁵S]-NPP1 mit einer spezifischen Radioaktivität von 1,7 Ci/mmol bei 6-stündiger Inkubation in methioninfreiem Medium und 1 Ci/mmol bei 12-stündiger Behandlung ohne Methionin gebildet werden. Für die Verwendung von [³⁵S]-NPP1 in Bindungsexperimenten ist die erreichte spezifische Radioaktivität jedoch viel zu gering. Vermutlich konnten die endogenen Methioninspeicher nicht ausreichend entleert werden, so dass die

Bakterien nur wenig radioaktiv markiertes [^{35}S]-Methionin während der Proteinbiosynthese einsetzen mussten. Deshalb sollte eine alternative Methode zur radioaktiven Markierung von NPP1 angewendet werden.

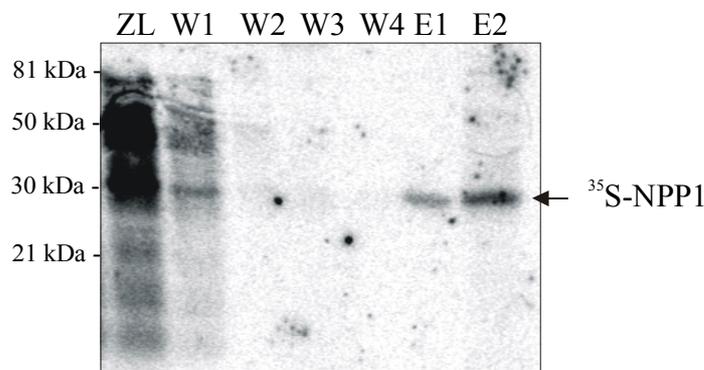


Abb. 3-16: Gelelektrophoretische Analyse der Reinigung von rekombinantem [^{35}S]-NPP1
Zur Expression des rekombinanten [^{35}S]-NPP1 (His₁₀-Fusion) wurden Bakterien nach Erreichen der OD₆₀₀=0,6 in methioninfreiem Minimalmedium inkubiert, um endogene Methioninlager zu entleeren. Vor Induktion der Expression in *E. coli* durch Zugabe von IPTG wurde [^{35}S]-Methionin/[^{35}S]-Cystein im Verhältnis: 80/20 zugesetzt. Das bakterielle Pellet wurde lysiert und die löslichen Bestandteile des Überstands durch Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose gereinigt. Die Reinigungsfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch analysiert. ZL: Zelllysat; DF: Durchfluss; W1-W4: Waschfraktionen; E1, E2: Elutionsfraktionen. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist links vom Proteingel angegeben.

3.6.3 Markierung von NPP1 mit [^{32}P]

Eine weitere Möglichkeit, NPP1 mit hoher spezifischer Radioaktivität zu markieren, ist die Phosphorylierung des Proteins. Die spezifische Aktivität von [^{32}P] ist mit 4500 Ci/mmol etwa doppelt so hoch wie die von [^{125}I]. Für diese Methode der radioaktiven Markierung wurden N- bzw. C-terminal spezifische Phosphorylierungssequenzen (LRRASLG) für eine cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) an das Protein NPP1 angefügt. Dadurch wurde eine spezifische Phosphorylierung des Serinrestes in der Erkennungssequenz ermöglicht. Die Phosphorylierungssequenz konnte mittels PCR, durch den Einsatz entsprechender Oligonukleotide (PKA1, PKA2, s. Anhang 2) eingefügt werden. Die Expression der Proteine mit N-terminaler His₁₀-Fusion erlaubte die Affinitätsreinigung von NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 mittels Ni-NTA-Agarose. Die Elicitoraktivität der NPP1-Derivate wurde in Petersilieprotoplasten und durch Infiltration in Tabakblätter getestet. NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 wiesen eine ähnliche Elicitoraktivität auf wie NPP1. In Tabakblättern lösten diese NPP1-Derivate nekrotische Läsionen aus. Die EC₅₀-Werte der Phytoalexinakkumulation in Petersilieprotoplasten waren mit 50 nM zwar etwas höher als für nicht modifiziertes NPP1 (10 nM), lagen aber noch im gleichen Größenbereich. Aus diesem Grunde waren die Proteine NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 dennoch zur radioaktiven Markierung geeignet.

3.6.3.1 Phosphorylierungsreaktion

Die Phosphorylierung erfolgte mittels einer cAMP-abhängigen PKA, wobei als Substrate NPP1-PKA1 bzw. NPP1-PKA2 und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ eingesetzt wurden. Untersucht wurde zuerst die Zeitabhängigkeit der enzymatischen Reaktion, in welcher neben NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 ein Kontrollpeptid (PKA-Peptid, vgl. Tab. 2-3) mit der gleichen Erkennungssequenz eingesetzt wurde. Bereits nach 30-minütiger Reaktion waren die phosphorylierten Proteine ($[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NPP1-PKA1}$, $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NPP1-PKA2}$) bzw. das phosphorylierte PKA-Peptid detektierbar (Abb. 3-17). Das erwartete Molekulargewicht des modifizierten NPP1 beträgt aufgrund der His₁₀-Fusion und der zusätzlichen Phosphorylierungsstelle 27 kDa, das des PKA-Peptids 2,2 kDa. Wegen nachlassender enzymatischer Aktivität der PKA wurde nach 5-stündiger Reaktion für beide NPP1-PKA-Varianten weniger $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NPP1}$ detektiert. Eventuell könnten in der Präparation der rekombinanten Proteine geringe Spuren von Phosphatasen enthalten sein, die bei abnehmender Wirkung der PKA das Gleichgewicht der Phosphorylierungsreaktion zugunsten der Ausgangssubstanzen verschiebt. Nach der Phosphorylierung von NPP1-PKA1 (N-terminale Modifikation) waren mehrere phosphorylierte Proteine im SDS-Polyacrylamidgel detektierbar. Auffällig waren vor allem zwei Proteinbanden mit kleinerem Molekulargewicht (ca. 10-15 kDa). Diese konnten in der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE des affinitätsgereinigten Proteins nicht detektiert werden. Vermutlich handelt es sich um Spuren unvollständig synthetisierter NPP1-PKA1-Derivate, die neben dem His₁₀-Teil des Fusionsproduktes eine intakte Phosphorylierungsstelle enthalten. Sie können somit ebenfalls eine Ausgangsverbindung für die Phosphorylierung mittels PKA darstellen. Für NPP1-PKA2 konnte nur ein Hauptprotein detektiert werden, das dem NPP1-Derivat entspricht. Beim NPP1-PKA2 befindet sich die Phosphorylierungsstelle im C-terminalen Bereich, so dass eventuell unvollständig synthetisierte Proteine keine Phosphorylierungsstelle enthalten und somit kein Substrat für die PKA sind.

Deutliche Unterschiede in der Phosphorylierungsstärke konnten zwischen den phosphorylierten Proteinen ($[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NPP1-PKA1}$, $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NPP1-PKA2}$, 1 und 3 in Abb. 3-17) und dem PKA-Peptid (2 in Abb. 3-17) beobachtet werden. Erkennbar ist die stärkere Phosphorylierung des PKA-Peptids an der großen radioaktiv markierten Fläche im unteren Bereich des Proteingels, die nur in den Phosphorylierungsreaktionen mit dem Peptid auftritt. Vermutlich ist der Serinrest der spezifischen Phosphorylierungsstelle im Peptid besser zugänglich als im Protein.

Eine effizientere Phosphorylierung von NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 sollte der Zusatz von DTT ermöglichen. Diese reduzierende Substanz sollte ein partielles Auffalten der Proteine bewirken und dadurch vorhandene sterische Hinderungen aufheben. Eine Veränderung des Phosphorylierungsgrades konnten durch den Einsatz von DTT jedoch nicht beobachtet werden (nicht dargestellt).

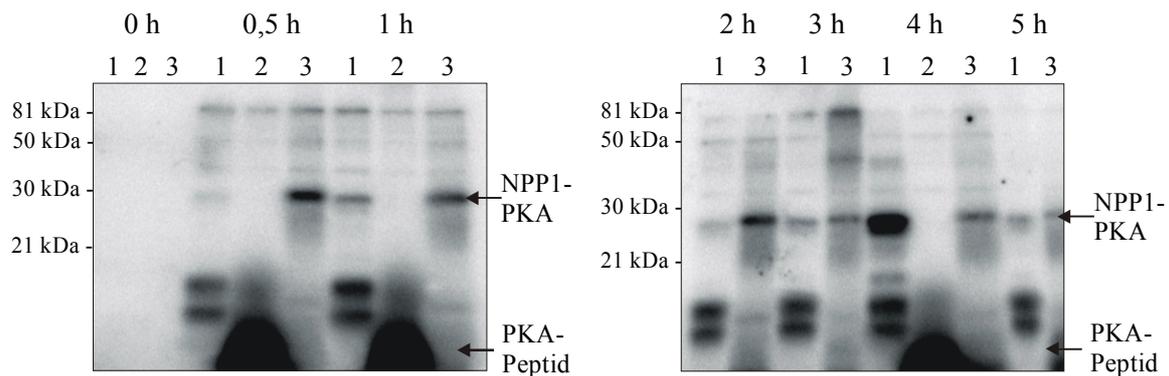


Abb. 3-17: Autoradiographische Analyse der Phosphorylierungsreaktion von NPP1

Die Expression rekombinanter NPP1-Derivate (His₁₀-Fusion von NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2) in *E. coli* wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Das bakterielle Pellet wurde lysiert und die im Überstand enthaltenen Proteine durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose gereinigt. Die affinitätsgereinigten NPP1-Derivate (5 pmol NPP1-PKA1, 5 pmol NPP1-PKA2) mit der spezifischen Phosphorylierungsstelle (LRRASLG) sowie ein Kontrollpeptid (5 pmol PKA-Peptid) wurden mittels cAMP-abhängiger Proteinkinase (5 U PKA) und 5 pmol [γ -³²P]ATP radioaktiv markiert. Die Autoradiographie der SDS-PAGE zeigt den Zeitverlauf der Phosphorylierungsreaktion. 1: NPP1-PKA1 [N-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle]; 2: PKA-Peptid [RHM-KLEFLRRASLGDVISH]; 3: NPP1-PKA2 [C-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle]. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist jeweils links vom Proteingel angegeben.

3.6.3.2 Reinigung von [³²P]-NPP1

Zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Proteins war es notwendig, freies [γ -³²P]ATP von eingebautem [³²P] ([³²P]-NPP1-PKA1 und [³²P]-NPP1-PKA2) zu trennen. Diese Trennung erfolgte durch eine Dünnschichtchromatographie mit anschließender Autoradiographie (Abb. 3-18). Die autoradiographisch detektierten Spots wurden ausgekratzt und mittels SDS-PAGE und erneuter Autoradiographie analysiert. So konnten den Spots die verschiedenen [³²P]-markierten Bestandteile des Reaktionsansatzes zugeordnet werden. Die Phosphorylierungsreaktionen erfolgten im Vergleich mit und ohne Zusatz der PKA. Enzymabhängig konnten am Startpunkt die markierten Produkte [³²P]-NPP1-PKA1 und [³²P]-NPP1-PKA2 nachgewiesen werden, während die anderen Reaktionskomponenten durch die dünnschichtchromatographische Trennung separiert wurden. Durch Vergleichsanalyse mit reinem [γ -³²P]ATP wurde nachgewiesen, dieses den Spots der Reihe [B] (Abb. 3-18) entspricht.

In einer präparativen Dünnschichtchromatographie wurden die [³²P]-NPP1-PKA1 und [³²P]-NPP1-PKA2 enthaltenden Partikel ebenfalls ausgekratzt und die Proteine unter Verwendung von 2 M NaCl eluiert. Diese hohe Salzkonzentration im Elutionspuffer war die einzige Möglichkeit, das Protein ohne Zusatz von Detergenzien von den Dünnschichtpartikeln zu reisolieren. Kontrolliert wurde die Ausbeute des Herauslöses durch Scintillationspektrometrie. Dies erfolgte in einer Vergleichsmessung zwischen partikelgebundener Radioaktivität und der nach der Elution im Elutionspuffer enthaltenen Radioaktivität. Mit diesem Verfahren war es möglich, 90-95 % der in den Dünnschichtpartikeln gebundenen Radioakti-

vität zu eluieren. Die dialysierten Elutionsfraktionen wurden eingengt und für Bindungsexperimente verwendet (vgl. 3.7).

Die spezifische Radioaktivität von [^{32}P]-NPP1-PKA1 und [^{32}P]-NPP1-PKA2 wurde nach TCA-Fällung der Proteine in einem Vakuumfiltrationsassay ermittelt. Zur Bestimmung des unspezifisch gebundenen [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] bzw. [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP wurde der Phosphorylierungsansatz ohne Zusatz der PKA eingesetzt. Aus der Differenz beider Werte konnte somit die spezifische Radioaktivität ermittelt werden. Sowohl für NPP1-PKA1 als auch für NPP1-PKA2 konnte für die spezifische Radioaktivität ein Wert von 40 Ci/mmol ermittelt werden. Mit der gleichen Methode wurde für das [^{32}P]-PKA-Peptid ein Wert von 150 Ci/mmol ermittelt.

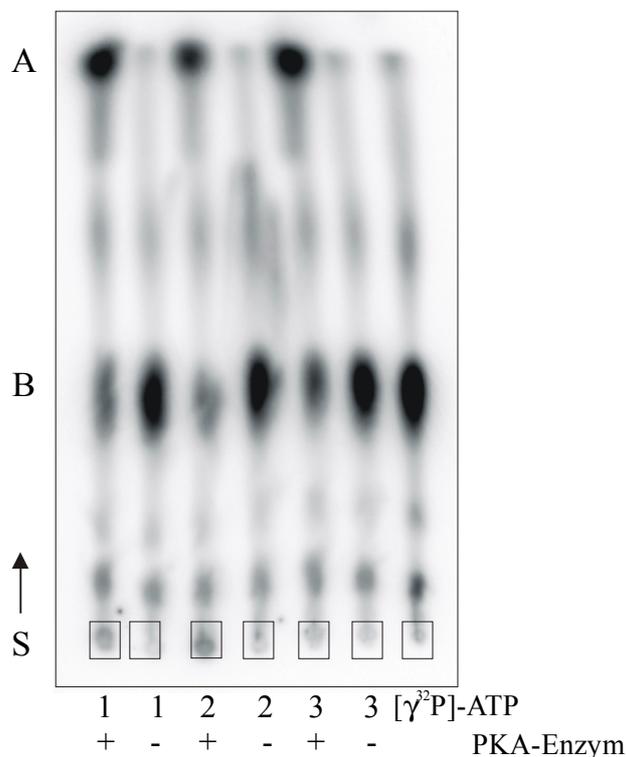


Abb. 3-18: Dünnschichtchromatographische Untersuchung der Phosphorylierungsreaktion von NPP1
 2 μl des Reaktionsansatzes der Phosphorylierung (5 pmol Protein oder Peptid und 5 pmol [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP, sowie 5 U cAMP-abhängige Proteinkinase [PKA]) wurden durch Dünnschichtchromatographie und Autoradiographie analysiert. Verwendet wurde eine Polyethylenimin-Zellulose-beschichtete Dünnschichtplatte (20 x 10 cm) und 0,8 M NaH_2PO_4 als Laufmittel. Die Trennung erfolgte für 60 min, die Autoradiographie für 30 min. Zur Kontrolle wurde reines [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP (rechte Spur) aufgetragen. 1: [^{32}P]-NPP1-PKA1 [N-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle]; 2: PKA-Peptid [RHMKLEFLRRASLGDVISH]; 3: [^{32}P]-NPP1-PKA2 [C-terminale PKA-Phosphorylierungsstelle], +: Reaktionsansatz unter Zugabe der PKA; -: Reaktionsansatz ohne Zusatz des Enzyms; S: Startpunkt der Dünnschichtchromatographie; A: vermutlich [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]; B: [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$]ATP; der Pfeil gibt die Richtung des Laufmittels an.

3.7 Bindungsstudien zur Detektion einer putativen Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen

Trotz der relativ geringen spezifischen Radioaktivität von [^{32}P]-NPP1-PKA1 bzw. [^{32}P]-NPP1-PKA2 (40 Ci/mmol), die mit der Phosphorylierung erzielt werden konnte, wurden Rezeptor-Bindungsstudien mit diesem Radioliganden durchgeführt.

Zur Detektion einer putativen Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen wurden 2 und 10 nM NPP1-PKA1 bzw. NPP1-PKA2 eingesetzt, wobei ein Vergleich der Bindung des Radioliganden mit und ohne Zusatz von Kompetitor (2 μM nicht-radioaktiv markiertes NPP1) erfolgte. Abbildung 3-19 zeigt die Ergebnisse eines Experiments in welchem [^{32}P]-NPP1-PKA2 als Radioligand eingesetzt wurde. Das gleiche Ergebnis lieferte auch der Einsatz des Liganden [^{32}P]-NPP1-PKA1. Es war in beiden Fällen möglich, bei Einsatz von 10 nM [^{32}P]-NPP1 mehr filtergebundene Radioaktivität zu detektieren als bei Verwendung von 2 nM Radioligand. Da es aber keine Unterschiede zwischen den ermittelten Werten mit und ohne Zusatz des Kompetitors gab, muss von unspezifischer Bindung des Radioliganden an Bestandteile der Petersiliemikrosomen ausgegangen werden.

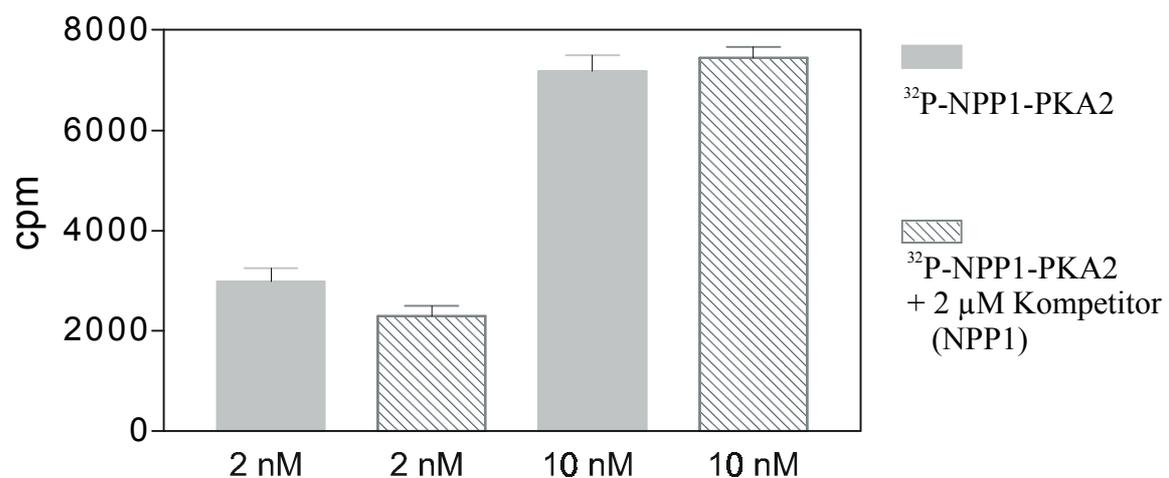


Abb. 3-19: Bindungsstudien zur NPP1-Bindungsstelle in Petersiliemikrosomen
Petersiliemikrosomen (300 μg Gesamtprotein) wurden mit [^{32}P]-NPP1-PKA2 (2 nM, 10 nM) für 60 min bei 4°C in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 0,1 % BSA, 100 μM Leupeptin inkubiert. Anschließend wurde die an die Mikrosomen gebundene Radioaktivität durch eine Filtrationsmethode (Wang *et al.*, 1990) mit anschließender Scintillationsspektrometrie der filtergebundenen Radioaktivität ermittelt. Die unspezifische Bindung wurde durch Zusatz von Kompetitor (2 μM NPP1) zum Bindungsansatz ermittelt. Es erfolgten 2 unabhängige Experimente mit 3 Parallelen.

Ein Proteinquervernetzungsexperiment sollte als alternatives Verfahren dazu dienen, eine Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen zu detektieren und das Molekulargewicht zu bestimmen. Die Bindung des Radioliganden erfolgte wie beim Filtrationsbindungsassay, jedoch wurden die Mikrosomen anschließend mittels Zentrifugation pelletiert. Unter Einwirkung des homobifunktionellen Reagenz BS³ (Bis-(Sulfosuccinimidyl)suberat) wurde der Radioligand kovalent mit der Bindungsstelle verbunden (Partis *et al.*, 1983).

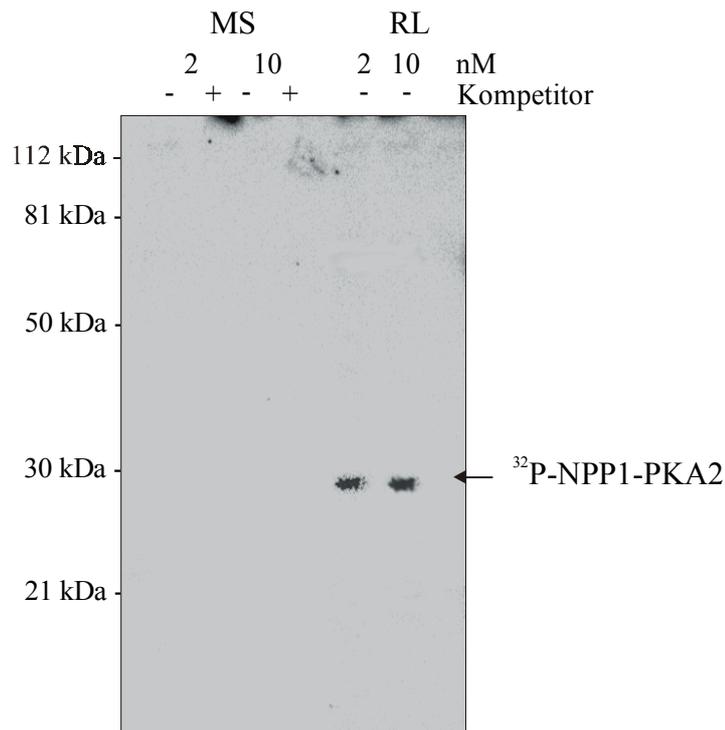


Abb. 3-20: Kovalente Verknüpfung von [^{32}P]-NPP1-PKA2 mit Proteinen in Petersiliemikrosomen mittels BS^3 . Petersiliemikrosomen (300 μg Gesamtprotein) wurden mit [^{32}P]-NPP1-PKA2 (2 nM, 10 nM) für 60 min bei 4°C in 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0,1 % BSA, 100 μM Leupeptin in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) eines molaren Überschusses unmarkierten NPP1 (2 μM) inkubiert. Anschließend wurde der Radioligand mit mikrosomalen Proteinen durch den Einsatz von 8 mM BS^3 quervernetzt. Die Bindungsansätze wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und einer Autoradiographie unterzogen. MS: Petersiliemikrosomen; RL: Radioligand; -: kein Kompetitor; +: Kompetitor. Die Größe der Molekulargewichts-Markerproteine ist links vom Proteingel angegeben.

Dieses Experiment wurde unter Einsatz des Radioliganden allein ([^{32}P]-NPP1-PKA1 bzw. [^{32}P]-NPP1-PKA2) und mit 1000- bzw. 200-fachem Überschuss Kompetitor (NPP1) durchgeführt. Die Bindungsansätze wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. In keinem der Bindungsansätze war es möglich, eine radioaktiv markierte Proteinbande zu detektieren. Der Ligand [^{32}P]-NPP1-PKA2 ist nur in den Spuren des Proteingels detektierbar, in denen Aliquots des Proteins aufgetragen wurden (RL, Abb. 3-20), die die gleiche Konzentration hatten (2 und 10 nM) wie im Bindungsansatz (MS, Abb. 3-20). Nach dem Waschen der Bindungsansätze und dem anschließenden Vernetzen des Liganden mit dem putativen Bindungsprotein war keine Proteinbande detektierbar, weder der Radioligand selbst noch ein anderes, mit dem Radioliganden vernetztes Protein. Dargestellt ist das Experiment mit dem Liganden [^{32}P]-NPP1-PKA2. Das gleiche Ergebnis wurde jedoch auch mit dem Liganden [^{32}P]-NPP1-PKA1 erzielt.

Mit beiden dargestellten Verfahren war es in ersten Studien nicht möglich, eine Bindungsstelle für NPP1 in Petersiliemikrosomen zu detektieren. Für weitere Experimente wird es erforderlich sein, einen Radioliganden zu präparieren, der eine spezifische Radioaktivität im Bereich von 100-1000 Ci/mmol aufweist. Außerdem ist es notwendig, die Bedingungen

des Bindungsassays zu optimieren, da in diesen Experimenten die Standardbedingungen für die Pep-13-Bindung angewandt wurden (Nürnberger *et al.*, 1994).

3.8 Porenbildung als möglicher Perzeptionsmechanismus für NPP1

Die ersten messbaren pflanzlichen Reaktionen nach Elicitorgabe stellen Ionenflüsse durch die Plasmamembran dar (Zimmermann *et al.*, 1999). Des Weiteren ist bekannt, dass membrandepolarisierende Agenzien (Ionophore) stark elicitierende Wirkung haben (Jabs *et al.*, 1997, Yang *et al.*, 1997, Scheel, 1998). Während die rezeptorvermittelte Aktivierung von Ionenkanälen als Teil einer Signalkaskade ein möglicher Mechanismus zur Induktion der pflanzlichen Abwehr ist, konnte gezeigt werden, dass einige Elicitoren direkt mit der pflanzlichen Membran interagieren. Für einen Hefe-Elicitor (Klüsener & Weiler, 1999) und für Harpin, einen bakteriellen Elicitor pflanzlicher Abwehrreaktionen (Lee *et al.*, 2001a), konnte gezeigt werden, dass diese Elicitoren Poren in synthetischen Lipiddoppelmembranen bilden. Dadurch werden vermutlich Ionenflüsse ermöglicht, die die Voraussetzung für die Aktivierung der pflanzlichen Abwehrreaktionen darstellen (Nürnberger, 1999, Nürnberger & Scheel, 2001). Aufgrund dieser Kenntnisse sollte auch NPP1 auf eine eventuelle Poren bildende Aktivität untersucht werden.

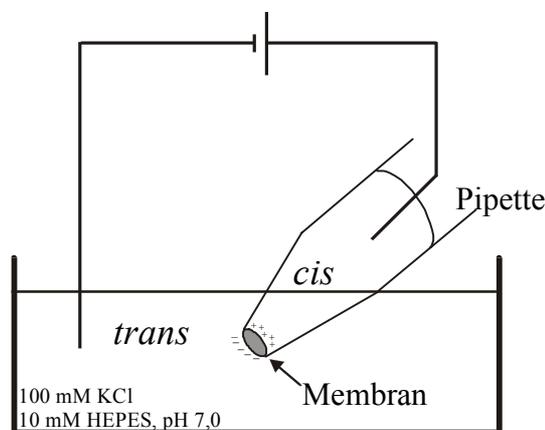


Abb. 3-21: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der elektrophysiologischen Untersuchung an planaren synthetischen Lipiddoppelmembranen

In Zusammenarbeit mit Dr. Birgit Klüsener (Ruhr-Universität, Bochum) wurden elektrophysiologische Untersuchungen an proteinfreien planaren Lipiddoppelmembranen durchgeführt (nach Klüsener & Weiler, 1999). Diese sind ein verbreitetes System zur Charakterisierung membranaktiver Substanzen. Abbildung 3-21 zeigt den schematischen Aufbau der Versuchsanordnung. In der Öffnung einer Pipette bildet sich durch Eintauchen in das Lipid eine proteinfreie Lipiddoppelmembran. Im *cis*- und *trans*-Kompartiment der Küvette befindet sich 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7,0. An beiden Seiten wird mittels Elektroden ein elektri-

ches Potential angelegt. Gibt man einen Porenbildner in eines der Kompartimente, wird es den vorhandenen Ionen ermöglicht, die Membran durch eine gebildete Pore zu passieren. Je nach Art des Ions (Anion oder Kation) erfolgt der Ionenfluss in *cis-trans*- oder in *trans-cis*-Richtung.

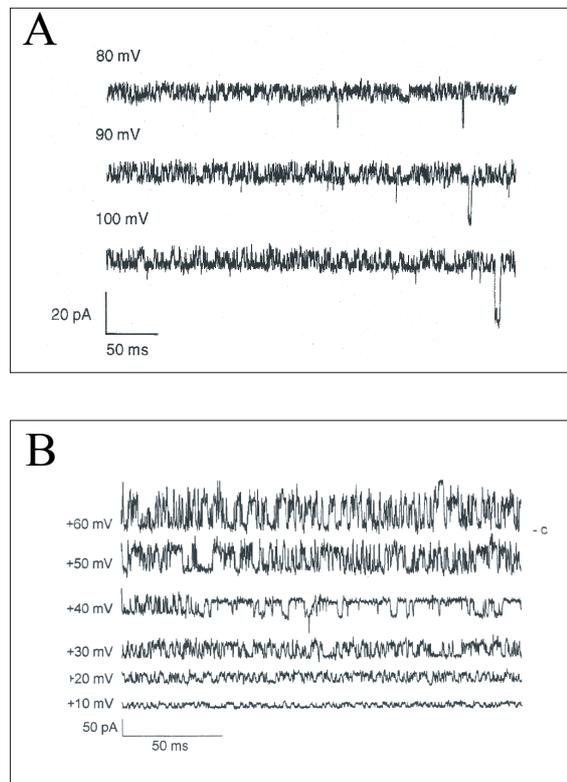


Abb. 3-22: Effekt von NPP1 auf planare Lipiddoppelmembranen

Zur Induktion von Ionenflüssen in planaren Lipiddoppelmembranen aus 80 % 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphatidylcholin und 20 % 1,2-Dioleoyl-glycero-3-phosphatidylethanolamin wurde der angegebene Effektor in der Versuchsanordnung von Abb. 3-21 zugegeben und die Leitfähigkeit bestimmt. Die Elektrolytlösung enthielt 100 mM KCl, 10 mM HEPES, pH 7.0.

(A) Einsatz von GST (10 nM)

(B) Einsatz von GST-NPP1 (10 nM)

Aus Abb. 3-22 wird deutlich, dass bei Einsatz von NPP1 mit steigendem angelegtem Potential auch die Leitfähigkeit steigt. Dies entspricht Ionenflüssen durch die Membran. Es zeigt sich jedoch, dass sowohl NPP1 (Abb. 3-22B) als auch die Negativkontrolle (GST, Abb. 3-22A) die gleichen Ionenflüsse induzieren. Die Präparation des rekombinanten Elicitorproteins aus der heterologen Expression in *E. coli* enthält vermutlich Spuren von Proteinen, die diese Reaktion bewirken. Der dargestellte Verlauf der Leitfähigkeit entspricht einer Pore, die stets geöffnet ist und damit einen andauernden Ionenfluss ermöglicht. Dies ist typisch für die Wirkung bakterieller Porine (B. Klüsener, persönliche Mitteilung). Sie sind in der Präparation des rekombinanten Proteins als Verunreinigung durch *E. coli* mit hoher Wahrscheinlichkeit enthalten. Schon geringste Spuren der Porine reichen aus, um in Membranen Poren auszubilden, die die Ionenflüsse ermöglichen, so dass diese Proteine nicht in einer Silber-gefärbten SDS-

PAGE des rekombinant produzierten NPP1 nachweisbar waren. Für die dargestellten Versuche wurde sowohl GST-NPP1 als auch His₁₀-NPP1 eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse waren für beide Elicitorpräparationen identisch. Abbildung 3-22 enthält exemplarisch die ermittelten Daten für GST-NPP1 und GST.

3.9 Suppression von NPP1 in *P. infestans*

Die Inaktivierung von Genen ist eine Methode zur Analyse der endogenen Funktion der kodierten Proteine („gene silencing“). In Pflanzen und höheren Pilzen wird diese Methode häufig angewandt. Auch in Oomyceten wie *P. infestans* konnte die Suppression durch die Transformation eines promotorfreien DNA-Konstruktes der kodierenden Sequenz von Infestin gezeigt werden (van West *et al.*, 1999). Die Vorgänge, die im Oomyceten zum Ausschalten der Gene führen, sind derzeit jedoch nur unzureichend verstanden.

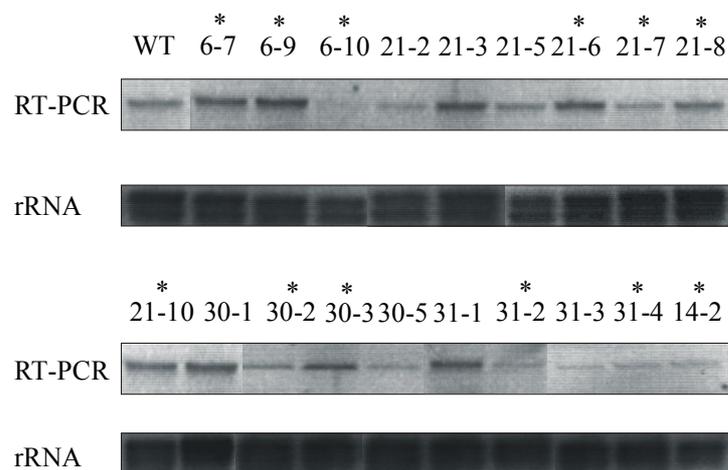


Abb. 3-23: RT-PCR-Analyse der NPP1-Transkriptakkumulation in *P. infestans*-Transformanten
Analysiert wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA aus dem Myzel der *P. infestans*-Transformanten in einer RT-PCR-Reaktion (vgl. 2.4.4). Die gelelektrophoretische Analyse der rRNA diente als Kontrolle für die zur reversen Transkription eingesetzte Gesamt-RNA.

*: Kotransformanten, 6-7, 6-9, 6-10, 21-6, 21-7, 21-8, 21-10, 30-2, 30-3, 31-2, 31-4, 14-2; WT: *P. infestans*-Wildtyp.

In Zusammenarbeit mit Dr. Irma Vijn und Prof. Francine Govers (Wageningen Agricultural University, Niederlande) wurden Zoosporen von *P. infestans* mit der NPP1_{*P. infestans*}-kodierenden cDNA transformiert. Diese Transformation erfolgte als Kotransformation des Oomyceten mit der DNA eines Resistenzplasmids (pTH209, Judelson *et al.*, 1991) und dem linearisierten cDNA-Konstrukt für NPP1, das im Vektor pGEM-T vorlag. Die Transformation der Zoosporen erfolgte mittels Elektroporation. In vier unabhängigen Transformationsversuchen war es möglich, insgesamt 28 Transformanten zu erhalten, die mindestens das Resistenzplasmid enthielten. Die Zahl der Kotransformanten wurde mittels PCR ermittelt, wobei die aus dem Myzel isolierte genomische DNA sowie ein genspezifisches und ein vektor-

spezifisches Oligonukleotid (PiexpEcoRI/2, M13 rev, s. Anhang 2 und 4) eingesetzt wurden. 12 der Transformanten konnten in 2 unabhängigen Experimenten als putative Kotransformanten identifiziert werden: 6-7, 6-9, 6-10, 21-6, 21-7, 21-8, 21-10, 30-2, 30-3, 31-2, 31-4, 14-2 (vgl. Abb. 3-23 und Abb. 3-24).

Aus dem Pilzmyzel der *P. infestans*-Transformanten wurde außerdem RNA isoliert und in einer RT-PCR eingesetzt. Dies diente zur Analyse der NPP1-Transkriptakkumulation in den Mutanten. RNA vom *P.-infestans*-Wildtyp und RNA von Transformanten, die keine Kotransformanten waren, dienten zur Kontrolle. In keinem der analysierten *P.-infestans*-Transformanten war es möglich, eine signifikante Veränderung der NPP1-Transkriptmenge zu detektieren. Geringe Unterschiede in der Intensität der gebildeten PCR-Fragmente könnten zwar auf eine Teilinaktivierung hindeuten, traten aber sowohl für Kotransformanten (z.B. 6-10, 31-2) als auch für Einzeltransformanten (z.B. 21-2, 31-3) auf (vgl. Abb. 2-23).

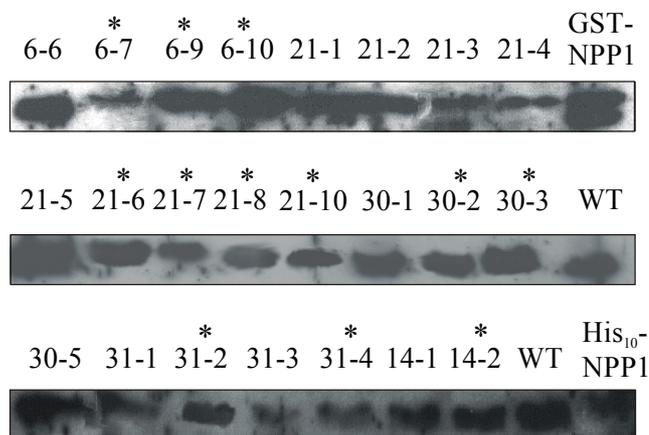


Abb. 3-24: Immunoblotanalyse der NPP1-Suppression in *P.-infestans*-Transformanten

Analysiert wurde das gefriergetrocknete Kulturmedium der *P.-infestans*-Transformanten. Es wurden 7,5 µg Gesamtprotein zur SDS-PAGE eingesetzt. Zur Immunoblotanalyse wurde der spezifische Anti-NPP1-Antikörper (AK152) als primärer Antikörper und ein Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Anti-Kaninchen-Antikörper verwendet. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL Plus Kit“.

*: Kotransformanten, 6-7, 6-9, 6-10, 21-6, 21-7, 21-8, 21-10, 30-2, 30-3, 31-2, 31-4, 14-2; WT: *P.-infestans*-Wildtyp; GST-NPP1: rekombinantes NPP1 aus GST-Fusion; His₁₀-NPP1: rekombinantes NPP1 aus His₁₀-Fusion

Das Elicitorprotein NPP1 ist ein Sekretionsprotein und kann mittels Immunoblot im Kulturmedium des *in vitro* kultivierten Oomyceten nachgewiesen werden. Die *P.-infestans*-Transformanten wurden in Flüssigmedium angezogen. Nach 7 Tagen wurde das Kulturmedium geerntet und gefriergetrocknet. Analysiert wurden gleiche Proteinmengen in einem Immunoblot, wobei zur Kontrolle das Kulturmedium von nicht transformiertem *P. infestans* und von Transformanten eingesetzt wurde, die keine Kotransformanten darstellten. Die Immunoblotanalyse (Abb. 3-24) zeigt, dass es in den bisher durchgeführten Experimenten nicht möglich war, *P.-infestans*-Mutanten zu detektieren, deren NPP1-Bildung völlig inaktiviert ist. Für alle Transformanten wurde mittels NPP1-spezifischem Antikörper AK152 ein Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 23 kDa nachgewiesen. Geringe Intensitätsunterschiede

der Expression könnten ebenfalls auf eine Teilinaktivierung hinweisen. Dies ist jedoch nicht wahrscheinlich, da sowohl für Kotransformanten (z.B. 6-7, 31-4) als auch für Einzeltransformanten (z.B. 21-3, 31-1, 31-3), die nur das Resistenzgen enthielten, Unterschiede im Expressionsniveau beobachtet wurden. So ist davon auszugehen, dass unter der limitierten Zahl an analysierten Kotransformanten keine Mutante zu finden ist, in der sowohl die Transkriptmenge als auch die NPP1-Proteinmenge signifikant vermindert oder gar nicht mehr nachweisbar ist.

4 Diskussion

Die angeborene Immunität („innate immunity“) ist eine grundlegende Eigenschaft aller höheren Organismen und die Basis für eine erfolgreiche Pathogenabwehr (Cohn *et al.*, 2001, Nürnberger & Scheel, 2001). Die Aktivierung von Abwehrmechanismen gegen mikrobielle Infektionen beruht auf der Erkennung von Oberflächenstrukturen der Pathogene durch Rezeptoren an der Plasmamembran. Die Forschung der letzten Jahren hat gezeigt, dass Pflanzen zur Erkennung von Pathogenen ähnliche Signale und entsprechende molekulare Module wie Insekten und Vertebraten entwickelt haben, man findet also evolutionär eine konservierte Grundlage der angeborenen Immunität (Aderem & Ulevitch, 2000, Cohn *et al.*, 2001, Staskawicz *et al.*, 2001, Nürnberger & Scheel, 2001).

Pep-13 ist ein Peptid eines 42-kDa-Elicitorproteins aus *P. sojae* (GP42), das hinreichend und notwendig für die Induktion pflanzlicher Abwehrreaktionen in Petersilie ist. Dazu gehört die Bildung von Phytoalexinen und die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen, nicht jedoch der hypersensitiven Zelltod (HR) der Pflanze (Nürnberger *et al.*, 1994, Sacks *et al.*, 1995, Jabs *et al.*, 1997). Bei der Interaktion von Zoosporen bestimmter Oomyceten mit Petersiliepflanzen wurde jedoch eine HR beobachtet (Jahnen & Hahlbrock, 1988, Schmelzer *et al.*, 1989), so dass sich die Frage nach weiteren Struktur determinanten für die pflanzliche Abwehrinduktion stellte. Aus dem Kulturmedium des Oomyceten *P. parasitica* konnte das Elicitorprotein NPP1 isoliert werden, das neben der Akkumulation von Phytoalexinen und der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen den Zelltod in Petersilie und anderen Dikotyledonen auslöst (Fellbrich, 2001). Da sich die biochemische Reinigung des Proteins aus dem Kulturmedium als sehr aufwendig herausstellte, wurde nach anderen Wegen zur Präparation von elicitoraktivem NPP1 gesucht.

4.1 Herstellung von rekombinantem NPP1

Für die Durchführung von Rezeptor-Ligand-Bindungsexperimenten, aber auch für Signaltransduktionsstudien sind relativ große Elicitormengen nötig. Vor allem ein konditional letales Screening nach *Arabidopsis-thaliana*-Mutanten, die insensitiv gegenüber NPP1 sind, erfordert in der Zukunft elicitoraktives Material in großem Umfang.

4.1.1 Bakterielle Expression von NPP1

Mit der Isolierung der für das Elicitorprotein NPP1 kodierenden cDNA wurde die Voraussetzung geschaffen, durch heterologe Expression größere Mengen des Elicitors zu produzieren. Die PCR-gestützte Klonierung der cDNA für ein gereinigtes Protein stellt eine oft angewandte Methode dar. Auf diese Weise konnten auch cDNAs kloniert werden, die für

andere Elicitorproteine kodieren. Darunter z.B. die cDNA des *P.-sojae*-Elicitors GP42 (Sacks *et al.*, 1995) und die cDNA von α -Parasiticein, einem Elicitin aus *P. parasitica* (Kamoun *et al.*, 1993). Mittels 5'- und 3'-RACE-Experimenten war es möglich, die korrespondierende Gesamt-cDNA von NPP1 zu isolieren (vgl. 3.1). Zur heterologen Expression von NPP1 in *E. coli* wurde die cDNA des prozessierten Proteins verwendet. Die Aminosäuresequenz des nativen Proteins beginnt mit der Asparaginsäure in Position 20. Dies entspricht auch den theoretisch ermittelten Daten, nach denen die ersten 57 Nukleotide im offenen Leserahmen für eine Sekretionserkennungssequenz kodieren, die durch eine Signalpeptidase abgespalten wird (von Heijne & Abrahmsén, 1989).

Die bakterielle Expression von NPP1 erfolgte in zwei unterschiedlichen Systemen, zum einen als GST-Fusion (GST-NPP1, vgl. 3.3.1), und zum anderen als Histidin₁₀-Fusion (His₁₀-NPP1, vgl. 3.3.2). Beide Systeme erlaubten die Affinitätsreinigung der rekombinanten Fusionsproteine durch GSH-Agarose bzw. Ni-NTA-Agarose. Rekombinantes NPP1 wurde in Petersilieprotoplasten und Tabakblättern auf Elicitoraktivität getestet (vgl. 3.3.3). Die durch *E. coli* produzierten Fusionsproteine waren ebenso aktiv wie das native, aus dem Kulturmedium gereinigte NPP1. Sie induzieren 80 % der Phytoalexinakkumulation, die durch Pep-13 in Petersilieprotoplasten maximal bewirkt wird (vgl. 3.3.3 und Abb. 3-7). Ursache dafür ist vermutlich, dass NPP1 zusätzlich den Zelltod in Dikotyledonen induziert und sich beide Reaktionen überschneiden. Dadurch sterben die Petersilieprotoplasten ab und die weitere Bildung der Furanocoumarine bleibt aus.

Die beiden unterschiedlichen Expressionssysteme ermöglichten die Herstellung von NPP1-Elicitorpräparationen, welche verschiedenen Ansprüchen genügten. Mit dem GST-Fusionssystem können relativ große Mengen einheitlichen Elicitormaterials produziert werden, das für Studien zur Signaltransduktion und zur Bestimmung eines elicitoraktiven Minimalmoleküls eingesetzt wurde. Nachteilig ist, dass die Elicitorpräparation von GST-NPP1 nach der Proteasespaltung mit Faktor Xa sowohl das Teilprotein GST als auch NPP1 enthält. Beide Proteine waren durch verschiedene säulenchromatographische Methoden nicht vollständig voneinander zu trennen. Dies könnte durch die sehr ähnlichen Eigenschaften der Proteine bedingt sein. Sie haben annähernd das gleiche Molekulargewicht (26 kDa [GST], 23 kDa [NPP1]), so dass eine Gelfiltrationschromatographie zur Trennung beider nicht möglich war. Bei Anwendung einer Vydac-C4-Säule in einer „Reversed-phase“-HPLC konnten beide Proteine ebenfalls nicht vollständig voneinander getrennt werden. Mit der Affinitätsmatrix GSH-Agarose, die die Interaktion von GST mit GSH erlaubt, war es lediglich möglich, Teile der GST aus der Elicitorpräparation zu entfernen. In Kontrollexperimenten konnte jedoch ermittelt werden, dass reine GST auch in höheren Konzentrationen (> 2 μ M) keine Abwehrreaktionen induziert, so dass das Gemisch aus NPP1 und GST für verschiedene Analysen verwendet werden konnte.

Mit dem His₁₀-Fusionssystem war es möglich Elicitorpräparationen zu erhalten, die fast ausschließlich das Protein NPP1 enthielten. Dieses System erlaubte jedoch nicht die Präparation der Mengen elicitoraktiven Materials, die das GST-Fusionssystem ermöglichte. Deshalb wurde His₁₀-NPP1 nur für Studien eingesetzt, in denen die GST störenden Einfluss hat, z.B. zur radioaktiven Markierung des Proteins.

Die rekombinanten Proteine NPP1_{*P.sojae*} und NPP1_{*P.infestans*} (GST-Fusion) lösten wie NPP1_{*P.parasitica*} die Akkumulation von Phytoalexinen in Petersilieprotoplasten und die Bildung von Nekrosen in Tabakblättern aus. Auch in der Intensität der Abwehrreaktionen konnten gegenüber NPP1_{*P.parasitica*} keine Unterschiede festgestellt werden. Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Zoosporen des Oomyceten *P. sojae* nekrotische Läsionen in Petersiliepflanzen induzieren (Jahnen & Hahlbrock, 1988, Schmelzer *et al.*, 1989). Diese HR wird jedoch nicht durch das 42-kDa-Glykoprotein (GP42) oder Pep-13 ausgelöst (Nürnberger *et al.*, 1994, Sacks *et al.*, 1995). Es scheint daher möglich, dass NPP1_{*P.sojae*} die oder zumindest eine von mehreren Komponenten darstellt, die die Nekrosebildung in Petersilie induziert.

4.1.2 Identifizierung der elicitoraktiven Komponente von NPP1

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Minimalelicitor zu bestimmen, der hinreichend und notwendig für die Induktion der pflanzlichen Abwehr ist. Dies ermöglicht die Charakterisierung von Determinanten, z.B. Peptidfragmente, die zur Pathogenerkennung ausreichend sind. Außerdem hätte ein Peptidligand den Vorteil gehabt synthetisch hergestellt zu werden, so dass die experimentell aufwendigere Expression in *E. coli* entfallen könnte.

Um ein elicitoraktives Fragment von NPP1 zu bestimmen, wurden zahlreiche Deletionsderivate des Proteins als GST-Fusionsprodukte in *E. coli* exprimiert und die affinitätsgereinigten Proteine auf Elicitoraktivität untersucht (vgl. 3.3.4 und 3.3.5). Proteinfragmente von NPP1, die ungefähr 50 % des Gesamtproteins (V, VII, IX) überspannten, zeigten weder in Petersilieprotoplasten noch in Tabakblättern Elicitoraktivität. Deshalb wurden im Folgenden längere NPP1-Derivate vorbereitet (XI-XIX). Es zeigte sich, dass nahezu das gesamte Protein als elicitoraktive Komponente benötigt wird. Lediglich ein Deletionsderivat (XIV), dem 8 Aminosäuren am C-terminalen Ende des Proteins fehlen, war neben dem Gesamtprotein ebenfalls in Petersilieprotoplasten und Tabakblättern aktiv (vgl. Abb. 3-10). Parallel wurden 30mer Peptide synthetisiert, die das gesamte NPP1 überlappend einschlossen. Diese Peptide wurden ebenfalls auf ihre Fähigkeit untersucht, in Petersilieprotoplasten die *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen oder in Tabakblättern Nekrosen zu induzieren. Keines der 30mer Peptide konnte jedoch einzeln oder in Kombination pflanzliche Abwehrreaktionen induzieren (Fellbrich, 2001). Diese Beobachtungen führten zu der Annahme, dass nahezu das gesamte Protein und damit vermutlich die Sekundärstruktur des Proteins für die Elicitoraktivität ver-

antwortlich ist. Dadurch unterscheidet sich NPP1 von vielen anderen Elicitoren wie z.B. Pep-13 (Nürnberg *et al.*, 1994), Heptaglukan (Cosio *et al.*, 1990) und Chitopentanose (Bau-reithel, *et al.*, 1994), die als Fragmente größerer Moleküle pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen können. Andere Elicitorproteine, z.B. NIP1 (Rohe *et al.*, 1995), Avr9 und Avr4 (Joosten *et al.*, 1994, van den Ackerveken *et al.*, 1992), aber auch PaNie (Veit *et al.*, 2001) sind hingegen wie NPP1 nur als Gesamtmolekül biologisch aktiv.

Da offensichtlich die Sekundärstruktur von NPP1 Einfluss auf seine biologische Aktivität hat, wurde nach strukturbildenden Merkmalen gesucht. Die beiden einzigen Cysteinreste des Proteins sind in NPP1 und allen bisher isolierten Homologen konserviert. Aus diesem Grunde wurde vermutet, dass eine Disulfidbrücke zwischen beiden ausgebildet wird. In *in-vitro*-Mutagenese-Experimenten wurden die Cysteinreste einzeln gegen Serin substituiert (NPP1-M1 und NPP1-M2, vgl. 3.4). Diese Substitutionen führten zum fast vollständigen Verlust der Elicitoraktivität, so dass die Ausbildung einer für die Aktivität essentiellen Disulfidbrücke wahrscheinlich ist. Auch andere Elicitoren bilden Disulfidbrücken als typische Strukturmerkmale aus. So wurde für Avr9 und NIP1 beschrieben, dass deren Elicitoraktivität ebenfalls von der Formation einer Disulfidbrücke abhängig ist (Vervoort *et al.*, 1997, van den Hooven *et al.*, 1999, Rohe *et al.*, 1995). Der Einsatz von β -Mercaptoethanol sollte die Reduktion der Disulfidbrücke in NPP1 bewirken, um die These ihrer essentiellen Funktion für die Elicitoraktivität zu bestätigen. Aufgrund der Wirkung von Reduktionsmitteln auf Petersilieprotoplasten waren jedoch keine Rückschlüsse aus diesen Experimenten möglich. Nach dem Erhitzen von NPP1 war ein Verlust der Elicitoraktivität zu beobachten (Fellbrich, 2001). Eine mögliche Schlussfolgerung dieser Beobachtung ist, dass NPP1 eine Enzymaktivität aufweist, die eventuell einen endogenen Elicitor aus der Pflanze freisetzt. Da aber die Aktivität von NPP1 in Petersilieprotoplasten getestet wurde, müsste dieser Elicitor aus der Plasmamembran freigesetzt werden. Dies erscheint relativ unwahrscheinlich, da bisher nur endogene Elicitoren bekannt sind, die aus der pflanzlichen Zellwand stammen. Es ist jedoch möglich, dass das Protein bei hoher Temperatur präzipitiert und dadurch seine biologische Aktivität verliert.

Da einige Deletionsderivate von NPP1, die die beiden konservierten Cysteinreste enthielten (XI, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, vgl. 3.3.5 und Abb. 3-8), trotzdem keine Elicitoraktivität aufwiesen (vgl. Abb. 3-10), wurde vermutet, dass die Disulfidbrücke nicht die einzige charakteristische Komponente für die Elicitoraktivität von NPP1 ist. So könnte möglicherweise die Formation eines Epitops, das spezifisch von einem Rezeptor erkannt wird, die pflanzliche Abwehr induzieren. Schon kleinste strukturelle Veränderungen können dabei einen Verlust der Elicitoraktivität bewirken.

Es ist bekannt, dass auch Toxine Nekrosen in pflanzlichen Geweben induzieren (Graniti, 1991). Beispiele dafür sind Beticoline, die von *Cercospora beticola* gebildet werden (Goudet *et al.*, 2000), aber auch Syringomycin aus *Pseudomonas syringae* (Hutchison *et al.*, 1995,

Bender *et al.*, 1999). Aufgrund der Beobachtung, dass NPP1 in dikotyledonen Pflanzen den Zelltod induziert, könnte es auch als Toxin wirken. Interessanterweise wird der hypersensitive Zelltod jedoch von aktiven Abwehrmechanismen wie der *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen begleitet. Nach Infiltration einer wässrigen NPP1-Lösung in Arabidopsis-Blätter erfolgt eine Kalloseapposition an den Rändern der Infiltrationsstelle (Fellbrich, 2001). Außerdem werden nach NPP1-Gabe in *Arabidopsis thaliana* (A. Varet, persönliche Mitteilung) und Petersilie (Fellbrich, 2001) PR-Gene transkriptionell aktiviert. Des Weiteren wurde eine für apoptotischen Zelltod typische Degradation von DNA („DNA-laddering“) nach NPP1- und PaNie-Applikation in Petersilie- bzw. Karottenprotoplasten beobachtet (Fellbrich, 2001, Koch, 1998, Veit *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass NPP1 eindeutig aktive Abwehrreaktionen induziert, was für die Wirkung des Proteins als Elicitor spricht (Gilchrist, 1998, Richberg *et al.*, 1998, Heath, 1998). Es ist dennoch nicht auszuschließen, dass die Läsionbildung die Folge eines toxischen Effekts ist. Die Induktion der HR in allen Dikotyledonen deutet darauf hin, dass keine Spezies spezifischen Rezeptoren für NPP1 existieren wie für andere Elicitoren. Deshalb ist es auch möglich, dass NPP1 gleichzeitig als nichtselektives Toxin wirkt. Auch für das Toxin Fumonisin B1 konnte gezeigt werden, dass neben der HR pflanzliche Abwehrreaktionen induziert werden (Asai *et al.*, 2000, Stone *et al.*, 2000). *Arabidopsis-thaliana*-Pflanzen, die mit Fumonisin B1 (10 μ M) infiltriert wurden, entwickelten nekrotische Läsionen. Überdies wurden jedoch auch ROS freigesetzt und die Kallosebildung an den Rändern der Infiltrationsstelle, die Bildung von Camalexin (einem Phytoalexin) sowie die Expression von PR-Genen induziert (Stone *et al.*, 2000). Auch für NIP1, das Produkt des Avirulenzgens *avrRrs1* aus dem Gerstenpathogen *Rhynchosporium secalis*, ist bekannt, dass es in geringen Konzentrationen (nanomolarer Bereich) als Elicitor wirkt, höhere Konzentrationen (mikromolarer Bereich) aber Toxinwirkung haben (Rohe *et al.*, 1995, Knogge, 1996). NIP1 ist als Nekrosen-induzierendes Protein in der Lage, pflanzliche Abwehrreaktionen in resistenten Gerstekultivaren zu induzieren, die den Wirt gegen das Pathogen schützen. Es wirkt jedoch auch als Virulenzfaktor in suszeptiblen Gerstenkultivaren und anderen Pflanzen. Diese nicht kultivarspezifische toxische Aktivität hängt vermutlich mit der Aktivierung einer plasmalemmgebundenen ATPase und einer damit verbundenen Deregulierung des zellulären Stoffwechsels zusammen (Wevelsiep *et al.*, 1993, Knogge, 1996).

Interessanterweise induziert rekombinantes NEP1, das Strukturhomologe aus *Fusarium oxysporum*, in Petersilieprotoplasten lediglich den Zelltod, die Phytoalexinakkumulation bleibt dagegen aus. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum NPP1 aus den *Phytophthora*-Spezies, was vermuten lässt, dass der Zelltod und die anderen pflanzlichen Abwehrreaktionen durch jeweils unterschiedliche Perzeptionsmechanismen ausgelöst werden können.

NEP1 und NPP1 induzieren in Dikotyledonen nekrotische Läsionen (Bailey, 1995, Jennings *et al.*, 2000). Die Nekrosebildung bleibt in monokotyledonen Pflanzen sowohl für

NEP1 und NPP1 als auch für PaNie aus (Bailey, 1995, Fellbrich, 2001, Veit *et al.*, 2001). Aus dieser breiten Wirkung gegenüber dikotyledonen Pflanzen ergibt sich ein potentielles Anwendungsgebiet für NPP1 als Bioherbizid. Monokotyledone Kulturpflanzen im landwirtschaftlichen Anbau können z.B. mit dem Protein behandelt werden, um dikotyledone Unkräuter zu beseitigen. Dabei wird in dikotyledonen Pflanzen der Zelltod ausgelöst, während monokotyledone Kulturpflanzen nicht in ihrer Entwicklung beeinflusst werden. Vorteilhaft am Einsatz von Proteinen wie NEP1 und NPP1 als Herbizid ist, dass diese Moleküle leicht abgebaut werden und sich somit nicht in der Umwelt anreichern können. Außerdem sind sie für Menschen und Tiere nicht toxisch (Jennings *et al.*, 2000).

4.2 Radioaktive Markierung des Elicitorproteins NPP1

Die Elicitorwirkung von NPP1 wird nicht über den Pep-13-Rezeptor vermittelt. Versuche hatten gezeigt, dass NPP1 die Bindung von Pep-13 an seine Bindungsstelle nicht kompetiert (Fellbrich, 2001), was auf die Existenz eines vom Pep-13-Rezeptor unabhängigen Perzeptionssystems für NPP1 hindeutet. Zur Charakterisierung des Systems sollte NPP1 als Radioligand in Rezeptor-Bindungsstudien und Proteinvernetzungsexperimenten eingesetzt werden. Durch die bakterielle Expression war die technische Voraussetzung geschaffen, NPP1 ohne aufwendige biochemische Reinigung zu isolieren, um es zur radioaktiven Markierung einsetzen zu können. Da für das Elicitorprotein kein chemisch synthetisierbares, elicitoraktives Peptidfragment gefunden wurde, war das rekombinante Gesamtprotein (His₁₀-NPP1) der Ausgangspunkt für die Präparation des Radioliganden. Zur Charakterisierung einer Bindungsstelle ist es notwendig, einen Liganden mit hoher spezifischer Radioaktivität zur Verfügung zu haben. Dies ermöglicht eine ausreichende Sensitivität der Detektion sowohl für gering abundante Rezeptoren als auch für Bindungsstellen mit hoher Affinität (Hulme & Birdsall, 1990). Oft angewandt wird deshalb die Markierung mit [¹²⁵I], da dies eine spezifische Radioaktivität von 2200 Ci/mmol ermöglicht. Ferner ist die Kopplung des aktivierten Iods (I⁺) an ein Tyrosin im Peptid oder Protein mit einer einfachen Reaktion verbunden (Hulme & Birdsall, 1990). Die Vorteile dieser Methode sind der vergleichsweise geringe Zeitaufwand und die Tatsache, dass die Radioaktivität des Isotops leicht zu bestimmen ist.

NPP1 enthält 14 Tyrosinreste, so dass theoretisch bis zu 28 Iod-Atome pro NPP1-Molekül eingebaut werden können. Da jedes [¹²⁵I]-Atom die Eigenschaften von Peptiden und Proteinen maßgeblich verändern kann, ist es von Vorteil, die Anzahl der eingebauten Iod-Atome zu reduzieren. Dies wurde durch kurze Reaktionszeiten bei 4°C und den Einsatz von wenig Oxidationsmittel versucht. Bei beiden verwendeten Reaktionssystemen („Iodobeads“, „IODOgen“, Pierce, Rockford, USA) war das Protein NPP1 jedoch nach wenigen Sekunden nicht mehr in der Silber-gefärbten SDS-PAGE nachweisbar (vgl. 3.6.1). Vermutlich war die

große Anzahl der in NPP1 enthaltenen Tyrosinreste die Ursache für dieses Resultat. Durch den Einbau mehrerer Iod-Atome kann die Konformation von NPP1 derart verändert werden, dass das Protein inaktiviert wird. Diese Beobachtung ist nicht außergewöhnlich, denn bereits ein einzelnes Iod-Atom kann in der Lage sein, die biologische Aktivität eines Peptides oder Proteins zu blockieren (McFarthing, 1990). Eine zeitintensive Möglichkeit, die Zahl der eingebauten Iod-Atome zu begrenzen, besteht in der *in-vitro*-Mutagenese einzelner Tyrosinreste. Die Substitution einzelner oder mehrerer Tyrosinreste durch andere Aminosäuren ist jedoch sehr arbeitsaufwendig und könnte ebenfalls die biologische Aktivität des Elicitors beeinflussen. Wird diese Strategie in der Zukunft verfolgt, so sind Untersuchungen dazu nötig, welche der 14 Tyrosinreste gegen andere Aminosäuren wie z.B. Phenylalanin ausgetauscht werden können, ohne die biologische Aktivität des Proteins zu beeinflussen.

Weniger zeitintensiv ist der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren, wie z.B. [³⁵S]-Methionin, während der Expression des Proteins in *E. coli* (vgl. 3.6.2). Das erhaltene rekombinante, affinitätsgereinigte [³⁵S]-NPP1 wies eine spezifische Radioaktivität von 1-2 Ci/mmol auf. Die [³⁵S]-Markierung von Harpin, eines bakteriellen Elicitorproteins, während der Proteinbiosynthese in *E. coli* ergab ebenfalls nur geringe spezifische Radioaktivitäten (1–40 Ci/mmol im analytischen Maßstab, 5 Ci/mmol bei der präparativen Expression, J. Lee, persönliche Mitteilung). Sowohl für [³⁵S]-Harpin als auch für [³⁵S]-NPP1 waren die spezifischen Radioaktivitäten zu gering, um Rezeptor-Bindungsstudien durchführen zu können, so dass diese Methode zur Markierung des Liganden nicht geeignet erscheint.

Eine Alternative zur [¹²⁵I]- oder [³⁵S]-Markierung eines Proteins bietet die radioaktive Phosphorylierung durch eine cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) und [γ -³²P]ATP. Dazu wurde eine Modifizierung von NPP1 am N-Terminus (NPP1-PKA1) bzw. am C-Terminus des Proteins (NPP1-PKA2) vorgenommen (vgl. 3.6.3). Die rekombinanten Proteine NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 waren im Petersilieprotoplastenassay (EC₅₀-Wert = 50 nM) und Tabakblättern elicitoraktiv. Der Unterschied zum nicht modifizierten NPP1 mit einem EC₅₀-Wert von 10 nM könnte in einer etwas veränderten Struktur des Proteins begründet liegen. Durch die zusätzlichen 7 Aminosäuren der spezifischen Phosphorylierungsstelle könnten neue Wechselwirkungen innerhalb des Proteins ausgebildet werden. Eine dadurch verursachte Verzerrung der Sekundärstruktur des Proteins könnte die Reduktion der Elicitoraktivität bewirkt haben. Dennoch sollte ein Ligand mit diesem EC₅₀-Wert für Rezeptor-Bindungsstudien geeignet sein.

Die phosphorylierten Proteine [³²P]-NPP1-PKA1 und [³²P]-NPP1-PKA2 wiesen lediglich eine spezifische Radioaktivität von 40 Ci/mmol auf (ca. 1 % Ausbeute, vgl. 3.6.3). Grund ist wahrscheinlich die Struktur des Proteins. So konnte vermutlich [γ -³²P] durch die PKA freigesetzt, aber, eventuell aufgrund sterischer Hinderungen, nicht an den Liganden (NPP1-PKA1 oder [³²P]-NPP1-PKA2) gekoppelt werden (vgl. 3.6.3.2, Abb. 3-18). Dies ist insbesondere

deswegen wahrscheinlich, da im Vergleich zu NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 bei Verwendung des Kontrollpeptids (PKA-Peptid) eine spezifische Radioaktivität von 150 Ci/mmol erzielt wurde. Um die spezifische Radioaktivität von [^{32}P]-NPP1-PKA1 und [^{32}P]-NPP1-PKA2 durch die Phosphorylierung zu erhöhen, wurde die PKA-Menge variiert und das molare Verhältnis der Reaktanden ($[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} : \text{Protein}$) von 1:1 zu 2:1 verändert. Diese Variation der Standardbedingungen der Phosphorylierungsreaktion ermöglichte jedoch keine höhere spezifische Radioaktivität des Liganden.

Im Unterschied dazu war es in anderen Systemen möglich, Liganden mit höherer spezifischer Radioaktivität zu präparieren. So konnten mittels Phosphorylierung [^{32}P]-markierte Opioidpeptide für Bindungsstudien erzeugt werden (Kieffer *et al.*, 1993), deren spezifische Radioaktivität 700 Ci/mmol betrug, was einem Reaktionsumsatz von 50 % entsprach (spezifische Radioaktivität des eingesetzten $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP} = 1400 \text{ Ci/mmol}$). Außerdem konnte für ein 14,8-kDa-Protein durch die Phosphorylierung an einer spezifischen Phosphorylierungsstelle eine spezifische Radioaktivität von 680 Ci/mmol erzielt werden (M. Wheeler, persönliche Mitteilung). Eventuell lagen für die Phosphorylierung der Opioidpeptide und im 14,8-kDa-Protein günstigere sterische Verhältnisse als im NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2 vor, so dass diese hohen spezifischen Radioaktivitäten erreicht werden konnten.

In der Zukunft besteht zur Steigerung der spezifischen Radioaktivität von [^{32}P]-NPP1 die Möglichkeit, mehrere spezifische Phosphorylierungsstellen an das Protein zu koppeln. Dadurch kann eine Phosphorylierung an einer sterisch leicht zugänglichen Phosphorylierungsstelle erfolgen. Überdies sind auch Mehrfachphosphorylierungen des Proteins möglich. Außerdem könnte die Position der Phosphorylierungsstelle verändert werden. Bisher wurden NPP1-Derivate (NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2) verwendet, in denen die Phosphorylierungsstelle direkt am N- bzw. C-Terminus des Proteins angeschlossen war. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, einen Spacer von einigen Aminosäuren zwischen das Protein NPP1 und die Phosphorylierungsstelle einzufügen, so dass die PKA-Phosphorylierungsstelle separat vom NPP1 vorliegt. So kann eventuell aufgrund einer geringeren sterischen Hinderung der Phosphorylierungsstelle eine höhere Ausbeute an phosphoryliertem [^{32}P]-NPP1 erreicht werden. Dennoch muss bei Anwendung dieser NPP1-Derivate die biologische Aktivität des modifizierten Elicitors erhalten bleiben.

4.3 Perzeptionsmechanismen für NPP1

Pflanzliche Abwehrreaktionen können zum einen durch Rezeptoren vermittelt und zum anderen durch Ionophore induziert werden (Yang *et al.*, 1997, Scheel, 1998, Nürnberger, 1999). In der rezeptorvermittelten Erkennung von Pathogenen erfolgt die Bindung eines Liganden (Elicitor) an einen Rezeptor. Das extrazelluläre Signal wird in ein intrazelluläres Sig-

nal umgewandelt und eine Signalkaskade initiiert an deren Ende die pflanzlichen Abwehrreaktionen induziert werden (Yang *et al.*, 1997, Scheel, 1998, Nürnberger, 1999). Die Bindung von Pep-13 an einen Rezeptor in Petersiliemembranen (Nürnberger *et al.*, 1994), die Interaktion von Flagellin mit einem Rezeptor in Tomatenzellen (Meindl *et al.*, 2000) sowie die Rezeptor-Ligand-Interaktion von Hepta- β -Glukan mit seiner Bindungsstelle in Sojamenbranen (Mithöfer *et al.*, 2000) sind einige Beispiele dafür.

Mit rekombinantem NPP1 war es möglich, Untersuchungen zum Perzeptionsmechanismus des Elicitors in Petersilie durchzuführen. Das rekombinante NPP1 wurde radioaktiv markiert (spezifische Radioaktivität von [32 P]-NPP1-PKA1 bzw. [32 P]-NPP1-PKA2 = 40 Ci/mmol) und für Rezeptor-Bindungsstudien verwendet. Da die EC₅₀-Werte verschiedener Pflanzenabwehrreaktionen nach NPP1-Applikation (z.B. Ethylenbiosynthese und Phytoalexinakkumulation) zwischen 1 und 10 nM liegen, kann man davon ausgehen, dass auch die Bindungskonstante in einem ähnlichen Größenbereich vorliegt. Zur Charakterisierung einer solchen Bindungsstelle wäre erfahrungsgemäß ein Radioligand mit einer spezifischen Radioaktivität von 100-1000 Ci/mmol erforderlich (Hulme & Birdsall, 1990).

Eine Bindungsstelle für NPP1 konnte in Petersiliemikrosomen in den ersten Experimenten jedoch nicht detektiert werden (vgl. 3.7). Die Hauptursache dafür ist vermutlich, dass der Radioligand [32 P]-NPP1-PKA1 bzw. [32 P]-NPP1-PKA2 einen fast 100-fachen Überschuss von nicht markiertem NPP1-PKA1 oder NPP1-PKA2 enthält. Dies kann die Bindung von vornherein so stark kompetieren, dass der Nachweis einer Bindungsstelle unmöglich ist. Für weitergehende Experimente ist es in jedem Fall erforderlich, einen Radioliganden mit höherer spezifischer Radioaktivität zu präparieren. Möglichkeiten dazu wurden in Kapitel 4.2 diskutiert. Überdies sollten auch die Bindungsbedingungen für die Rezeptor-Ligand-Interaktion optimiert werden, denn sie können für die verschiedenen Rezeptoren sehr unterschiedlich sein. Oft bedarf es langwieriger Versuchsreihen, in denen z.B. der pH-Wert und die Ionenzusammensetzung des Bindungspuffers, aber auch die Präparation der Membranen optimiert werden müssen (Hulme & Birdsall, 1990).

Durch eine ionophore Wirkung können Elicatoren auch direkt mit der pflanzlichen Plasmamembran interagieren. Sie bilden Poren aus und ermöglichen dadurch Ionenflüsse, die für die Aktivierung der pflanzlichen Abwehr verantwortlich sind (Klüsener & Weiler, 1999). Für einen Hefeelictor und für Harpin, einen bakteriellen Elicitor, konnte gezeigt werden, dass sie durch Einlagerung in Lipiddoppelmembranen ionendurchlässige Proteinstrukturen bilden (Klüsener & Weiler, 1999, Lee *et al.*, 2001a). Neben dieser Poren bildenden Eigenschaft von Harpin konnte in Tabakzellen außerdem eine Harpin-Bindungsstelle identifiziert werden (Lee *et al.*, 2001b). Somit sind für diesen bakteriellen Elicitor zwei Wege für die Induktion der pflanzlichen Abwehr möglich. Da die Auslösung von Abwehrreaktionen nach Harpin-Bindung spezifisch nur in Tabak abläuft, erfolgt die Induktion der Abwehr vermutlich rezeptor-

torvermittelt. Dagegen könnten die Poren, die Harpin in synthetischen Membranen ausbildet, die Funktion des bakteriellen Proteins bei der Infektion von Wirtspflanzen widerspiegeln (Lee *et al.*, 2001a, Lee *et al.*, 2001b). Für die meisten Elicitoren wird die Perzeption durch einen Rezeptor diskutiert, wobei diese oft Pflanzenspezies-spezifisch sind. Das breite Wirkungsspektrum von NPP1 auf sehr viele getestete dikotyledone Pflanzen könnte jedoch die Existenz eines vermutlich evolutionär sehr alten und in vielen Pflanzenspezies vorhandenen Rezeptorsystems andeuten oder aber für eine ionophore Wirkung des Proteins sprechen. Außerdem konnte durch die Analyse der Elicitoraktivität von NPP1-Deletionsderivaten (vgl. 3.3.5) und NPP1-Mutanten, in denen zwei Cysteinreste einzeln substituiert wurden (vgl. 3.4), gezeigt werden, dass die Primärstruktur des Proteins offensichtlich nicht ausreichend für seine Elicitoraktivität ist. Man würde erwarten, dass für die Porenbildung in Membranen die Gesamtstruktur oder zumindest große Teile des Proteins nötig sind. Deshalb lag die Vermutung nahe, dass NPP1 eine charakteristische Sekundärstruktur aufweist und ähnlich wie Harpin Poren in pflanzlichen Membranen ausbilden kann. In elektrophysiologischen Experimenten an synthetischen Lipiddoppelmembranen konnte eine derartige Funktion von NPP1 jedoch nicht bestätigt werden (vgl. 3.8 und Abb. 3-22). Somit kann davon ausgegangen werden, dass die Perzeption von NPP1 nicht durch direkte Interaktion des Proteins mit der pflanzlichen Membran sondern vermutlich rezeptorvermittelt erfolgt.

4.4 Die endogene Funktion des Elicitorproteins NPP1

Hinweise zur endogenen Funktion eines Proteins kann man durch zwei Verfahren erhalten. Zum einen können Primärsequenzvergleiche mit homologen Proteinen Anhaltspunkte bieten. Andererseits kann versucht werden, das korrespondierende Gen zu inaktivieren, und den daraus resultierenden Phänotyp der Mutante zu analysieren.

4.4.1 Sequenzvergleiche von NPP1 mit homologen Proteinen

In Vergleichsbetrachtungen der Aminosäuresequenz von NPP1 mit der anderer Proteine wurden neben den bereits isolierten Proteinen NPP1_{*P.sojae*} und NPP1_{*P.infestans*} weitere Homologe aus verschiedenen Organismen gefunden (vgl. 3.2). Die Proteine PaNie aus *Pythium aphanidermatum* (Koch, 1998, Veit *et al.*, 2001) und NEP1 aus *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995) sind ebenfalls Elicitorproteine, die ähnlich NPP1 pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen. NEP1 (Bailey, 1995), das im Kulturmedium zahlreicher *Fusarium*-Spezies durch Immunoblotanalysen detektiert werden konnte (Bailey *et al.*, 1997), PaNie (Koch, 1998, Veit *et al.*, 2001) und NPP1 (Fellbrich, 2001) wurden biochemisch gereinigt und anschließend die korrespondierenden cDNAs kloniert. NPP1_{*P.sojae*} wurde hingegen als EST in einer *P.-sojae*-cDNA-Bank identifiziert, die zur vergleichenden Analyse exprimierter *P.-sojae*-Sequenzen

diente (Qutob *et al.*, 2000). Im Gegensatz zum 42-kDa-Elicitorprotein aus *P. sojae*, das ausschließlich in der Gattung *Phytophthora* nachweisbar ist (F. Brunner, persönliche Mitteilung), sind das Elicitorprotein NPP1 bzw. seine Homologen weit verbreitet (vgl. auch Fellbrich, 2001).

Die Gattung *Pythium* ist eng verwandt mit der Gattung *Phytophthora*. Beide gehören zur Familie der *Pythiaceae*, weshalb die Existenz eines NPP1-homologen Proteins in dieser Gattung nicht erstaunt. *Fusarium oxysporum* ist als echter Pilz nicht verwandt mit den Oomyzeten. Das gilt ebenso für das extremophile Bakterium *Bacillus halodurans*. Obwohl sich diese Organismen also phylogenetisch nicht nah sind, wird sowohl vom *Fusarium oxysporum* (NEP1, Bailey, 1995) als auch von *Bacillus halodurans* (Takami *et al.*, 1999) ein Protein gebildet, das Homologien zum NPP1 aufweist. Diese Daten deuten auf einen sehr frühen evolutionären Ursprung des Proteins NPP1 hin. Interessanterweise ist einzig in der genomischen DNA von NEP1 ein Intron von 58 Nukleotiden enthalten (Nelson *et al.*, 1998), das in allen anderen Homologen fehlt. Dieser Fakt stützt die These des sehr frühen evolutionären Ursprungs des Proteins, denn in NPP1 und den anderen Homologen scheint dieses Intron im Verlauf der Entwicklung aus der genomischen DNA eliminiert worden zu sein.

Der Vergleich der Primärsequenzen stellt nur einen Weg zur Funktionsanalyse eines Proteins dar. Seine Aussagefähigkeit hängt sehr vom Umfang der zur Verfügung stehenden Sequenzdaten des betreffenden oder verwandter Organismen und dem Grad der Charakterisierung der Proteine ab. Deshalb sind zum Teil nur in begrenztem Maße Rückschlüsse auf die endogene Funktion eines Proteins möglich. Eine andere Methode, Hinweise zur Funktion eines Proteins zu erhalten, bietet die Analyse der Sekundär- und Tertiärstruktur. Strukturelle Motive, die unabhängig von der Aminosäuresequenz ausgebildet werden, können ebenfalls Anhaltspunkte zur Funktion eines Proteins liefern. Dazu gehören z.B. Transmembrandomänen, leuzinreiche Regionen, Nukleotidbindungsstellen oder Ca^{2+} -Bindungsstellen. Eine computergestützte Strukturanalyse für NPP1 ergab keinen Aufschluss über derartige Motive, die charakteristisch für bestimmte Funktionen von Proteinen sind. Die vorausgesagte Sekundärstruktur von NPP1 besteht zumeist aus Zufallsstrukturen; lediglich zwei putative α -Helix-Bereiche und 3 putative β -Faltblatt-Strukturen konnten ermittelt werden. Eine ähnliche Sekundärstruktur kann auch für die NPP1-Homologen vorausgesagt werden, was die Verwandtschaft der Proteine unterstreicht. Da diese computergestützten Betrachtungen keine Informationen über die endogene Funktion des Proteins lieferten, wurde eine alternative Methode gewählt.

4.4.2 Inaktivierung von NPP1 im Oomyceten *P. infestans*

Die Suppression der für das Protein kodierenden cDNA und die Analyse des resultierenden Phänotyps der Mutanten kann ebenfalls Hinweise zur endogenen Funktion eines Proteins geben. In Bakterien und Pilzen, d.h. phytopathogenen Mikroorganismen mit haploiden Abschnitten im Reproduktionszyklus, gibt es durch homologe Rekombination die Möglichkeit die entsprechenden Gene zu inaktivieren. Da Oomyceten aber diploide Organismen ohne haploide Stufe während ihrer Entwicklung sind, ist ein anderes Verfahren erforderlich (van West *et al.*, 1999). Die Methode der transgenen Gegenstrangexpression ist vor allem für Pflanzen beschrieben und wird in diesen erfolgreich zur Inaktivierung von Genen angewandt (Matzke & Matzke, 1995, Mette *et al.*, 2000, Matzke *et al.*, 2001). Das Ausschalten der Gene wird auf transkriptioneller oder auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. Die transkriptionelle Suppression ist oft begleitet von Cytosin-Methylierungen in Promotorsequenzen oder in Sequenzen des kodierenden Bereiches (Schuurs *et al.*, 1997, Selker, 1997, Mette *et al.*, 2000, Matzke *et al.*, 2000), aber auch die Kondensation von Chromatin kann eine Rolle spielen (Ye & Signer, 1996, van Blokland, 1997). Die im Ascomyceten *Neurospora crassa* gefundene Suppression durch Transgene gleicht der posttranskriptionellen Regulation der Inaktivierung in Pflanzen (Cogoni & Macino, 1999b, Catalanotto *et al.*, 2000). Dabei scheint die Bildung von RNA durch Transkription des Transgens eine Degradation der endogenen mRNA und damit die Suppression zu induzieren (Cogoni & Macino, 1999a, Vance & Vaucheret, 2001). Des Weiteren wurde für Pflanzen postuliert, dass doppelsträngige RNA (dsRNA) eine entscheidende Rolle in der Inaktivierung von Transgenen und endogenen Genen spielt (Mette *et al.*, 2000, Cogoni & Macino, 2000).

Das transkriptionelle Suppressionsphänomen konnte auch im diploiden Organismus *P. infestans* beobachtet werden. Durch Transformation von Zoosporen des Oomyceten gelang es die Bildung des Elicitins Infestin zu unterdrücken (van West *et al.*, 1999).

Die Transformation von *P. infestans* mit der NPP1-cDNA erfolgte als Kotransformation eines Selektionsplasmides und der für NPP1 kodierenden cDNA. In vier unabhängigen Transformationsexperimenten war es möglich, insgesamt 28 Transformanten zu detektieren, die zumindest das Selektionsplasmid exprimierten. 12 der 28 Transformanten waren Kotransformanten, die neben dem Resistenzplasmid auch die NPP1-DNA enthielten (vgl. 3.9). Dies stimmt weitgehend mit bisherigen Erfahrungen überein, wonach ein Anteil von ca. 50 % Kotransformanten zu erwarten ist (van West *et al.*, 1999, I. Vijn, persönliche Mitteilung). Da die Transformation von *P. infestans* mit der für Infestin kodierenden cDNA in ca. 11-20 % der Kotransformanten eine Suppression der Proteinbildung ermöglichte (van West *et al.*, 1999), war zu erwarten, dass 1 bis 2 der detektierten NPP1-Transformanten dieses Phänomen zeigen. Für die bisher erhaltenen NPP1-Transformanten konnte in Immunoblotanalysen und RT-PCR-Reaktionen jedoch kein NPP1-defizienter Klon detektiert werden. Kleinere Unter-

schiede im Transkriptions- und Expressionsniveau konnten sowohl in Kotransformanten als auch in Einzeltransformanten beobachtet werden, so dass nicht von einer signifikanten Suppression der Proteinbiosynthese ausgegangen werden kann. Für diese Beobachtungen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte NPP1 eine derart wichtige Funktion im Lebenszyklus oder Stoffwechsel des Organismus haben, dass die Unterdrückung der Bildung des Proteins letale Wirkung hat. Zum Anderen konnte diese Technologie bisher nur für ein Beispiel (Infestin, van West *et al.*, 1999) erfolgreich angewandt werden. Das Verfahren kann derzeit also kaum als gut verstandene und etablierte Standardmethode zur Geninaktivierung in Oomyceten angesehen werden. Eine erfolgreiche Suppression ist vermutlich davon abhängig, welches Gen inaktiviert werden soll. So geht man davon aus, dass in heterokaryotischen Organismen wie *Phytophthora*-Spezies ein in einem Kern inaktiviertes Gen auch das korrespondierende Gen im zweiten Kern ausschaltet. Eventuell lagen für die Inaktivierung von Infestin auch besonders günstige Bedingungen vor.

Als zukünftige Alternative zur Geninaktivierung im Oomyceten *P. infestans* könnte die RNAi-Methode (RNA-Interferenz) zur Anwendung kommen. Bei dieser Methode interagieren genspezifische doppelsträngige RNA-Fragmente (dsRNA) mit der endogenen mRNA und das entsprechende Gen wird inaktiviert (Sharp, 2001, Hammond *et al.*, 2001). Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang kurze RNA-Konstrukte (21-23 Nukleotide), die die Degradation der endogenen mRNA bewirken. Die genauen Mechanismen dieser RNA-Interferenz sind noch nicht vollständig verstanden. Es scheint aber eine RNA-abhängige RNA-Polymerase involviert zu sein (Sharp, 2001, Elbashir *et al.*, 2001). Das Verfahren wurde bereits erfolgreich für Organismen wie *Caenorhabditis elegans* (Kamath *et al.*, 2000), *Drosophila melanogaster* (Elbashir *et al.*, 2001) und *Trypanosoma brucei* (Ngo *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 2000), aber auch für Pflanzen, z.B. *Arabidopsis thaliana*, angewandt (Chuang & Meyerowitz, 2000, Smith, 2000). Die RNA-Interferenz wird in tierischen Systemen durch die Injektion von dsRNA induziert. Sie kann aber auch wie im pflanzlichen System durch Transgene bewirkt werden, die Haarnadelstrukturen aufweisen und dsRNA exprimieren (Smith, 2000, Chuang & Meyerowitz, 2000, Vaucheret & Fagard, 2001). Gegenwärtig wird auch für *P. infestans* die Anwendbarkeit der RNAi-Methode zur Geninaktivierung geprüft (I. Vijn, persönliche Mitteilung).

In naher Zukunft sollen weitere NPP1-Transformationen des Oomyceten durchgeführt werden. Dadurch sollte sich die Chance erhöhen, eine NPP1-defiziente Form von *P. infestans* zu detektieren. Sollte eine solche gefunden werden, folgen Studien zur Charakterisierung des Phänotyps, wobei die Virulenz des Pathogens auf Wirtspflanzen, aber auch der Lebenszyklus untersucht werden sollen, um mögliche Änderungen gegenüber dem Wildtyp zu ermitteln und somit Rückschlüsse auf die Funktion eines Genproduktes wie NPP1 ziehen zu können. Ein Erfolg dieser Analysen ist jedoch nicht garantiert. So wurden für NEP1 Experimente zur ho-

molgen Rekombination in *Fusarium oxysporum* durchgeführt, um das korrespondierende Gen zu inaktivieren. Die lebensfähigen *Fusarium-oxysporum*-Mutanten zeigten jedoch keine Veränderung im Phänotyp oder in ihrer Virulenz. Vermutlich können redundante Proteine in diesem Organismus den Ausfall von NEP1 kompensieren oder dessen Auswirkungen auf die Lebensweise des Organismus sind nicht so drastisch. Weitere Untersuchungen sollen die Effekte der NEP1-Suppression klären (Bailey, persönliche Mitteilung).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit gelang es durch PCR- und RACE-Experimente die für das Elicitorprotein NPP1 kodierende cDNA zu isolieren. Die Grundlage dafür bildeten Aminosäuresequenzinformationen von Peptidfragmenten des aus dem Kulturmedium von *P. parasitica* gereinigten Proteins (Fellbrich, 2001). Die aus der cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz zeigte Homologien zu anderen Proteinen aus verschiedenen Organismen, darunter waren andere Oomyceten, Pilze (*Fusarium oxysporum*) aber auch Bakterien (*Bacillus halodurans*).

Ein wichtiger Schritt zur Herstellung größerer Mengen von elicitoraktivem NPP1 war die Etablierung seiner heterologen Expression als Fusionsprotein in *E. coli*. Diese ermöglichte eine einfache affinitätschromatographische Aufreinigung des Elicitors mittels GSH-Agarose oder Ni-NTA-Agarose. Die Elicitoraktivität der rekombinanten Proteine (GST-NPP1, His₁₀-NPP1) wurde durch Applikation in Petersilieprotoplasten und Tabakblätter untersucht. Beide induzierten, ebenso wie das native, aus dem Kulturmedium gereinigte NPP1, den hypersensitiven Zelltod und die *de-novo*-Synthese von Phytoalexinen in Petersilieprotoplasten.

Durch heterologe Expression gebildete Deletionsderivate von NPP1 wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, pflanzliche Abwehrreaktionen auszulösen. Aus der Analyse zahlreicher Deletionsderivate konnte abgeleitet werden, dass nahezu das gesamte Protein für die Elicitoraktivität von NPP1 notwendig ist. Lediglich ein Deletionsderivat, dem 8 Aminosäuren im C-Terminus des Proteins fehlen, induzierte ebenfalls die Bildung von Phytoalexinen in Petersilieprotoplasten und Nekrosen in Tabakblätter. Durch *in-vitro*-Mutagenese-Studien konnte gezeigt werden, dass die Einzelsubstitution der beiden in allen NPP1-Homologen konservierten Cysteinreste mit dem fast vollständigen Verlust der Elicitoraktivität einhergeht. Vermutlich ist die sekundäre Struktur des Proteins, beeinflusst durch eine Disulfidbrücke, Voraussetzung für die Erkennung von NPP1 durch die Pflanze und die Aktivierung der pflanzlichen Abwehr.

Des Weiteren wurden elektrophysiologische Untersuchungen an planaren Lipiddoppelmembranen durchgeführt, um NPP1 auf eine Poren bildende Wirkung zu untersuchen. Es konnte jedoch keine NPP1-spezifische Formation ionendurchlässiger Strukturen in synthetischen Membranen nachgewiesen werden, so dass von einer rezeptorvermittelten Elicitorperzeption zur Auslösung von pflanzlichen Abwehrreaktionen ausgegangen werden kann.

Zur Vorbereitung von Bindungsstudien wurden Versuche zur radioaktiven Markierung des Elicitors durchgeführt. Mit Hilfe einer cAMP-abhängigen Proteinkinase und einem NPP1-Derivat, das eine spezifische Phosphorylierungsstelle enthielt (NPP1-PKA1 und NPP1-PKA2), war es möglich den Radioliganden [³²P]-NPP1-PKA1 bzw. [³²P]-NPP1-PKA2 herzustellen (spezifische Radioaktivität: 40 Ci/mmol). In Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien

und Proteinquervernetzungsexperimenten konnte jedoch keine kompetierbare NPP1-Bindungsstelle detektiert werden. Im Zentrum zukünftiger Arbeiten wird die Perzeption von NPP1 an pflanzlichen Membranen stehen. Dazu scheint es jedoch erforderlich, einen Radioliganden mit wesentlich höherer spezifischer Radioaktivität zu präparieren. Am erfolgversprechendsten scheint dabei die Phosphorylierung mittels cAMP-abhängiger Proteinkinase und [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP zu sein. Generell ist in diesem Zusammenhang die Schaffung neuer NPP1-Derivate mit mehreren Phosphorylierungsstellen oder der Einbau von Spacerfragmenten zwischen dem Protein und der Phosphorylierungsstelle zu überdenken.

Da sich aus Sequenzvergleichsstudien keine Hinweise zur endogenen Funktion des Proteins ergaben, wurden Experimente durchgeführt, in denen das für NPP1 kodierende Gen inaktiviert werden sollte. Dies erfolgte durch die Transformation der mit NPP1_{*P.infestans*} korrespondierenden DNA in *P. infestans*. Durch Interaktion des Transgens mit dem endogenen Gen sollte eine Suppression bewirkt werden. In den ersten vier Transformationsexperimenten wurden zwar Mutanten erzeugt, die das eingeführte Gen exprimierten, das Transkriptions- und Expressionsniveau war gegenüber dem Wildtyp aber in keinem Fall signifikant erniedrigt. Die Ursache dafür könnte in einer letalen Wirkung der Suppression von NPP1 oder in der zu geringen Zahl der getesteten NPP1_{*P.infestans*}-Transformanten liegen. Zur Aufklärung der endogenen Funktion des Proteins sollen weitere Transformationsexperimente folgen, um dabei eine NPP1-defizienten Mutante detektieren zu können.

Durch die Klonierung der für das Elicitorprotein NPP1 kodierenden cDNA wurde die Voraussetzung dafür geschaffen, das Protein in ausreichender Menge zu isolieren. Somit steht genügend Material für Studien zur Signaltransduktion zur Verfügung. Für das Modellsystem Petersilie sind derzeit drei verschiedene Elicitoren (Pep-13, Nürnberger *et al.*, 1994, Harpin, Lee *et al.*, 2001a, Lee *et al.*, 2001b, Blume *et al.*, 2001 und NPP1) verfügbar, die im Wesentlichen die gleichen Abwehrreaktionen induzieren (mit Ausnahme der HR), aber über verschiedene Perzeptionssysteme agieren. Das Wissen über die Synergie und Interferenz von Signalkaskaden, die zur Auslösung der Aktivierungsmechanismen von Abwehrgenen führen, und über die rezeptorvermittelte Elicitorperzeption kann zu neuen Erkenntnissen über das Phänomen der Spezies-Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen führen. Insbesondere Rezeptoren, die die Induktion von Abwehrreaktionen in nicht kultivarspezifischer Weise vermitteln können, sind potentiell geeignet, durch Übertragung und Überexpression in suszeptiblen Pflanzen eine effizientere Erkennung der Pathogene und damit eine wirksamere Abwehr zu bewirken. Landwirtschaftliche Probleme, die durch zahlreiche Phytopathogene ausgelöst werden, sollten sich in Zukunft leichter lösen lassen, wenn die natürlichen Mechanismen und Zusammenhänge der pflanzlichen Pathogenabwehr besser verstanden werden.

6 Literatur

- Aderem, A. & Ulevitch, R.** (2000). Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. und Blackwell, M.** (1996). *Introductory Mycology*. John Wiley, New York.
- Alfano, J. R. & Collmer, A.** (1997). The type III (Hrp) secretion pathway of plant pathogenic bacteria: trafficking harpins, Avr proteins and death. *J. Bacteriol.* **179**, 5655-5662.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. und Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. und Lipman, D. J.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Alvarez, M. E., Pennell, R. I., Meijer, P. J., Ishakawa, A., Dixon, R. A. und Lamb, C.** (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**, 773-784.
- Anderson, J. D., Cardinale, F. C., Jennings, J. C., Norman, H. A., Avni, A., Hanania, U. und Bailey, B. A.** (1997). Involvement of ethylene in protein elicitor-induced plant responses. In: *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Kanellis, A. K. *et al.*, pp. 267-274, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Arabidopsis-Genom-Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-813.
- Asai, T., Stone, J. M., Heard, J. E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. und Ausubel, F. M.** (2000). Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires Jasmonate-, Ethylene-, and Salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell* **12**, 1823-1835.
- Atkinson, M. M.** (1993). Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. *Adv. Plant Pathol.* **10**, 35-64.
- Bailey, B. A.** (1995). Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **85**, 1250-1255.
- Bailey, B. A., Jennings, J. C. und Anderson, J. D.** (1997). The 24-kDa protein from *Fusarium oxysporum* f. sp. *erythroxyli*: occurrence in related fungi and effect of growth medium on its production. *Can. J. Microbiol.* **43**, 45-55.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. und Dinesh-Kumar, S. P.** (1997). Signalling in plant-microbe interactions. *Science* **276**, 726-733.

- Baker, C. J.** & Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopath.* **33**, 299-321.
- Basse, C. W.**, Fath, A. und Boller, T. (1993). High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J. Biol. Chem.* **268**, 14724-14731.
- Baureithel, K.**, Felix, G. und Boller, T. (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 17931-17938.
- Bell, A. A.** (1981). Biochemical mechanisms of disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **32**, 21-81.
- Bender, C. L.**, Alarcon-Chaidez, F. und Gross, D. C. (1999). *Pseudomonas syringae* phytotoxins: Mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 266-292.
- Bent, A. F.**, Kunkel, B. N., Dahlbeck, D. Brown, K. L., Schmidt, R., Giraudat, J., Leung, J. und Staskawicz, B. J. (1994). *RPS2* of *Arabidopsis thaliana*: a leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science* **265**, 1856-1860.
- Bischoff, F.**, Molendijk, A., Rajendrakumar, C. S. V. und Palme, K. (1999). GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 233-256.
- Blum, H.**, Beier, H. und Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamid gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Blume, B.**, Nürnberger, T., Nass, N. und Scheel, D. (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**, 1425-1440.
- Bohlmann, H.** (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* **13**, 1-16.
- Boller, T.** (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**, 189-214.
- Bolwell, G. P.**, Butt, V. S., Davies, D. R. und Zimmerlin, A. (1995). The origin of the oxidative burst in plants. *Free Rad. Res. Comm.* **23**, 517-532.
- Bolwell, G. P.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 287-294.
- Bonas, U.** & van den Ackerveken G. (1997) Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant J.* **12**, 1-7.
- Bonnet, P.**, Bourdon, E., Ponchet, M., Blein, J. P. und Ricci, P. (1996). Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants. *Eur. J. Plant Physiol.* **102**, 181-192.

Bostock, R. M., Laine, R. A. und Kuc, J. A. (1982). Factors affecting the elicitation of sesquiterpenoid phytoalexin accumulation by eicosapentaenoic and arachidonic acids in potato. *Plant Physiol.* **70**, 1417-1424.

Bradley, D. J., Kjellbom, P. und Lamb, C. J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative crosslinking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* **70**, 21-30.

Braun, D. W. & Walker, J. C. (1996). Plant transmembrane receptors: new pieces in the signaling puzzle. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 70-73.

Buchanan, B. B., Gruissem, W. und Jones, R. L. (2000) Biochemistry & molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists Rockville, Maryland.

Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

Cardinale F., Jonak C., Ligterink W., Niehaus K., Boller T. und Hirt H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J. Biol. Chem.* **275**, 36734-36740.

Catalanotto, C., Azzalin, G., Macino, G. und Cogoni, C. (2000). Gene silencing in worms and fungi. *Nature* **404**. 245.

Cervone, F., Castoria, R., Leckie, F. und De Lorenzo, G. (1997). Perception of fungal elicitors and signal transduction. In: *Signal Transduction in Plants*, P. Aducci (ed.), 153-177, Birkhäuser Verlag Basel Switzerland.

Chappell, J., Hahlbrock, K. und Boller, T. (1984). Rapid induction of the ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanin-ammonia-lyase. *Planta* **161**, 475-480.

Cheong, J. & Hahn, M. G. (1991). A specific, high-affinity binding site for the hepta- β -glucoside elicitor exists in soybean membranes. *Plant Cell* **3**, 137-147.

Cheong, J., Alba, R., Côté, F., Enkerli, J. und Hahn, M. G. (1993). Solubilization of functional plasma membrane-localized hepta- β -glucoside elicitor-binding proteins from soybean. *Plant Physiol.* **103**, 1173-1182.

Chuang, C.-F. & Meyerowitz, E. M. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 4985-4990.

Clarke A., Desikan R., Hurst R. D., Hancock J. T. und Neill S. J. (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667-677.

- Clos, J.** & Brandau, S. (1994). pJC20 and pJC40- two high-copy-number vectors for T7 RNA polymerase-dependent expression of recombinant genes in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **5**, 133-137.
- Cogoni, C.** & Macino, G. (1999a). Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* **399**, 166-169.
- Cogoni, C.** & Macino, G. (1999b). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora crassa* by a RecQ DNA helicase. *Science* **286**, 2342-2344.
- Cogoni, C.** & Macino, G. (2000). Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 638-643.
- Cohn, J.,** Sessa, G. und Martin, G. B. (2001). Innate immunity in plants. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 55-62.
- Conrath, U.,** Jeblinck, W. und Kauss, H. (1991). The protein kinase inhibitor, K252a, decreases elicitor induced Ca^{2+} uptake and K^+ release, and increases coumarin synthesis in parsley cells. *FEBS Lett.* **279**, 141-144.
- Conrath, U.,** Silva, H. und Klessig, D. F. (1997). Protein dephosphorylation mediates salicylic acid induced expression of *pr1* genes in tobacco. *Plant J.* **11**, 747-757.
- Cosio, E. G.,** Frey, T., Verduyn, R., van Broom, J. und Ebel, J. (1990). High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Lett.* **271**, 223-226.
- Dangl, J. L.,** Hauffe, K. D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1987). Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J.* **6**, 2551-2556.
- Dangl, J. L.,** Dietrich, R. A. und Richberg, M. H. (1996). Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807.
- Davidse, , L. C.,** Berg-velthuis, V. D., Mantel, B. C. und Jespers, A. B. K. (1991). Phenylamids and *Phytophthora*. In: *Phytophthora* (J. A. Lucas, R. C. Shattok, D. S. Shaw, und L. R. Cooke, Eds.), 349-360. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- De Wit, P. J. G. M.** (1995). Fungal avirulence genes and plant resistance genes: Unraveling the molecular basis of gene-for-gene interactions. In: *Advances in Botanical Research* (J. H. Andrews und I. C. Tommerup, Eds.), **Vol. 21**, 147-185. Academic Press, London.
- De Wit, P. J. G. M.** (1997). Pathogen avirulence and plant resistance: A key role for recognition. *Trends in Plant Sci.* **2**, 452-458.
- De Wit, P. J. G. M.** (1998). Fungal avirulence genes and plant resistance genes: unraveling the molecular basis of gene for gene interactions. *Adv. Bot. Res.* **21**, 148-177.

- Delledonne, M.**, Xia, Y., Dixon, R. A. und Lamb, C. (1998). Nitric oxide signal functions in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- Devoto A.**, Piffanelli P., Nilsson I., Wallin E., Panstruga R., von Heijne G. und Schulze P. (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J. Biol. Chem.* **274**, 34993-35004.
- Dick, M. W.** (1995). The straminipilous fungi: A new classification for the biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to the Laginiaceae fungi. *C.A.B. Int. Mycol. Pap.*, 168.
- Dietrich, A.**, Mayer, J. E. und Hahlbrock, K. (1990). Fungal elicitor triggers rapid, transient and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J. Biol. Chem.* **265**, 6360-6368.
- Dixon, M. S.**, Hatzixanthis, K., Jones, D. A., Harrison, K. und Jones, D. A. (1998). The tomato *Cf-5* disease resistance gene and six homologs show pronounced allelic variation in leucine-rich repeat copy number. *Plant Cell* **10**, 1915-1925.
- Dixon, R. A.** & Lamb, C. J. (1990). Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**, 339-367.
- Dixon, R. A.**, Harrison, M. J. und Lamb, C. J. (1994). Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **32**, 479-501.
- Dixon, R. A.**, Jones, D. A., Keddie, J. S., Thomas, C. M., Harrison, K. und Jones J. D. G. (1996). The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins. *Cell* **84**, 451-459.
- Doke, N.** (1985). NADPH-dependent O_2^- generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* **27**, 311-322.
- Doke, N.** (1997). The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (J. G. Scandalios, Ed.), 785-813. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Dong, X.** (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 316-323.
- Durner, J.**, Wendehenne, D. und Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxid, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 10328-10333.
- Ebel, J.** (1986). Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annu. Rev. Phytopathol.* **24**, 235-264.
- Ebel, J.** & Cosio, E. G. (1994). Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* **148**, 1-36.

- Ebel, J. & Scheel, D.** (1992). Elicitor recognition and signal transduction. In: Boller, T. Meins, F.(eds) *Genes involved in plant defense*. Springer, Wien, 184-205.
- Ebel, J. & Scheel, D.** (1997). Signals in host-parasite interactions. In: *The Mycota* (K. Esser, P.A. Lemke, eds.), **Vol. VI** Plant Relationships (G. C. Carroll, P. Tudzinsky, eds.). Springer Verlag Berlin. 85-105.
- Eisenberg D.**, Schwarz E., Komaromy M. und Wall R. (1984). Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *J. Mol. Biol.* **179**, 125-42.
- Elbashir, S. M.**, Lendeckel, W. und Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22 nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**, 188-200.
- Ellingboe, H. A.** (1984). Genetics of host-parasite relations: an essay. *Adv. Plant Physiol.* **2**, 131-151.
- Elstner, E. F.**, Oßwald, W. und Schneider, I. (1996). *Phytopathologie: Allgemeine und Biochemische Grundlagen*. Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Epple, P.**, Apel, K., Bohlmann, H. (1997) Overexpression of an endogenous thionin enhances resistance of Arabidopsis against *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* **9**, 509-520.
- Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K.** (1996). *Phytophthora* Disease Worldwide, The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Felix, G.**, Regenass, M., Spanu, P. und Boller, T. (1994). The protein phosphatase inhibitor calyculin A mimics elicitor action in plant cells and induces rapid hyperphosphorylation of specific proteins as revealed by pulse labelling with [³³P]-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 952-956.
- Felix, G.**, Duran, J. D., Volko, S., und Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* **18**, 265-276.
- Fellbrich, G.**, Blume, B., Brunner, F., Hirt, H., Kroj, T., Ligterink, W., Romanski, A. und Nürnberger, T. (2000). *Phytophthora parasitica* elicitor-induced reactions in cells of *Petroselinum crispum*. *Plant Cell Physiol.* **41**, 692-701.
- Fellbrich, G.** (2001). Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Feys B. J. & Parker J. E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet.* **16**, 449-55.
- Filippone, M. P.**, Diaz Ricci, J., Mamani de Marchese, A., Farias, R. N., Castagnaro, A. (1999). Isolation and purification of a 316 Da preformed compound from strawberry (*Fragaria ananassa*) leaves active against plant pathogens. *FEBS Lett.* **459**, 115-118.
- Flor, H. H.** (1956). The complementary genetic systems in flax and flax rusts. *Adv. Genet.* **8**, 29-54.

- Fraker, P. J.** & Speck, J. C. (1978). Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1,3,4,6-tetrachloro-3a,6a-diphrenylglycoluril. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 849-57.
- Frey, T.,** Cosio, E. G. und Ebel J. (1993). Affinity purification and characterization of a binding protein for a hepta- β -glucoside phytoalexin elicitor in soybean. *Phytochem.* **32**, 543-550.
- Frishman, D.** & Argos, P. (1996). Incorporation of non-local interactions in protein secondary structure prediction from the amino acid sequence. *Protein Eng.* **9**, 133-142.
- Fry, W. E.** (1996). Emerging and reemerging disease of plants. *Am. Soc. Microbiol. News* **62**, 595-597.
- Frye, C. A.,** Tang, D. und Innes, R. W. (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 373-378.
- Galan, J. E.** & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: Bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**, 1322-1328.
- Gelli, A.,** Higgins, V. J. und Blumwald E. (1997). Activation of plant plasma membrane Ca^{2+} -permeable channels by race-specific fungal elicitors. *Plant Physiol.* **113**, 269-279.
- Gierlich, A.,** van't Slot, K. A. E., Li, V. M., Marie, C., Hermann, H. und Knogge, W. (1999). Heterologous Expression of the avirulence gene product, NIP1, from the Barley pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Prot. Expr. Purif.* **17**, 64-73.
- Gilchrist, D. G.** (1998). Programmed cell death in plant disease: The purpose and promise of cellular suicide. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**, 393-414.
- Gómez-Gómez, L.,** & Boller, T. (2000) FLS2: A LRR receptor-like kinase is involved in the perception of the bacterial elicitor, flagellin, in Arabidopsis. *Mol. Cell* **5**, 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L.,** Bauer, Z. und Boller, T. (2001). Both the extracellular leucine rich repeat domain and the kinase activity of *fls2* are required for flagellin binding and signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
- Goudet, C.,** Milat, M.-L., Sentenac, H. und Thibaud, J.-B. (2000). Beticolins, nonpeptidic, polycyclic molecules produced by the phytopathogenic fungus *Cercospora beticola*, as a new family of ion channel-forming toxins. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**, 203-209.
- Granado, J.,** Felix, G. und Boller, T. (1995). Perception of fungal sterols in plants: Subnanomolar concentration of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *Plant Physiol.* **107**, 485-490.
- Graniti, A.** (1991). Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Introduction. *Experientia* **47**, 751-755.

- Grant, M.**, Brown, I., Adams, S., Knight, M., Ainslie, A. und Mansfield, J. (2000) The *RPM1* plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J.* **4**, 441-450.
- Greenberg, J. T.**, (1997). Programmed cells death in plant pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 525-545.
- Hahlbrock, K.** (1975). Further studies on the relationship between the rates of nitrate uptake, growth and conductivity changes in the medium of plant cell suspension cultures. *Planta* **124**, 311-318.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1987). Biochemical responses of plants to pathogens. In: *Innovative approaches to plant disease control*. I. Chet. Ed. John Wiley & Sons, New York, 229-254.
- Hahn, M. G.**, Jüngling, S. und Knogge (1993). Cultivar-specific elicitation of barley defense reactions by the phytotoxic peptide NIP1 from *Rhynchosporium secalis*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 745-754.
- Hahn, M. G.** (1997). Signal perception at the plasma membrane: binding proteins and receptors. In: *Membranes: Specialized functions in plants* ed. by Smallwood, M., Knox, J.-P. und Bowles, D. F., BIOS Scientific Publishers Ltd. 1996, Oxford, UK.
- Hammerschmidt, R.** (1984). Rapid deposition of lignin in potato tuber as a response to fungi non-pathogenic on potato. *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 33-42.
- Hammond, S. M.**, Caudy, A. A. und Hannon, G. J. (2001). Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 110-119.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G.** (1997). Plant disease resistance genes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Biol.* **48**, 575-607.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hanania, U. & Avni, A.** (1997). High affinity binding site for ethylene inducing xylanase elicitor on *Nicotiana tabacum* membranes. *Plant J.* **12**, 113-120.
- Hauffe, K. D.**, Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1986). Elicitor-stimulated furanocoumarin biosynthesis in cultured parsley cells: S-adenosyl-L-methionine:bergaptol and S-adenosyl-L-methionine: Xantholol-O-methyltransferase. *Z. Naturforsch.* **41c**, 228-239.
- Heath, M. C.** (1998). Apoptosis, programmed cell death and hypersensitive response. *Eur. J. Plant Pathol.* **104**, 117-124.

- Heath, M. C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**, 315-319.
- Henninger, H.** (1959) Versuche zur Kultivierung verschiedener Rassen von *Phytophthora infestans* (Mont de Bary) auf künstlichen Nährböden. *Phytopathol. Z.* **34**, 285-306.
- Hirt, H.** (1997). Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Sci.* **2**, 11-15.
- Huang, C.-N.,** Cornejo, M. J., Bush, D. S. und Jones, R. L. (1986). Estimating viability of plant protoplasts using double and single staining. *Protoplasma* **135**, 80-87.
- Huet, J.-C.,** Le Caer, J. P., Nespoulous, C. und Pernollet, J.-C. (1995). The relationship between the toxicity and the primary and secondary structure of elicitor-like protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 302-310.
- Hulme, E. C. &** Birdsall, N. J. M. (1990). Strategy and tactics in receptor-binding studies. In: *Receptor-ligand interactions: A practical approach* **1**, Hulme, E. C., ed. (Oxford: Oxford University Press), 63-176.
- Hunt, M. D.,** Neuenschwander, U. H., Delaney, T. P., Weymann, K. B., Friedrich, L. B., Lawton, K. A., Steiner, H. Y. und Ryals, J. A. (1996). Recent advances in systemic acquired resistance research: A review, *Gene* **179**.
- Hutchison, M. L.,** Tester, M. A. und Gross, D. C. (1995). Role of biosurfactant and ion channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux: A model for the mechanism of action in the plant pathogen interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 610-620.
- Jabs, T.,** Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4800-4805.
- Jach, G.,** Görnhardt, B., Mundy, J., Logemann, P., Pinsdorf, E., Leah, R., Schell, J. und Maas, C. (1995). Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**, 97-109.
- Jahnen, W. &** Hahlbrock, K. (1988). Cellular localization of nonhost resistance reactions of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection. *Planta* **173**, 197-204.
- Jakobek, J. L. &** Lindgren, P. B. (1993). Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell.* **5**, 49-56.
- James, C. W.** (1981). Estimated losses of crops from plant pathogens. In: *Handbook of pest management in agriculture* (D. Pimentel, Ed.), 80-94.

- Jameson, B. A.** & Wolf, H. (1988). The antigenic index: a novel algorithm for predicting antigenic determinants. *Comput. Appl. Biosci.* **4**, 181-186.
- Jennings, J. C.**, Apel-Birkenhold, P. C., Bailey, B. A. und Anderson, J. D. (2000). Induction of ethylene biosynthesis and necrosis in weed leaves by a *Fusarium oxysporum* protein. *Weed Sci.* **48**, 7-14.
- Ji, C.**, Boyd, C., Slaymaker, D., Okinaka, Y., Takeuchi, Y., Tsurushima, T., Buzzell, R. I., Sims, J. J., Midland, S. L., Herman, E. und Keen, N. (1997). Specific binding of the syringolide elicitors to a soluble protein fraction from soybean leaves. *Plant Cell* **9**, 1425-1433.
- Jia, Y.**, McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. und Valent B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**, 4004-4014.
- Johal, G. S.** & Briggs, S. P. (1992). Reductase encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize. *Science* **258**, 985-987.
- Jones, D. A.**, Thomas, C. M., Hammond-Kosack, K. E., Balint-Kurti, P. J. und Jones, J. D. G. (1994). Isolation of tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**, 789-793.
- Joosten, M. H. A. J.**, Cozijnsen, T. J., und De Wit, P. J. G. M. (1994). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature* **367**, 384-386.
- Judelson, H. J.**, Tyler, B. M., und Michelmore, R. W. (1991). Transformation of the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 602-607.
- Kamath, R. S.**, Martinez-Campos, M., Zipperlen, P., Fraser, A.G. und Ahringer, J. (2000). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genom Biol.* **2**, 0002.1-0002.10.
- Kamoun, S.**, Young, M., Glasock, C. B. und Tyler, B. M. (1993). Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host specificity and induction of resistance to bacterial and fungal Phytopathogens. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 15-25.
- Kamoun, S.**, Young, M., Forsters, H., Coffey, M. D. und Tyler, B. M. (1994). Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**, 1593-1598.
- Kamoun, S.**, van West, P., Vleeshouwers, V. G. A. A., de Groot, K. E. und Govers, F. (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor INF1. *Plant Cell* **10**, 1413-1426.
- Kamoun, S.**, Huitema, E. und Vleeshouwers, V. G. A. A. (1999) Resistance to oomycetes: a general role for the hypersensitive response?. *Trends in Plant Sci.* **4**, 196-200.

- Kauss, H.**, Waldmann, T., Jeblick, W., Euler, G., Ranjeva, R. und Domard, A. (1989). Ca^{2+} is an important but not the only signal in callose synthesis induced by chitosan, saponins and polyene antibiotics. In: *Signal molecules in plants and plant-microbe-interactions*, Vol. **1**, Springer Verlag Berlin, 107-116.
- Kawasaki, T.**, Henmi, K., Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H. und Shimamoto, K. (1999). The small GTP-binding protein rac is a regulator of cell death in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 10922-10926.
- Keen, N. T.** (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: Determinants of race specificity in plants? *Science* **187**, 74-75.
- Keen, N. T.** (1990). Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 447-463.
- Keller, B.** (1993). Structural cell wall proteins. *Plant Physiol.* **101**, 1127-1130.
- Keller, H.**, Blein, J. P., Bonnet, P. und Ricci, P. (1996). Physiological and molecular characteristics of elicitor induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiol.* **110**, 365-376.
- Kieffer, B. L.**, Black, D. und Hirth, C. G. (1993). ^{32}P -Labeled Opioid peptides with high affinity for the δ -Opioid receptor. *Anal. Biochem.* **215**, 1-8.
- Kim, Y. S.**, Lee, J. H., Yoon, G. M., Cho, H. S., Park, S.-W., Suh, M. I., Choi, D., Ha, H. J., Liu, J. R. und Pai, H.-S. (2000). CHRK1, a Chitinase-related receptor-like kinase in tobacco. *Plant Physiol.* **123**, 905-915.
- Klessig, D. F.**, Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. und Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 8849-8855.
- Klüsener, B.** & Weiler, E. (1999) Pore-forming properties of elicitors of plant defense reactions and cellulolytic enzymes *FEBS Lett.* **459**, 263-266.
- Knogge, W.** (1996). Fungal infection of plants. *Plant Cell* **8**, 1711- 1722.
- Koch, W.** (1998). Signaltransduktion zu Zelltod und Phytoalexinsynthese in *Daucus carota*. Isolierung und molekularbiologische Charakterisierung eines neuen Proteinelicitors aus *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzp. Dissertation an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- Kombrink, E.** & Somssich, I. (1995). Pathogen Defense in Plants. *Adv. Plant Pathol.* **21**, 1-36.
- Kombrink, E.** & Somssich, I. (1997). Pathogenesis-related proteins and plant defense. In: *The Mycota. Plant Relationships*, Part A (G. C. Carroll und P. Tudzynski, eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Vol. **V**, 107-128.

- Kooman-Gersmann, M.**, Honee, G., Bonnema, G., De Wit, P. J. G. M. (1996). A high affinity binding site for the AVR9 peptide elicitor of *Cladosporium fulvum* is present on plasma membranes of tomato and other solanaceous plants. *Plant Cell* **8**, 929-940.
- Kovtun, Y.**, Chiu, W.-L., Tena, G. und Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 2940-2945.
- Kroj, T.** (1999). Mitogen-aktivierte Proteinkinasen – neue Signalelemente in der pflanzlichen Pathogenabwehr. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lamb, C. J.** & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lauge, R.** & De Wit, P. J. G. M. (1998). Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genet. Biol.* **24**, 285-297.
- Lawrence, G. J.**, Finnegan, E. J., Ayliffe, M. A. und Ellis, J. G. (1995). The *L6* gene for flax rust resistance is related to Arabidopsis bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*. *Plant Cell* **7**, 1195-1206.
- Lee, J.**, Klüsener, J., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A. C., Panopoulos, N. J., Nöller, J., Weiler, E. W., Cornelis, G. R., Mansfield J. W. und Nürnberger T. (2001a). HrpZPsph from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* binds to lipid bilayers and forms an ion-conducting pore *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 289-294.
- Lee, J.**, Klessig, D. F. und Nürnberger, T. (2001b). A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene, *HIN1*, independent of extracellular calcium but dependent on MAPK activity. *Plant Cell* **13**, 1079-1093.
- Legendre, L.**, Heinstein, P. F. und Low, P. S. (1992). Evidence for the participation of GTP-binding proteins in elicitation of the rapid oxidative burst in cultured soybean cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 20140-20147.
- Levine, A.**, Tenhaken, R., Dixon, R. und Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.
- Ligterink, W.**, Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. und Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.
- Linthorst, H. J. M.** (1991). Pathogenesis-related proteins of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **10**, 123-150.
- Logemann, J.**, Schell, J. und Willmitzer, L. (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.

- Luderer, R.**, Rivas, S., Nürnberger, T., Mattei, B., van den Hooven, H. W., van der Hoorn, R. A. L., Romeis, T., Wehrfritz, J.-M., Blume, B., Nennstiel, D., Zuidema, D., Vervoort, J., De Lorenzo, G., Jones, J. D. G., De Wit, P. J. G. M. und Joosten, M. H. A. J. (2001). No evidence for binding between resistance gene product Cf-9 of tomato and avirulence gene product AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**, 867-876.
- Markwell, M.** (1982). A new solid state reagent to iodinate proteins: conditions for the efficient labelling of antiserum. *Anal. Biochem.* **125**, 427-432.
- Marmeisse, R.**, van den Ackerveken, G. F. J. M., Goosen, T., De Wit, P. J. G. M. und van den Broeck, H. W. J. (1993). Disruption of the avirulence gene *avr9* in two races of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* causes virulence on tomato genotypes with the complementary resistance gene *Cf-9*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**, 412-417.
- Martin, G. B.**, Brommonschenkel, S., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M. W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E. D. und Tanksley, S. D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science* **262**, 1432-1436.
- Mathieu, Y.**, Sanchez, F. J., Droillard, M.-J., Lapous, D., Lauriere, C. und Guern, J. (1996). Involvement of protein phosphorylation in the early steps of transduction of the oligogalacturonide signal in tobacco cells. *Plant Physiol.* **119**, 1289-1296.
- Matzke, M. A. & Matzke, A. J. M.** (1995). How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* **107**, 679-685.
- Matzke, M. A.**, Mette, M. F. und Matzke, A. J. (2000). Transgene silencing by the host genome defense: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* **43**, 401-415.
- Matzke, M. A.**, Matzke, A. J., Pruss, G. J. und Vance, V. B. (2001). RNA-based silencing strategies in plants. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **11**, 221-227.
- McDowell, J. M.**, Dhandaydham, M., Long, T. A., Aarts, M. G., Goff, S., Holub, E. B. und Dangl, J. L. (1998). Intragenic recombination and diversifying selection contribute to the evolution of downy mildew resistance at the *RPP8* locus of Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1861-1874.
- McDowell, J. M. & Dangl, J. F.** (2000). Signal transduction in the plant immune response, *Trends in Biochem. Sci.* **25** (2), 79-82.
- McFarthing, K. G.** (1990). Selection and synthesis of receptor-specific radioligands. In *Receptor-Ligand Interactions. A practical Approach*, Hulme, E. C., eds. (IRL Press, Oxford, New York, Tokyo), pp.1-18.
- Mehdy, M. C.**, Sharma, Y. K., Sathasiva, K. und Bays, N. W. (1996). The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Plant Physiol.* **98**, 365-374.
- Meindl, T.**, Boller, T. und Felix, G. (2000). The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to address-message concept. *Plant Cell* **12**, 1783-1794.

- Messiaen, J.**, Nerinckx, F. und van Cutsem, P. (1995). Callose synthesis in spirostanol treated carrot cells is not triggered by cytosolic calcium, cytosolic pH or membrane potential changes. *Plant Cell Physiol.* **36**, 1213-1220.
- Mette, M. F.**, Aufsatz, W., van der Winden, J., Matzke, M. A. und Matzke, A. J. (2000). Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO J.* **19**, 5194-5201.
- Mikes, V.**, Milat, M. L., Ponchet, M. Ricci, P. und Blein, J. P. (1997). The fungal elicitor cryptogein is a sterol carrier protein. *FEBS Lett.* **416**, 190-192.
- Mithöfer, A.**, Lottspeich, F. und Ebel J. (1996). One-step purification of the β -glucan elicitor-binding protein from soybean (*Glycine max* L.) roots and characterization of an antipeptide antiserum. *FEBS Lett.* **381**, 203-207.
- Mithöfer, A.**, Ebel, J., Bhagwat, A. A., Boller, T. und Neuhaus-Url, G. (1999). Transgenic aequorin monitors cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* **207**, 566-574.
- Mithöfer, A.**, Fliegmann, J., Neuhaus-Url, G., Schwarz, H. und Ebel, J. (2000). The hepta-beta-glucoside elicitor-binding proteins from legumes represent a putative receptor family. *Biol. Chem.* **381**, 705-713.
- Nelson, A. J.**, Apel-Birkhold, P. C. und Bailey, B. A. (1998). Sequence Announcement. *Plant Mol. Biol.* **38**, 911-912.
- Nennstiel, D.**, Scheel, D., und Nürnberger, T. (1998). Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett.* **431**, 405-410.
- Ngo, H.**, Tschudi, C., Gull, K. und Ullu, E. (1998). Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14687-14692.
- Nürnberger, T.**, Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W. R., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449-460.
- Nürnberger, T.**, Nennstiel, D., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1995). Covalent cross-linking of the *Phytophthora megasperma* oligopeptide elicitor to its receptor in parsley membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2338-2342.
- Nürnberger, T.** & Nennstiel, D. (1998). Fungal peptide elicitors: signals mediating pathogen recognition in plants. *Z. Naturforsch.* **53c**, 141-150.
- Nürnberger, T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 167-182.
- Nürnberger, T.** & Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Sci.* **6**, 372-379.

- Oerke, E. C.**, Dehne, H. W., Schonbeck, F. und Weber, A. (1994). Crop production and crop protection. Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Elsevier, New York.
- Ori, N.**, Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D. und Fluhr, R. (1997). The I_2C family from the wilt disease resistance locus I_2 belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *Plant Cell* **9**, 521-532.
- Osbourn, A. E.** (1996a). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**, 1821-1831.
- Osbourn, A. E.** (1996b). Saponins and plant defence – A soap story. *Trends Plant Sci.* **1**, 4-9.
- Otte, O.** & Barz, W. (1996). The elicitor induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives the rapid insolubilization of two cell wall structural proteins. *Planta* **200**, 238-246.
- Parker, J. E.**, Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1988). Different cell-wall components from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicit phytoalexin production in soybean and parsley. *Planta* **176**, 75-82.
- Parker, J. E.**, Schulte, W., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1991). An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4**, 19-27.
- Parker, J. E.**, Coleman, M. J., Szabo, V., Frost, L. N., Schmidt, R., van der Biezen, E. A., Moores, T., Dean, C., Daniels, M. J. und Jones, J. D. G. (1997). The Arabidopsis downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to toll and interleukin-1-receptors with *N* and *L6*. *Plant Cell* **9**, 879-894.
- Partis, M. D.**, Griffiths, D. G., Roberts, G. C. und Beechey, R. B. (1983). Cross-linking of protein by ω -maleimido alkanoyl N-hydroxysuccinimido esters. *J. Prot. Chem.* **2**, 263-277.
- Peng, M.** & Kuc, J. (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vivo* and on tobacco leaf disks. *Phytopathol.* **82**, 696-699.
- Piedras, P.**, Hammond-Kosack, K. E., Harrison, K. und Jones, J. D. G. (1998). A rapid *Cf-9* and *Avr9*-dependent production of active oxygen species in tobacco suspension cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 1155-1168.
- Pieterse, C. M. J.** & van Loon, L.C., (1999). Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends Plant Sci.* **4**, 52-58.
- Ponchet, M.**, Panabieres, F., Milat, M.-L., Mikes, L., Montillet, J.-L., Suty, L., Triataphylides, Y., Tirilly, Y, Blein, J.-P. (1999). Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 1020-1047.
- Prell, H. H.** (1996). Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Fischer Verlag Jena.

- Pugin, A.**, Frachisse, J.-M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. und Guern, J. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *Plant Cell* **9**, 2077-2091.
- Qutob, D.**, Hrabec, P. T., Sobral, B. W. S. und Gijzen, M. (2000). Comparative analysis of expressed sequences in *Phytophthora sojae*. *Plant Physiol.* **123**, 243-253.
- Raeder, U.** & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Lett. Appl. Microbiol.* **1**, 17.
- Rajasekhar, V.**, Lamb, C. und Dixon, R. A. (1999). Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. *Plant Physiol.* **120**, 1137-1146.
- Rehm, H.** (1996). Der Experimentator: Proteinbiochemie. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York.
- Reymond, P.** & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 404-411.
- Ricci, P.**, Bonnet, P., Huet, J.-C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. und Pernollet, J.-C. (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur. J. Biochem.* **183**, 555-563.
- Richberg, M. H.**, Aviv, D. H. und Dangl, J. L. (1998). Dead cells do tell tales. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 480-485.
- Ride, J. P.** (1983). Cell walls and other structural barriers in defense. In: *Biochemical Plant Pathology* (J.A. Callow, ed.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, 215-236.
- Rohe, M.**, Gierlich, A., Hermann, H., Hahn, M., Schmidt, B., Rosahl, S. und Knogge, W. (1995). The race-specific elicitor, NIP1, from barley pathogen *Rhynchosporium secalis*, determines avirulence on host plants of the *Rrs1* resistance genotype. *EMBO J.* **14**, 4168-4177.
- Romeis, T.**, Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D. F., Hirt, H. und Jones, J. D. G. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* **2**, 273-287.
- Romeis, T.**, Piedras, P. und Jones, J. D. G. (2000). Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase (CDPK) in the plant defense response. *Plant Cell* **12**, 803-815.
- Ryals, J. A.**, Neuenschwander, U. H., Willits, M. G., Molina, A., Steiner, H.-Y. und Hunt, M. D. (1996). Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-1819.

Ryan, C. A. & Farmer, E. E. (1991). Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **42**, 651-674.

Sacks, W. R., Ferreira, P., Hahlbrock, K., Jabs, T., Nürnberger, T., Renelt, A. und Scheel, D. (1993). Elicitor recognition and intracellular signal transduction in plant defense. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, Nester, E. W. und Verma, D. P. S., eds. (Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers) **2**, 485-495.

Sacks, W. R., Nürnberger, T., Hahlbrock, K. und Scheel, D. (1995). Molecular characterization of nucleotide sequences encoding the extracellular glycoprotein elicitor from *Phytophthora megasperma*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 45-55.

Salacinski, P. R., McLean, C., Sykes, J. E., Clement-Jones, V. V. und Lowry, P. J. (1981). Iodination of proteins, glycoproteins, and peptides using a solid phase oxidizing agent, 1,3,4,6-tetra-3 α , 6 α diphenyl glycoluril (iodogen). *Anal. Biochem.* **117**, 136-146.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Scheel, D., Colling, C., Hedrich, R., Kawalleck, P., Parker, J. E., Sacks, W. R. Somssich, I. E. und Hahlbrock, K. (1991). Signals in plant defense gene activation. In: *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe-Interaction*, eds. Hennecke, H. und Verma, D. P. S. (Kluwer, Dordrecht, The Netherlands) **1**, 373-380.

Scheel, D. (1992). Molecular aspects of host defense responses after infection by pathogenic fungi: an overview. In: *Molecular Biology of Filamentous Fungi*. Proceedings of the EMBO-Workshop, Berlin, August, 24-29, 1991 (U. Stahl und P. Tudzynski, Eds.), 125-138. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

Scheel, D. (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**, 305-310.

Scheel, D., Blume, B., Brunner, F., Fellbrich, G., Dalboge, H., Hirt, H., Kauppinen, S., Kroj, T., Ligterink, W., Nürnberger, T., Tschöpe, M., Zinecker, H. und Zur Nieden, U. (2000). Receptor-mediated signal transduction in plant defense. In: *Biology of Plant-Microbe Interactions* (Vol.2) (De Wit, P. D. G. M. *et al.*, eds.), 131-135, International Society of Plant-Microbe Interactions.

Scheel, D. (2001). Oxidative burst and the role of reactive oxygen species in plant-pathogen interactions. In: *Oxidative Stress in Plants* (Inzé, D. and van Montagu, M. eds.), 137-153, Harwood Academic Publishers.

Schmelzer, E., Krüger-Lebus, S. und Hahlbrock, K. (1989). Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection on parsley leaves. *Plant Cell* **1**, 993-1001.

Schuurs, T. A., Schaeffer, A. M. und Wessels, J. G. H. (1997). Homology-dependent silencing of the *SC3* gene in *Schizophyllum commune*. *Genetics* **147**, 589-596.

Segal, A. W. & Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 43-47.

Selker, E. U. (1997). Epigenetic phenomena in filamentous fungi: useful paradigms or repeat-induced confusion. *Trends Genet.* **13**, 293-301.

Sharp, J. K., Valent, B. und Albersheim, P. (1984). Purification and partial characterization of a β -glucan fragment that elicits phytoalexin accumulation in soybean. *J. Biol. Chem.* **259**, 11312-11320.

Sharp, P. A. (2001). RNA interference – 2001. *Genes Dev.* **15**, 485-490.

Shibuya, N., Ebisu, N., Kamada, Y., Kaku, H., Cohn, J. und Ito, Y. (1996). Localization and binding characteristics of a high-affinity binding site for N-acetylchito-oligosaccharide elicitor in the membrane from suspension-cultured rice cells suggest a role as receptor for the elicitor signal at the cell surface. *Plant Cell Physiol.* **37**, 894-898.

Shibuya, N., Kaku, H., Kuchitsu, K. und Maliarik, M. J. (1993). Identification of a novel high-affinity binding site for N-acetylchitoooligosacchride elicitor in the membrane fraction from suspension-cultured rice cells. *FEBS Lett.* **329**, 75-78.

Sholtens-Toma, I. M. J. & De Wit, P. J. G. M. (1988). Purification and primary structure of a necrosis-inducing peptide from apoplastic fluids of tomato infected with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **33**, 59-67.

Smith, N. A., Singh, S. P., Stoutjesdijk, P. A., Green, A. G. und Waterhouse, P. M. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.

Somssich, I. E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. und Schulz, W. (1989). Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol. Biol.* **12**, 227-234.

Spielmann, L. J., Drenth, A., Davidse, L. C., Sujkowski, L. J., Gu, W. K., Tooley, P. W. und Fry, W. E. (1991). A second world-wide migration and population displacement of *Phytophthora infestans*? *Plant Pathol.* **40**, 422-430.

Staskawicz, B. J., Mudgett, M. B., Dangl, J. L. und Galan, J. E. (2001). Common and contrasting themes of plant and animal disease. *Science* **292**, 2285-2289.

Sticher, L., Mauch-Mani, B. und Metraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **35**, 235-270.

Stone, J. M., Heard, J. E., Asai, T. und Ausubel, F. M. (2000). Simulation of fungal-mediated cell death by Fumonisin B1 and selection of Fumonisin B1-resistant (*fbr*) Arabidopsis mutants. *Plant Cell* **12**, 1811-1822.

Takami, H., Nakasone, K., HIRAMA, C., Takaki, Y., Masui, N., Fuji, F., Nakamura, Y. und Inoue, A. (1999). An improved physical and genetic map of the genome of alkaliphilic *Bacillus* sp.. *Extremophiles* **3**, 21-28.

Takken, F. L. W. & Joosten, M. H. A. J. (2000). Plant resistance genes: their structure, function and evolution. *Eur. J. Plant Pathol.* **106**, 699-713.

Tang, X. Y., Frederick, R. D., Zhou, J. M., Haltermann, D. A., Jia, Y. L. und Martin, G. B. (1996). Initiation of plant disease resistance by physical interaction of AvrPto and Pto kinase. *Science* **274**, 2060-2063.

Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.-P. und Pugin, A. (1995). Involvement of free calcium in action of cryptogein, a proteinaceous elicitor of hypersensitive reaction in tobacco cells, *Plant Physiol.* **109**, 1025-1031.

Thomas, C. M., Jones, D. A., Parniske, M., Harrison, K., Balint-Kurti, J.-P., Hatzixanthis, K. und Jones, J. D. G. (1997). Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognitional specificity in *Cf-4* and *Cf-9*. *Plant Cell* **9**, 2209-2224.

Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. und Broekaert, W. F. (1998) Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in Arabidopsis are essential for resistance to distinct pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15107-15111.

Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. und Ishida, I. (1997). The structure and function of a soybean β -glucan-elicitor-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 1029-1034.

Van Blokland, R., Ten Lohuis, M. und Meyer, P. (1997). Condensation of chromatin in transcriptional regions of an inactivated plant transgene: evidence for an active role of transcription in gene silencing. *Mol. Gen. Genet.* **257**, 1-13.

Van den Ackerveken, G. F. J. M., van Kan, J. A. L. und De Wit, P. J. G. M. (1992). Molecular analysis of the avirulence gene *avr9* of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum* supports the gene-for-gene hypothesis. *Plant J.* **2**, 359-366.

Van den Hooven, H. W., Appelman, A. W., Zey, T. De Wit, P. J. G. M. und Verwoort, J. (1999). Folding and conformational analysis of AVR9 peptide elicitors of the fungal tomato pathogen *Cladosporium fulvum*. *Eur. J. Biochem.* **264**, 9-18.

Van Loon, L. C. & van Kammen, A. (1970). Polyacrylamid disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN".II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199-211.

Van West, P., de Jong, A. J., Judelson, H. S., Emons, A. M. C. und Govers, F. (1998). The *ipiO* gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection. *Fun. Genet. Biol.* **23**, 126-138.

Van West, P., Kamoun, S., van't Klooster, J. W. und Govers, F. (1999). Internuclear gene silencing in *Phytophthora infestans*. *Mol. Cell* **3**, 339-348.

Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants – defense and counterdefense. *Science* **292**, 2277-2284.

Vaucheret, H. & Fagard, M. (2001). Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* **17**, 29-36.

Veit, S., Wörle, J. M., Nürnberger, T., Koch, W. und Seitz, H. U. (2001). A pure elicitor (Pa-Nie) from *Pythium aphanidermatum* (Eds) Fitzp. Induces dual defense responses in cultured carrot cells and leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.*, in press.

Vervoort, J. J. M., Berg, A., Vossen, P., Vogelsang, R., Hoogendijk, E. C. M. und De Wit, P. J. G. M. (1997). The race-specific elicitor AVR9 of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum*: a cystin knot protein. Sequence-specific ¹H NMR assignments, secondary structure and global fold of the protein. *FEBS Lett.* **404**, 153-158.

Von Heijne, G. & Abrahmsén, L. (1989). Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244**, 439-446.

Wang, J.-X., Yamamura, H. I., Wang, W. und Roeske, W. R. (1990). The use of the filtration technique in *in vitro* radioligand binding assays for membrane-bound and solubilized receptors. In: *Receptor-Ligand Interactions. A practical Approach*, Hulme, E. C., eds. (IRL Press, Oxford, New York, Tokyo), 213-234.

Wang, Z., Morris, J. C., Drew, M. E. und Englund, P. T. (2000). Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using integratable vector with opposing T7 promoters. *J. Biol. Chem.* **275**, 40174-40179.

Waugh, M., Hraber, P., Weller, J., Wu, Y., Chen, G., Inman, J., Kiphart, D. und Sobral, B. (2000). The *Phytophthora* Genome Initiative Database: informatics and analysis for distributed pathogenomic research. *Nucl. Acid Res.* **28**, 87-90.

Wendehenne, D., Binet, M.-N., Blein, J.-P., Ricci, P. und Pugin, A. (1995). Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membranes. *FEBS Lett.* **374**, 203-207.

Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D. F. und Durner, J. (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.

Wevelsiep, L., Rüpping, E. und Knogge, W. (1993). Stimulation of barley plasmalemma H⁺-ATPase by phytotoxic peptides from the fungal pathogen *Rhynchosporium secalis*. *Plant Physiol.* **101**, 297-301.

Whitham, S., Dimesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. und Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.

Xu, H. & Heath, M. C. (1998). Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell* **10**, 585-598.

- Yang K.-Y.**, Liu Y. und Zhang S. (2001). Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 741-746.
- Yang, Y.**, Shah, J. und Klessig, D. F. (1997). Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes Dev.* **11**, 1621-1639.
- Ye, F.** & Signer, E. R. (1996). RIGS (repeated-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 10881-10886.
- Yu, L. M.** (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4088-4094.
- Zhang, Z.**, Collinge, D. B. und Thordal-Christensen, H. (1995). Germin-like oxalate oxidase, a hydrogen peroxid-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant J.* **8**, 139-145.
- Zhang, Z.** & Klessig, D. F. (1998) The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by *SIPK*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 7225-7230.
- Zhu, Q.**, Maher, E. A., Masoud, S., Dixon, R. A. und Lamb, C. J. (1994). Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *BioTechnology* **12**, 807-812.
- Zimmermann, S.**, Nürnberger, T., Frachisse, J.-M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. und Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a plant Ca^{2+} -permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2751-2755.
- Zimmermann, S.**, Ehrhardt, G., Plesch, G. und Müller-Röber, B. (1999). Ion channels in plant signaling. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 183-203.
- Zinecker, H.** (2001). Reaktive Sauerstoffspezies in der pflanzlichen Pathogenabwehr - Isolierung und Charakterisierung von Genen aus *Petroselinum crispum* L., die für putative NADPH-Oxidasen kodieren. Dissertation an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

7 Anhang

Anhang 1: Sequenzen der für die RACE-Reaktionen verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Bemerkung
eli1	ca(ct)ga(ct)ga(ct)gcigtigticcitt(ct)gcica	abgeleitet aus der Aminosäuresequenz (HDAVVPFA)
eli2	aa(ag)tt(ct)aa(ag)ccica(ag)atica(ct)at	abgeleitet aus der Aminosäuresequenz (KFKPQIH)
eli3	ttcatiggiac(ag)ttigc(ag)tcicc(ag)aa(ag)tc	abgeleitet aus der Aminosäuresequenz (DFGDANVPM)
RACE3-1	agtggatgcaaacggcaataaccag	für Klonierung des 5' Bereichs von NPP1
RACE5-1	ttgatcccatgatgatcagatcctg	für Klonierung des 3' Bereichs von NPP1
UP	ctaatacactactataaaggcaagcagtggttaa-caacgcagagt	Universelles Oligonukleotid aus dem RACE-Kit für die des 5'- und des 3'-Bereiches von NPP1
NUP	aagcagtggttaacaacgcagagt	Universelles inneres Oligonukleotid aus dem RACE-Kit für die des 5'- und des 3'-Bereiches von NPP1 in einer „nested“ PCR
3'Race (3'CDS)	aagcagtggttaacaacgcagagtac(t) _{30n-1n}	Oligonukleotid für die reverse Transkription in der RACE-Reaktion für den 3'-Bereich
5'Race (5'CDS)	(t) _{25n-1n}	Oligonukleotid für die reverse Transkription in der RACE-Reaktion für den 3'-Bereich
SMARTII	aagcagtggttaacaacgcagagtacgcggg	Oligonukleotid für die reverse Transkription in der RACE-Reaktion für den 3'-Bereich

n₁ = a, c, oder g

n = a, c, g oder t

i = Inosin

Anhang 2: Sequenzen der für die Klonierung von NPP1, NPP1-Derivaten und NPP1-Homologen verwendete Oligonukleotide.

Name	Sequenz	Bemerkung
PpexpEcoRI/1	ccccgaattcatgaacgtccttagcttc	für Klonierung des Gesamt-NPP1 in pGEX-5X-1 und pJC40
PpexpEcoRI/2	cgctgaattcgacgtgatctgcacgat	für Klonierung des nativen NPP1 und der partiellen Fragmente XIV und XIX in pGEX-5X-1 und pJC40
PpexpEcoRI/3	ggatgaattcggcaataaccagtggcggt	für Klonierung der partiellen Fragmente V und XIII in pGEX-5X-1
PpexpEcoRI/4	gcatgaattcgactgggagcacgtggtc	für Klonierung des partiellen Fragmentes VII in pGEX-5X-1
PpexpEcoRI/5	gaattcccgttcgccaaccaca	für Klonierung der partiellen Fragmente XV und XVIII in pGEX-5X-1
PpexpEcoRI/6	gaattcgaacagaaggctggtgctc	für Klonierung der partiellen Fragmente XVI und XVII in pGEX-5X-1
PpexpXhoI/1	gaaactcgagctaagcgtagtaagcggt	für Klonierung des NPP1, NPP1 _{<i>p.infestans</i>} , NPP1 _{<i>p.sojae</i>} und der partiellen Fragmente VII und XIII in pGEX-5X-1
PpexpXhoI/2	aactctcgaggtagtcaccttgccact	für Klonierung der partiellen Fragmente V und XI in pGEX-5X-1
PpexpXhoI/3	agacctcgaggtgctcccagctgtggcg	für Klonierung des partiellen Fragmentes IX in pGEX-5X-1
PpexpXhoI/4	ctcgagggttaggaattgccgctc	für Klonierung der partiellen Fragmente XIV, XVI und XVIII in pGEX-5X-1
PpexpXhoI/5	ctcgaggctcgccaagtccgtatt	für Klonierung der partiellen Fragmente XV, XVII und XIX in pGEX-5X-1
PpexpBamHI/2	caacggatccagtagtccacctggcac	für Klonierung des nativen NPP1 in pJC40

Name	Sequenz	Bemerkung
PiexpEcoRI/2	cgcggaattc gatgtgatttcacacgat	für Klonierung des NPP1 _{P.infestans} in pGEX-5X-1
PsexpEcoRI/2	cgtggaattcagcgttatcaaccaacgac	für Klonierung des NPP1 _{P.sojae} in pGEX-5X-1
PAK1	gaattcctcggcgggcaagcctgggg gacgtgatctcgcacgat	zur Einfügung einer spezifischen N-terminal gelegenen Phosphorlierungsstelle in NPP1
PKA2	ggatccaccccaggtgcccgcgagagc gtagtaagcgtt	zur Einfügung einer spezifischen C-terminal gelegenen Phosphorlierungsstelle in NPP1

Anhang 3: Sequenzen der für die *in-vitro*-Mutagenese verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Bemerkung
m1f	ggatcccatcgtatctcgcagtg	Mutagenese des Cys ₅₆
m1re	ggatccgtcagatgtggatctg	Mutagenese des Cys ₅₆
m2f	ggatccaagggctccggatagcgc	Mutagenese des Cys ₈₂
m2re	ggatcccgcactagaggaaccggt	Mutagenese des Cys ₈₂

Anhang 4: Sequenzen der für die automatische Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide

Name	Sequenz	Bemerkung
M13 uni	acgttgtaaacgacgg	für pGEM-T
M13 rev	gataacaatttcacaca	für pGEM-T
T7	gtaatacgaactactatagggc	für pJC40
5'pGEX	gggctggcaagccacgttggtg	für pGEX-5X-1
3'pGEX	ccgggagctgcatgtgtcagagg	für pGEX-5X-1

Anhang 5: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte

Die kursiv dargestellten Bereiche der Aminosäuresequenzen enthalten jeweils den Bereich des rekombinanten Proteins, der sich aus dem Klonierungsvektor ableitet.

Anhang 5a: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte aus GST-Fusionsexpression

Fragment III (NPP1):

*GIPEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCK
GSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPIIAVSPSAH
SGYNIYPPESNTIDGYSKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDA
NVPMKDG NFLTKVGNAYYA**

Fragment V:

*GIPEFGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPTGLGHRHDWEH
VVWVDDIKLDSPIIAVSPSAHSGYNIYPPESNTIDGYSKVDYLERPHRD**

Fragment VII:

*GIPEFDWEHV V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y S S S W V V I N H A L D S T T D A G E T Q D L I M W D Q L T D A A R T A L E N T D F G D A N V P M K D G N F L T K V G N A Y Y A **

Fragment IX:

*GIPEFDVISHDAV V P F A Q P T A T T T E Q K A G V K F K P Q I H I S N G C H P Y P A V D A N G N T S G G L K P T G S S S A G C K G S G Y G S Q V Y G R V A T Y N G V Y A I M Y S W Y F P K D S P V T G L G H R H L E R P H R D **

Fragment XI:

*GIPEFDVISHDAV V P F A Q P T A T T T E Q K A G V K F K P Q I H I S N G C H P Y P A V D A N G N T S G G L K P T G S S S A G C K G S G Y G S Q V Y G R V A T Y N G V Y A I M Y S W Y F P K D S P V T G L G H R H D W E H V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y L E R P H R D **

Fragment XIII:

*GIPEFGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEH V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y S S S W V V I N H A L D S T T D A G E T Q D L I M W D Q L T D A A R T A L E N T D F G D A N V P M K D G N F L T K V G N A Y Y A **

Fragment XIV:

*GIPEFDVISHDAV V P F A Q P T A T T T E Q K A G V K F K P Q I H I S N G C H P Y P A V D A N G N T S G G L K P T G S S S A G C K G S G Y G S Q V Y G R V A T Y N G V Y A I M Y S W Y F P K D S P V T G L G H R H D W E H V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y S S S W V V I N H A L D S T T D A G E T Q D L I M W D Q L T D A A R T A L E N T D F G D A N V P M K D G N F L T L E R P H R D **

Fragment XV:

*GIPEFPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVY GRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHV V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y S S S W V V I N H A L D S T T D A G E T Q D L I M W D Q L T D A A R T A L E N T D F G D L E R P H R D **

Fragment XVI:

*GIPEFEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGV YAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHV V V V W V D D I K L D S P S I I A V S P S A H S G Y N I Y P P E S N T I D G Y S A K V D Y S S S W V V I N H A L D S T T D A G E T Q D L I M W D Q L T D A A R T A L E N T D F G D A N V P M K D G N F L T L E R P H R D **

Fragment XVII:

*GIPEFEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGV
YAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSAHSGYNIYYPESNTIDGYSAK
VDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDLERPHRD**

Fragment XVIII:

*GIPEFPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCKGSGYGSQVY
GRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSAHSGYNIYYPPE
SNTIDGYSAKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDANVPMKDGNF
LTLERPHRD**

Fragment XIX:

*GIPEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCK
GSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSAH
SGYNIYYPESNTIDGYSAKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDL
ERPHRD**

Fragment NPP1-M1 (C56→S56):

*GIPEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGSHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGCK
GSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSAH
SGYNIYYPESNTIDGYSAKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDA
NVPMKDG NFLTKVGNAYYA**

Fragment NPP1-M2 (C82→S82):

*GIPEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGSK
GSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSAH
SGYNIYYPESNTIDGYSAKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGDA
NVPMKDG NFLTKVGNAYYA**

NPP1 *P. infestans*:

*GIPEFDVISHDAVIPFAQPTTTTTTEQKAGIKFKPQIHISNGCHPYPAVDADGNTSGGLNPTGSSSAGCKG
SGYGSQIYGRVATYNGVFAIMYSWYFPKDSPLTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLNSPSVIAVSPSAHSG
YNIYHPESNTIDGYSTKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQNLIMWDQLTDAARTALENTDFGDANV
PMKDG NFLTKVGNAYYA**

NPP1 *P. sojae*:

*GIPEFSVINHDQVVPFTQPTPTTALQQA AVKYKPKQIHISNGCHPYPAVDNNGNTSGGLNPTGSESAGCK
GSGYGTQIYGRAVKYQGVYAFMYSWYMPKDETLTGLGHRHDWEACVVWVDDIAASSPKIVALSA*

HSGYNKYYPSSSYFSGNSAKIDYSSSYVVINHALSATSTAGETQPLIMWDQLTDAARRALEDTDFGDA
 NVPFKDANFQTKLGNAYYA*

Anhang 5b: Aminosäuresequenzen der Expressionsprodukte aus His₁₀-Fusionsexpression

Fragment IV (NPP1):

*RHMKLEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNGCHPYPAVDANGNTSGGLKTGSSSAGC
 KGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDKLDSPSIIAVSPSA
 HSGYNIYYPESNTIDGYSKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGD
 ANVPMKDG NFLTKVGNAYYA**

NPP1-PKA1 (die spezifische Phosphorylierungsstelle ist fett dargestellt):

*RHMKLEF**LRRASLG**DVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNCHPYPAVDANGNTSGGLKP
 TGSSSAGCKGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSP
 SIIAVSPSAHSGYNIYYPESNTIDGYSKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAART
 LENTDFGDANVPMKDG NFLTKVGNAYYA**

NPP1-PKA2 (die spezifische Phosphorylierungsstelle ist fett dargestellt) :

*RHMKLEFDVISHDAVVPFAQPTATTTEQKAGVKFKPQIHISNCHPYPAVDANGNTSGGLKPTGSSSAGC
 KGSGYGSQVYGRVATYNGVYAIMYSWYFPKDSPVTGLGHRHDWEHVVVWVDDIKLDSPSIIAVSPSA
 HSGYNIYYPESNTIDGYSKVDYSSSWVINHALDSTTDAGETQDLIMWDQLTDAARTALENTDFGD
 ANVPMKDG NFLTKVGNAYY**ALRRASLG****

Lebenslauf

Zur Person

Name Annette Romanski, geb. Zunker
Geboren am 17.05.1974
Geburtsort Eberswalde
Nationalität deutsch
Anschrift Lersnerstraße 31
60322 Frankfurt

Ausbildung

1980 - 1990 Besuch der Polytechnische Oberschule in Eberswalde
1990 - 1992 Besuch des Gymnasiums am Reileck in Halle/Saale
1992 - 1997 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
Abschlüsse: Vordiplom 1994
Diplom 1997
1996-1997 Diplomarbeit am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale
Titel: Expressionsklonierung von Peptidrezeptoren
Betreuer: Prof. Dierk Scheel, Dr. T. Nürnberger
1997-2001 Promotion am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale
Betreuer: Prof. Dierk Scheel
während dieser Zeit wissenschaftliche Angestellte
seit Juni 2001 wissenschaftliche Angestellte im Universitätsklinikum
Frankfurt/Main

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder im Sinn entnommen wurden, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat sowie dass sie noch nicht veröffentlicht worden ist.

Frankfurt, im Juli 2001

Annette Romanski

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Mai 2001 in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten im von ihm geleiteten Institut für Pflanzenbiochemie und seine hilfreiche fachliche Unterstützung. Ferner, möchte ich mich für die Möglichkeit zur Teilnahme an Konferenzen und die Begutachtung dieser Dissertation bedanken.

Meine besonderer Dank gilt Dr. Thorsten Nürnberger, der zahlreiche Anregungen zur Bearbeitung des Themas gab. Durch seine ständige Diskussionsbereitschaft haben sich neue Perspektiven für die Arbeit entwickelt. Seine kritischen Kommentare haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. H. U. Seitz (Universität Tübingen) und Herrn Prof. Dr. G.-J. Krauß (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Prof. Dr. Francine Govers und Dr. I. Vijn möchte ich mich für die Unterstützung bei der Transformation von *P. infestans* bedanken. Dr. Birgit Klüsener danke ich für die Hilfe bei den elektrophysiologischen Untersuchungen zur Poren bildenden Aktivität des Elicitors. Prof. Dr. Thomas Boller gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Ethylenmessungen.

Für die gute Atmosphäre und Kooperativität in der Arbeitsgruppe möchte ich mich ganz herzlich bei Frédéric Brunner, Justin Lee, Thorsten Nürnberger, Guido Fellbrich, Magdalena Krzymowska, Yvonne Gäbler, Jutta Elster und Christel Rülke bedanken. Hieran schließt sich der Dank an die Mitarbeiter der gesamten Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie an, die für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Astrid Hunger und Christoph Veß danke ich für die Unterstützung und Ermutigungen vor allem in schwierigen Zeiten. Beatrix Blume, Markus Tschöpe, Astrid Patzlaff, Birgit Kemmerling, Guido Fellbrich, Frédéric Brunner, Christoph Veß, Magdalena Krzymowska und Yvonne Gäbler danke ich für die abwechslungsreichen Badmintonabende, die notwendiger Ausgleich für die wissenschaftliche Arbeit waren.

Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung des Studiums, das Basis für diese Arbeit gewesen ist. Ein herzlicher Dank geht an alle Freunde, Bekannten und die gesamte Familie, die durch ihr Interesse an der Arbeit, aber auch durch vielfältige Unternehmungen immer für neuen Antrieb gesorgt haben.

Thomas danke ich für seine Liebe, die mir auch während einiger Durststrecken viel Kraft gegeben hat.