

**IDENTIFIZIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON  
PAMP-INDUZIERBAREN GENEN IN *PETROSELINUM*  
*CRISPUM* UND *ARABIDOPSIS THALIANA***

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

2007

vorgelegt von  
Yvonne Gäbler

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.2007

Dekan: Prof. Dr. Lars Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Klaus Harter

# INHALTSVERZEICHNIS

ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....	IV
TABELLENVERZEICHNIS .....	V
ABKÜRZUNGEN.....	VI
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ANGEBORENE IMMUNITÄT (INNATE IMMUNITY) DER PFLANZEN.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 PAMP-AUSGELÖSTE IMMUNITÄT.....	3
1.1.1.1 PEP13.....	4
1.1.1.2 NLP <sub>PP</sub> .....	6
1.1.1.3 HRPZ <sub>PSPH</sub> .....	6
1.1.1.4 LPS.....	7
1.1.1.5 FLG22.....	8
1.1.1.6 EF-TU.....	9
1.1.2 EFFEKTORAUSGELÖSTE IMMUNITÄT .....	9
1.1.2.1 PATHOGENE EFFEKTOREN .....	10
1.1.2.1.1 Pathogene Effektoren aus Bakterien .....	10
1.1.2.1.2 Pathogene Effektoren aus Pilzen und Oomyceten.....	10
1.1.2.2 RESISTENZPROTEINE.....	11
1.1.2.3 DIE INDIREKTE ERKENNUNG VON AVR <sub>RPM1</sub> /AVR <sub>B</sub> DURCH RPM1 – EIN MODELLBEISPIEL ..	12
<b>1.2 INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION DER PFLANZLICHEN IMMUNITÄT .....</b>	<b>13</b>
1.2.1 DAS MODELLSYSTEM PEP13 UND PETERSILIE .....	13
1.2.2 DAS MODELLBEISPIEL FLG22 UND <i>ARABIDOPSIS</i> .....	14
<b>1.3 ZIEL DER ARBEIT.....</b>	<b>16</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 MATERIAL.....</b>	<b>17</b>
2.1.1 CHEMIKALIEN, ENZYME, RADIOISOTOPE UND OLIGONUKLEOTIDE .....	17
2.1.2 NÄHRMEDIEN.....	17
2.1.3 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME .....	18
2.1.4 VERWENDETE PLASMIDE.....	18
<b>2.2 METHODEN .....</b>	<b>19</b>
2.2.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN .....	19
2.2.1.1 ANZUCHT VON <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	19
2.2.1.2 ANZUCHT VON PSEUDOMONADEN .....	19
2.2.2 KULTIVIERUNG UND BEHANDLUNG VON PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN .....	19
2.2.2.1 PETERSILIE.....	19
2.2.2.1.1 Kultivierung der Petersiliezellen.....	19
2.2.2.1.2 Zellassay in Petersilie.....	19
2.2.2.2 <i>ARABIDOPSIS</i> .....	20
2.2.2.2.1 Oberflächensterilisation.....	20
2.2.2.2.2 Anzuchtbedingungen.....	20
2.2.3 PHÄNOTYPISCHE ANALYSEN.....	21
2.2.3.1 WURZELLÄNGENASSAY .....	21
2.2.3.2 PATHOGEN-TEST <i>IN PLANTA</i> .....	21
2.2.3.3 ANALYSE DES BAKTERIENWACHSTUMS <i>IN PLANTA</i> .....	21
2.2.4 TRANSFORMATIONEN .....	22
2.2.4.1 TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> .....	22
2.2.4.2 TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN .....	22
2.2.4.2.1 Vorbereitung der Filterplatten.....	22
2.2.4.2.2 Vorbereitung der Goldpartikel und der DNA.....	22

2.2.4.2.3	Die <i>Partikel Inflow Gun (P.I.G.)</i> .....	23
2.2.4.2.4	Konstruktion des pRT100-Vektors – Einbringen des Markergens für Hygromycin .....	23
2.2.4.2.5	Konstruktion des pCR2.1_HPT_35S-Vektors .....	23
2.2.5	DNA-ANALYTIK .....	24
2.2.5.1	ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZEN .....	24
2.2.5.2	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA .....	24
2.2.5.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN .....	25
2.2.5.4	KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....	25
2.2.5.5	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR) .....	25
2.2.5.6	GENOTYPISIERUNG .....	25
2.2.5.7	ELUTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN .....	26
2.2.5.8	<i>SOUTHERN</i> -TRANSFER .....	26
2.2.5.9	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....	26
2.2.5.10	RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG .....	26
2.2.5.11	SEQUENZIERUNG VON DNA .....	27
2.2.5.11.1	Nichtradioaktive, automatisierte Sequenzierung .....	27
2.2.5.11.2	Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung .....	27
2.2.6	RNA-ANALYTIK .....	27
2.2.6.1	RNA-ISOLIERUNG .....	27
2.2.6.2	RT-PCR .....	27
2.2.7	AGAROSEGELELEKTROPHORESE .....	28
2.2.7.1	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN .....	28
2.2.7.2	DENATURIERENDE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE .....	28
2.2.8	CDNA-AFLP ( <i>AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM</i> ) .....	28
2.2.8.1	GESAMT- UND M-RNA-ISOLATION .....	29
2.2.8.2	CDNA-SYNTHESE .....	29
2.2.8.3	RESTRIKTIONSVERDAU UND ADAPTERLIGATION .....	29
2.2.8.4	PRÄAMPLIFIKATION .....	29
2.2.8.5	RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER <i>APOI+2</i> -PRIMER .....	30
2.2.8.6	SELEKTIVE AMPLIFIKATION .....	30
2.2.8.7	SEQUENZIER-GELELEKTROPHORESE .....	30
2.2.8.8	KLONIERUNG VON AFLP-FRAGMENTEN .....	30
2.2.9	MACROARRAY .....	31
2.2.9.1	PRÄPARATION DER SONDE .....	31
2.2.9.2	AUSWERTUNG DER DATEN .....	32
2.2.10	RACE ( <i>RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS</i> ) .....	32
2.2.11	AFFYMETRIX- <i>MICROARRAY</i> .....	33
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>IDENTIFIZIERUNG PAMP-INDUZIERBARER GENE IN PETERSILIEZELLKULTUREN .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	CDNA-AFLP-ANALYSE .....	34
3.1.2	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	35
3.1.3	AUSWAHL UND CHARAKTERISIERUNG DER KANDIDATENGENE .....	37
3.1.3.1	AUSWAHLKRITERIEN .....	38
3.1.3.2	ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS DURCH <i>MACROARRAYS</i> .....	40
3.1.3.3	ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS MITTELS RT-PCR .....	41
3.1.3.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	42
3.1.4	<i>RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS</i> (RACE) .....	44
3.1.5	STABILE TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN .....	45
<b>3.2</b>	<b>VERGLEICHENDE ANALYSE VON PAMP-INDUZIERTEN GENEN IN PETERSILIE UND</b>	
	<b><i>ARABIDOPSIS</i> .....</b>	<b>47</b>
3.2.1	VERGLEICH DER <i>MICROARRAY</i> -DATEN VON <i>ARABIDOPSIS</i> -PFLANZEN UND	
	PROTOPLASTEN .....	47
3.2.2	VERGLEICH DER PAMP-INDUZIERTEN GENEXPRESSION IN PETERSILIE UND	
	<i>ARABIDOPSIS</i> .....	52

3.2.3	UNTERSUCHUNG EINER POTENTIELLEN PAMP-AKTIVITÄT VON PEP13 IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	53
3.2.4	AUSWAHLKRITERIEN FÜR GENE ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	56
<b>3.3</b>	<b>FUNKTIONELLE ANALYSE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....</b>	<b>57</b>
3.3.1	UNTERSUCHUNGEN ZUM IMP .....	58
3.3.1.1	EXPRESSIONSANALYSEN DES <i>IMP</i> .....	58
3.3.1.2	ANALYSE VON T-DNA-INSERTIONSLINIEN DES <i>IMP</i> .....	60
3.3.1.3	PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG .....	61
3.3.1.3.1	Bakterienwachstumstest mit Pseudomonaden.....	61
3.3.1.3.2	Einfluss von Pseudomonaden auf die Expression typischer Markergene .....	62
3.3.1.3.3	Einfluss von abiotischen Stressoren auf das Wurzelwachstum .....	64
3.3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR LRR-RLK .....	65
3.3.2.1	EINFÜHRENDE INFORMATION ZUM PHYTOSULFOKINREZEPTOR .....	65
3.3.2.2	<i>MICROARRAY</i> -EXPRESSIONSANALYSEN DES <i>ATPSKR1</i> NACH PAMP- BZW. PATHOGENBEHANDLUNG .....	66
3.3.2.3	GENOTYPISIERUNG DER T-DNA-INSERTIONSLINIEN .....	67
3.3.2.4	NACHWEIS DER GENINAKTIVIERUNG MITTELS RT-PCR.....	68
3.3.2.5	PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG .....	69
3.3.2.5.1	Lichteinfluss auf das Pflanzenwachstum.....	69
3.3.2.5.2	Einfluss von Salzstress auf das Wurzelwachstum .....	70
3.3.2.5.3	Bakterienwachstumstest mit <i>Pst</i> DC3000 .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1	STRATEGIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DIFFERENZIELL EXPRIMIERTER GENE .....	73
4.2	IDENTIFIZIERUNG PAMP-REGULIERTER GENE IN <i>PETROSELINUM CRISPUM</i> MITTELS CDNA-AFLP.....	74
4.3	VERGLEICHENDE ANALYSE PAMP-INDUZIERBARER GENE IN <i>ARABIDOPSIS</i> -PFLANZEN UND -PROTOPLASTEN .....	76
4.4	KONSERVIERTE SIGNALWEGE IN DER PAMP-AUSGELÖSTEN IMMUNITÄT IN PETERSILIE UND <i>ARABIDOPSIS</i> .....	77
4.5	TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN MITTELS PARTIKELBESCHUSS .....	80
4.6	CHARAKTERISIERUNG PAMP-INDUZIERBARER GENE IN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> .....	81
4.6.1	CHARAKTERISIERUNG DES INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS .....	81
4.6.1.1	ANALYSE DER <i>IMP</i> -EXPRESSION .....	82
4.6.1.2	PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG EINER <i>IMP</i> -DEFIZIENTEN <i>ARABIDOPSIS</i> -LINIE.....	83
4.6.2	CHARAKTERISIERUNG DES PHYTOSULFOKINREZEPTORS .....	85
4.6.2.1	ALLGEMEINE INFORMATION ZUM PHYTOSULFOKINREZEPTOR.....	85
4.6.2.2	ANALYSE DER <i>ATPSKR1</i> -EXPRESSION .....	86
4.6.2.3	CHARAKTERISIERUNG DER <i>ATPSKR1</i> MUTATIONSLINIEN .....	86
4.6.2.4	DIE PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG <i>ATPSKR1</i> -DEFIZIENTER/VERRINGERTER LINIEN .....	87
4.6.2.4.1	Entwicklungsphänotypen .....	87
4.6.2.4.2	Pathogenphänotypen .....	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>I</b>
	ANHANG A: PRIMER FÜR DIE CDNA-AFLP-ANALYSE .....	I
	ANHANG B: WEITERE VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE .....	II
	ANHANG C: SEQUENZEN UND SEQUENZVERGLEICHE DES <i>IMP</i> UND DES <i>ATPSKR1</i> .....	VII
	ANHANG D: TABELLEN.....	XII

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1:	Vier-Phasen-, „Zickzack“-Modell der pflanzlichen Immunantwort. ....	3
Abbildung 1.2:	Indirekte Pathogenerkennung durch Überwachung von Effektorzielen. ....	12
Abbildung 1.3:	Modell der Pep13-induzierten Signaltransduktion in Petersilie. ....	14
Abbildung 1.4:	Modell für die Flagellin-Signalweitergabe in <i>Arabidopsis</i> . ....	15
Abbildung 2.1:	Lokalisierung von T-DNA und Primern für die Genotypisierung. ....	26
Abbildung 2.2:	Schema zur Belegung der Nylonmembran. ....	31
Abbildung 3.1:	cDNA-AFLP-Analyse PAMP-induzierter Genexpression in Petersilie. ....	34
Abbildung 3.2:	Klassifizierung der beim cDNA-AFLP identifizierten DNA-Sequenzen. ....	36
Abbildung 3.3:	Induktion der cDNA-AFLP-Fragmente pc1 bis pc250 durch Pep13 und HrpZ <sub>PspH</sub> . ....	37
Abbildung 3.4:	Induktion der cDNA-AFLP-Fragmente pc251 bis pc837. ....	37
Abbildung 3.5:	Verifikation der in cDNA-AFLP-Analysen beobachteten Induktion der Genexpression durch <i>Macroarray</i> -Analysen. ....	40
Abbildung 3.6:	RT-PCR-Experimente zur Überprüfung der Genexpression. ....	42
Abbildung 3.7:	Schema für die Herstellung der <i>sense</i> - und <i>antisense</i> -Konstrukte. ....	46
Abbildung 3.8:	PAMP-induzierte Genexpression in <i>A. thaliana</i> -Pflanzen. ....	47
Abbildung 3.9:	PAMP-induzierte Genexpression in <i>Arabidopsis</i> -Protoplasten. ....	48
Abbildung 3.10:	Vergleich der durch Pep13 und weiterer PAMPs hervorgerufenen Induktion der Genexpression in <i>Arabidopsis</i> . ....	54
Abbildung 3.11:	Analyse von Pep13-Reaktionen in <i>Arabidopsis</i> . ....	55
Abbildung 3.12:	Expressionsanalysen des <i>IMP</i> nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren. ....	58
Abbildung 3.13:	Expressionsanalysen des <i>IMP</i> nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen. ....	59
Abbildung 3.14:	Genstruktur und Lage der T-DNA-Insertionen im <i>IMP</i> -Gen. ....	60
Abbildung 3.15:	PCR-Analyse zur Genotypisierung (A.) und zum Nachweis der Geninaktivierung (B.). ....	61
Abbildung 3.16:	Bakterienwachstumsversuche in <i>imp1-1</i> -Linien nach Infiltration von <i>Pst hrcC</i> und <i>PspH</i> . ....	62
Abbildung 3.17:	Markergenexpression in <i>imp1-1</i> -Linien nach Behandlung von <i>Arabidopsis</i> -Blättern mit verschiedenen Pseudomonaden. ....	63
Abbildung 3.18:	Wurzellängenexperimente in <i>imp1-1</i> - und WT-Linien. ....	64
Abbildung 3.19:	Gen- und Proteinmodell des AtPKSR1. ....	65
Abbildung 3.20:	Expressionsanalysen für <i>AtPSKR1</i> nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren. ....	66
Abbildung 3.21:	Expressionsanalysen des <i>AtPSKR1</i> nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen. ....	67
Abbildung 3.22:	PCR-Analyse zum Nachweis der Geninaktivierung des <i>AtPSKR1</i> . ....	68
Abbildung 3.23:	Phänotypen von Pflanzen mit T-DNA-Insertion und WT-Pflanzen nach fünf Wochen. ....	70
Abbildung 3.24:	Wurzellängenexperimente in <i>pskr1</i> - und WT-Linien. ....	71
Abbildung 3.25:	Bakterienwachstumsversuche in <i>pskr1-3</i> - (A) und <i>pskr1-4</i> - Linien (B) nach Infiltration von <i>Pst</i> DC3000. ....	72
Abbildung 7.1:	Genomische Sequenz des <i>IMP</i> Gens. ....	vii
Abbildung 7.2:	CLUSTAL-W Sequenzvergleich des <i>IMP</i> und des nächsten Verwandten At2g39518. ....	viii
Abbildung 7.3:	Proteinsequenzvergleich möglicher homologer Proteine des <i>IMP</i> . ....	viii
Abbildung 7.4:	Genomische Sequenz des <i>AtPSKR1</i> Gens. ....	x
Abbildung 7.5:	<i>AtPSKR1</i> kodiert eine LRR-Rezeptorkinase. ....	xi

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1-1:	Ausgewählte pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMPs), die durch Pflanzen wahrgenommen werden.....	5
Tabelle 2-1:	Zusammensetzung häufig verwendeter Nährmedien.....	17
Tabelle 2-2:	Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien .....	18
Tabelle 2-3:	Verwendete Bakterienstämme .....	18
Tabelle 2-4:	Verwendete Plasmide .....	18
Tabelle 2-5:	Verwendete T-DNA-Insertionslinien .....	20
Tabelle 3-1:	Zusammenfassung der cDNA-AFLP-Analyse.....	36
Tabelle 3-2:	Ausgewählte Kandidatengene.....	38
Tabelle 3-3:	Zusammenstellung der RACE-Experimente.....	44
Tabelle 3-4:	Auflistung der Gene, deren Expression nach 1 h PAMP-Behandlung in <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen und -Protoplasten durch alle vier PAMPs induziert war.....	49
Tabelle 3-5:	PAMP-induzierte Expression von Genen, deren kodierte Proteine bekannte oder mögliche Rollen in immunitätsbezogener Signalaufnahme, Signalweiterleitung, Pathogenabwehr und im Hormonmetabolismus in <i>Arabidopsis</i> zeigen.....	50
Tabelle 3-6:	Vergleich der Genexpression nach PAMP-Behandlung in Petersilie und <i>Arabidopsis</i> .....	53
Tabelle 3-7:	Status der T-DNA-Insertionslinien.....	57
Tabelle 3-8:	Einfluss von Salz auf die Expression des <i>AtPSKRI</i> .....	70
Tabelle 7-1:	Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide für die RT-PCRs in Petersilie.....	ii
Tabelle 7-2:	Zusammenstellung der verwendeten RACE-Oligonukleotide in Petersilie.....	iv
Tabelle 7-3:	Zusammenstellung weiterer verwendeter Oligonukleotide in Petersilie.....	v
Tabelle 7-4:	Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide für Genotypisierungen oder RT-PCRs in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	vi
Tabelle 7-5:	Liste aller cDNA-AFLP-Klone.....	xii

## ABKÜRZUNGEN

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	NBS	Nukleotidbindestelle
AFLP	Amplifizierter Fragmentlängenpolymorphismus ( <i>amplified fragment length polymorphism</i> )	Nep1	<i>necrosis-inducing protein 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat	NLP <sub>pp</sub>	<i>Nep1-like protein</i> (aus <i>Phytophthora parasitica</i> )
AS	Aminosäure	NO	Stickstoffmonoxid
as	<i>antisense</i>	NPP1	nekroseninduzierendes <i>Phytophthora</i> Protein 1
Avr/avr	Avirulenz	N-Terminus	Amino-Terminus eines Proteins
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	OD	Optische Dichte
bp	Basenpaar(e)	ORF	Offenes Leseraster
BSA	Rinderserumalbumin	PAA	Polyacrylamid
bzw.	beziehungsweise	PAGE	PAA-Gelelektrophorese
CC	<i>coiled coil</i>	PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
CD	<i>Circular Dichroism</i>	PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
cDNA	komplementäre DNA	PCR	Polymerasekettenreaktion
cfu	Kolonie-bildende Einheiten	PEG	Polyethylenglykol
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>	Pep13	Elicitoraktives Peptid mit der Sequenz VWNQPVRGFKVYE
cRNA	komplementäre RNA	PR	<i>pathogenesis-related</i>
C-Terminus	Carboxyl-Terminus eines Proteins	PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pv.	Pathovar
DNase	Desoxyribonuklease	R	Resistenz
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat	RACE	<i>Rapid Amplification of cDNA Ends</i>
DTT	Dithiotreithol	RLK	<i>receptor-like kinase</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	RNA	Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat	RNase	Ribonuklease
elf18	Elicitoraktives Peptid aus EF-Tu mit der Sequenz SKEKFERTKPHVNVGTIG	ROS	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<i>et al.</i>	und andere (et alteri)	rpm	Umdrehungen pro Minute
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>	RT	Raumtemperatur
ETS	<i>Effector-triggered susceptibility</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
flg22	Elicitoraktives Peptid aus Flagellin mit der Sequenz QRLSTGSRINSKDDAAGLQIA	s	Sekunde(n)
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )	s	<i>sense</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>	SAR	Systemisch erworbene Resistenz ( <i>systemic acquired resistance</i> )
h	Stunde(n)	SDS	Natriumdodecylsulfat
HR	Hypersensitive Reaktion	T2SS	Typ II-Sekretionssystem
HRP	Hypersensitive Reaktion und Pathogenität	T4SS	Typ IV-Sekretionssystem
HrpZ <sub>psph</sub>	Harpin (ein Genprodukt von <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i> )	T-DNA	Transfer-DNA
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid	TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
kb	Kilobasen	TGase	Transglutaminase
kDa	Kilodalton	TIR	Toll-Interleukin-1-Rezeptordomäne
LB	Luria - Bertani	TLR	<i>Toll-like receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharid	Tris	N-Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
LRR	Leucinreiche Domänen	TTSS/T3SS	Typ III-Sekretionssystem
MAMP	<i>microbe-associated molecular pattern</i>	U	Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	u. a.	unter anderem
MES	2-[N-Morpholino]ethansulfonsäure	UV	Ultraviolett
min	Minute(n)	v/v	Volumen pro Volumen
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-RNA)	w/v	Gewicht pro Volumen
MS	Murrashige/Skoog	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galaktosid zum Beispiel
NAD(P)H	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(Phosphat), reduziert	z. B.	

# **1 EINLEITUNG**

Pflanzen sind eine reiche Quelle an Nährstoffen für Mikroorganismen und werden deshalb von vielen bakteriellen Pathogenen der Proteobakterien und Actinobakterien infiziert. Die am häufigsten untersuchten Bakterien sind Mitglieder des Stammes der Proteobakterien wie *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* und *Xanthomonas* (Genin and Boucher, 2004; Nino-Liu *et al.*, 2006; Preston, 2000; Van Sluys *et al.*, 2002). Diese Pathogene werden durch Wind, Regen oder Insekten übertragen. Sie gelangen entweder über Wunden oder durch natürliche Öffnungen wie Lentizellen, Hydathoden oder Spaltöffnungen (Agrios, 1997) in pflanzliches Gewebe und besiedeln die Interzellularräume der verschiedensten Pflanzengewebe oder des Xylems. Pilzliche Pathogene können hingegen direkt in pflanzliche Epidermiszellen eindringen oder ihre Hyphen durch inter- und intrazelluläres Mycelwachstum verlängern. Krankheitserregende und symbiotische Pilze und Oomyceten bilden häufig spezialisierte Ernährungsorgane aus, sogenannte Haustorien, die zwar nicht in die Pflanzenzelle eindringen, aber von der Plasmamembran der Wirtszelle umhüllt sind. Um ihre Überlebenschancen zu erhöhen, geben viele pathogene Organismen Effektormoleküle (Virulenzfaktoren) in die Pflanzenzelle oder den Zellzwischenraum ab (Jones and Dangl, 2006), wodurch die Wirtspflanze indessen zerstört werden kann. Das hat zur Folge, dass durch verschiedene Krankheiten mit ernsthaften wirtschaftlichen, sozialen und politischen Konsequenzen gerechnet werden muss (Brown, 2001; Strange and Scott, 2005). Die Kontrolle von bakteriellen Krankheiten ist nur teilweise effektiv und besteht zurzeit aus kupferbasierten Sprühmitteln, Antibiotika, Biokontrollstrategien, groß angelegter Entfernung von infizierten Pflanzen und - möglicherweise von besonderer Bedeutung - wirtsgenetischer Resistenz (Agrios, 1997). Daher kann die Forschung an bakteriellen Krankheiten von Pflanzen helfen, grundlegende Aspekte der mikrobiellen Pathogenese und der damit verbundenen Wirtsreaktionen aufzuklären und wirkungsvollere und nachhaltigere Krankheitsbekämpfungsmethoden zu entwickeln (Abramovitch *et al.*, 2006).

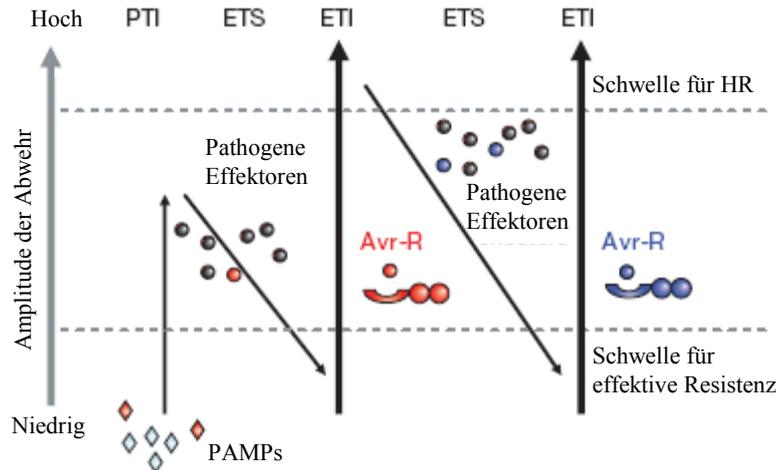
Obwohl durch Phytopathogene ausgelöste Erkrankungen sehr verheerend sein können, ist der Befall der Pflanze eher die Ausnahme als die Regel. Pflanzen wie auch andere höhere Lebewesen sind im Allgemeinen gegenüber Mikroorganismen widerstandsfähig. Sie besitzen komplexe „angeborene“ Mechanismen, um einen Angriff von Pathogenen zu erkennen und ihm entgegenzuwirken. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass bemerkenswerte Ähnlichkeiten in den Abwehrsystemen von Pflanzen, Tieren und Insekten existieren (Ausubel, 2005; Nürnberger and Brunner, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; Zipfel and Felix, 2005). Es gibt jedoch auch bedeutsame Unterschiede. Nürnberger *et al.* (2004) beschreiben, dass sich das Immunsystem der Vertebraten aus einer angeborenen und einer erworbenen Immunität zusammensetzt, wobei beide gemeinsam dazu beitragen, den Wirt vor einem mikrobiellen Angriff zu schützen (McGuinness *et al.*, 2003; Medzhitov and Janeway, 2002). Bei Säugetieren ist ein funktionelles angeborenes Immunsystem dabei die Voraussetzung für die Aktivierung der erworbenen Immunität, die durch T- und B-Lymphozyten ausgeführt wird. Solch ein klonales System der erworbenen Immunität, das durch die Bildung von antigenspezifischen Rezeptoren durch somatische Rekombination in reifenden Lymphozyten charakterisiert ist, besteht in Pflanzen nicht. Außerdem gibt es in Pflanzen keine spezialisierten Zelltypen (Makrophagen, Neutrophile, dendritische Zellen), die als Bestandteile des zirkulierenden Blutsystems Schlüsselemente des tierischen Immunsystems sind. Im Gegensatz dazu sind Pflanzen fähig, die Gegenwart von mikro-

biellen Fremdkörpern zu erkennen und Abwehrreaktionen auf der Ebene jeder einzelnen Zelle zu aktivieren (Nürnberger *et al.*, 2004).

### 1.1 ANGEBORENE IMMUNITÄT (*INNATE IMMUNITY*) DER PFLANZEN

Pflanzen besitzen eine allgemeine Basisresistenz (Arten- oder Nichtwirtsresistenz, Basisinkompatibilität) (Hammond-Kosack and Jones, 2000; Heath, 2000), die auf konstitutiven Barrieren und induzierbaren Reaktionen beruht. Zu den konstitutiven Mechanismen, denen sich ein Pathogen beim Angriff stellen muss, gehören die äußere Wachsschicht (Kutikula) der Blätter, die pflanzliche Zellwand und stetig vorhandene sekundäre Metabolite, die als antimikrobielle Verbindungen wirken können. Beispiele dafür sind Saponine (glykosylierte Triterpenoid- oder Steroidoleküle mit antimykotischer Aktivität), Phenole, zyanogene Glykoside und Laktone (Osborn, 1996; Papadopoulou *et al.*, 1999). Eine besondere Form der vorgeformten Abwehr ist das Pflanzenzytoskelett, das mit seinen Aktinfilamenten eine physikalische Barriere für das Eindringen von Pilzen darstellt (Kobayashi *et al.*, 1997; Yun *et al.*, 2003).

Die Erkenntnisse der letzten Jahre weisen deutlich darauf hin, dass zwei evolutionär verknüpfte Formen des induzierbaren pflanzlichen Immunsystems existieren. Diese wurden von Jones und Dangl (2006) in einem „Vier-Phasen-Zickzack-Modell“ zusammengefasst (siehe Abbildung 1.1). In der evolutionär ältesten Form der Immunität (Phase 1) werden pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMPs; *pathogen-associated molecular patterns*) durch membranständige Strukturerkennungsrezeptoren (PRR, *pattern recognition receptors*) erkannt. Daraus resultiert eine PAMP- ausgelöste Immunität (*PAMP-triggered immunity*, PTI), die eine weitere Kolonisation der Mikroorganismen aufhalten kann. Solche PAMP-induzierten Immunreaktionen sind für die Nichtwirtsresistenz entscheidend und tragen ferner zur Basisresistenz von Wirtspflanzen bei (He *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005a; Zipfel *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2004). In Phase 2 kommt es durch von erfolgreichen Pathogenen entwickelten Effektoren, die zur Virulenz des Pathogens beitragen, zu einer effektorausgelösten Empfänglichkeit (*effector-triggered susceptibility*, ETS). In Phase 3 kann ein diese Empfänglichkeit auslösender Effektor des Pathogens spezifisch durch ein pflanzliches Resistenzprotein (R-Protein) erkannt werden, woraus sich eine effektorausgelöste Immunität (*effector-triggered immunity*, ETI) ergibt. Kultivarspezifische Wirtsresistenz oder Gen-für-Genresistenz sind Synonyme für ETI (Ausubel, 2005; Chisholm *et al.*, 2006). Die Erkennung eines Effektors erfolgt dabei entweder indirekt (*Guard*-Hypothese, siehe Kapitel 1.1.2.3) oder direkt (siehe Kapitel 1.1.2.2). ETI ist möglicherweise eine beschleunigte und verstärkte PTI-Reaktion, die in Krankheitsresistenz und gewöhnlich in einer hypersensitiven Zelltodreaktion (HR) an der Infektionsstelle gipfelt. Durch natürliche Selektion gelang es Pathogenen, die erkannten Effektormoleküle zu verändern oder zusätzliche Effektoren auszubilden und so in Phase 4 die ETI zu unterdrücken. Diesem Selektionsdruck folgend entwickelten Pflanzen daraufhin neue R-Spezifitäten, so dass ETI wiederum ausgelöst werden konnte (Jones and Dangl, 2006). In den folgenden Kapiteln (1.1.1 und 1.1.2) werden PTI und ETI näher erläutert.



**Abbildung 1.1: Vier-Phasen-, „Zickzack“-Modell der pflanzlichen Immunantwort.**

In Phase 1 erkennen Pflanzen durch PRRs mikrobe/pathogenassoziierte molekulare Strukturen (MAMPs/PAMPs, rote Rhomben) und lösen PTI aus. In Phase 2 schleusen erfolgreiche Pathogene Effektoren in die pflanzliche Zelle ein, die PTI stören und in ETS resultiert. In Phase 3 wird ein Effektor (in rot dargestellt) durch ein Resistenzprotein erkannt, wodurch ETI aktiviert wird. In Phase 4 überleben Pathogene, die den roten Effektor verloren haben und vielleicht neue Effektoren (blau) durch horizontalen Gentransfer erlangt haben, die wiederum ETI unterdrücken können. Durch Selektion werden die Pflanzen bevorzugt, die neue Allele der Resistenzgene ausgebildet haben, die einen der neu erworbenen Effektoren erkennen können und sich somit ETI ergibt. Erklärung der Abkürzungen siehe Text. Modifiziert nach Jones und Dangl (2006).

### 1.1.1 PAMP-AUSGELÖSTE IMMUNITÄT

PAMP-ausgelöste Immunität (PTI) ist wahrscheinlich die erste aktive Reaktion der Pflanze auf die Wahrnehmung von Mikroben (Chisholm *et al.*, 2006). PTI wird durch die Erkennung von konservierten mikrobiellen Strukturen durch pflanzliche Zelloberflächenrezeptoren eingeleitet. Die Induktion von PTI ist mit veränderten Ionenströmen, der Signalübertragung durch mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPKs), der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und der Kalloseauflagerung verbunden, was zur Unterbindung des mikrobiellen Wachstums beiträgt (Nürnberger *et al.*, 2004).

Der Begriff pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) konnte aus dem Bereich des tierischen Immunsystems nach einem Modell von Medzhitov und Janeway übernommen werden (Medzhitov and Janeway, 1997). PAMPs stellen hoch konservierte Determinanten von Pathogenklassen dar, die nicht in potentiellen Wirtsorganismen auftreten, jedoch unentbehrlich für das Überleben der Pathogene sind (Nürnberger and Lipka, 2005). Sie binden an PAMP-Rezeptoren, die daraufhin unter anderem die Expression von Abwehrgenen und die Produktion antimikrobieller Substanzen induzieren (Aderem and Ulevitch, 2000; McGuinness *et al.*, 2003; Medzhitov and Janeway, 2002; Zasloff, 2002). Obwohl sie als pathogenassoziiert bezeichnet werden, existieren sie nicht ausschließlich in Pathogenen, sondern sind eher charakteristisch für eine ganze Klasse von Mikroorganismen im Allgemeinen. Deshalb sollten sie eher mikrobeassoziierte molekulare Strukturen (*microbe-associated molecular patterns*, MAMPs) genannt werden (Ausubel, 2005). In dieser Arbeit wird aber weiterhin der besser etablierte Begriff PAMP verwendet.

PAMPs, die Reaktionen der angeborenen Immunität in verschiedenen Wirbel- und wirbellosen Tieren auslösen, schließen den Lipopolysaccharid(LPS)-Anteil Gram-negativer Bakterien, Peptido-

glykane Gram-positiver Bakterien, eubakterielles Flagellin, methylierte bakterielle DNA-Fragmente und Glykane, Chitine und Proteine pilzlicher Zellwände ein (Nürnberger *et al.*, 2004). Erstaunlicherweise sind viele dieser Moleküle schon lange dafür bekannt, dass sie in den verschiedensten Pflanzenarten als generelle Elicitoren von Abwehrreaktionen fungieren (Boller, 1995; Montesano *et al.*, 2003; Nürnberger and Lipka, 2005; Vorwerk *et al.*, 2004). Wie aus Tabelle 1.1 ersichtlich ist, gehören zu diesen generellen Elicitoren oder PAMPs exogene Moleküle wie (Poly-)Peptide (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Nennstiel *et al.*, 1998), Oligosaccharide (Ito *et al.*, 1997; Kaku *et al.*, 2006; Klarzynski *et al.*, 2003), (Glyko-)Proteine und Lipide (Boller, 1995; Dow *et al.*, 2000; Nürnberger, 1999). Auch endogene Komponenten aus der pflanzlichen Zellwand, die durch Glukanasen und Chitinasen der Pathogene freigesetzt werden, können als Elicitoren wirken (Boller, 1995; Ebel and Scheel, 1997). Es ist daher nahe liegend, dass Pflanzen wie zahlreiche andere Eukaryoten ein Erkennungssystem für „Nicht-Selbst“ oder „Falsches-Selbst“ entwickelt haben, welches intrazelluläre Signalkaskaden initiiert und letztendlich zur Aktivierung von schützenden Maßnahmen führt.

Zu den am besten untersuchten generellen Elicitoren oder PAMPs in Pflanzen zählen unter anderem ein 13 Aminosäuren umfassendes Fragment der GP42-Transglutaminase aus *Phytophthora sojae* (Pep13), ein *Phytophthora parasitica*-abgeleitetes Nep1-ähnliches Protein (NLP<sub>pp</sub>), Harpin (HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>) aus *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, eine LPS-Präparation von *Pseudomonas aeruginosa* (LPS<sub>pa</sub>), ein 22 Aminosäuren langes Fragment aus bakteriellem Flagellin (flg22) und ein 18 Aminosäuren langer Abschnitt des bakteriellen Elongationsfaktors EF-Tu (elf18) (siehe auch Tabelle 1-1). Auf diese soll im Folgenden etwas näher eingegangen werden.

### 1.1.1.1 PEP13

Die Wechselwirkung von Petersilie (*Petroselinum crispum*) mit dem Oomyceten *Phytophthora sojae* zeigt wesentliche Eigenschaften einer Nichtwirtsresistenz (Jahnen and Hahlbrock, 1988). In einem aus der Zellwand dieses Oomyceten stammenden 42 kDa Glykoprotein konnte ein oberflächenexponiertes 13 Aminosäuren langes Peptid identifiziert werden, das notwendig und hinreichend für die Auslösung komplexer Abwehrreaktionen in Petersiliezellensuspensionskulturen ist (Hahlbrock *et al.*, 1995; Nürnberger *et al.*, 1994). 2002 konnte von Brunner und Mitarbeitern gezeigt werden, dass dieses Glykoprotein eine zellwandassoziierte Ca<sup>2+</sup>-abhängige Transglutaminase (R-Glutaminylpeptidamino- $\gamma$ -Glutamyltransferase, EC 2.3.2.13, TGase) ist und das darin enthaltende Pep13-Motiv in allen untersuchten *Phytophthora*-Arten hoch konserviert vorliegt (Brunner *et al.*, 2002). Mutationsanalysen im Pep13-Motiv offenbarten, dass die gleichen Aminosäurereste, die für die Induktion der Abwehrmechanismen in Petersilie und Kartoffel wichtig sind, auch für die Enzymaktivität der TGase notwendig sind (Brunner *et al.*, 2002);(Nürnberger *et al.*, 1994).

Die Fähigkeit von Pep13, Abwehrreaktionen in Petersilie hervorzurufen, erfordert die Interaktion mit einem 100 kDa-Rezeptor, der in der Plasmamembran von Petersiliezellen vorhanden ist (Nennstiel *et al.*, 1998; Nürnberger *et al.*, 1995). Zu diesen rezeptorvermittelten Abwehrmechanismen gehören die durch charakteristische Ionenströme (H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>- Einstrom; K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> Ausstrom) ausgelöste Depolarisierung der Plasmamembran (Jabs *et al.*, 1997; Nürnberger *et al.*, 1994), die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Jabs *et al.*, 1997), die Expression von vier Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) (Kroj *et al.*, 2003) und abwehrbezogenen Genen einschließlich der *patho*

**Tabelle 1-1: Ausgewählte pathogenassoziierte molekulare Strukturen (PAMPs), die durch Pflanzen wahrgenommen werden.**

PAMP	Aktives Epitop	Untersuchte Pflanzen	Rezeptor	Biologische Antwort	Ref.
<b>Bakterien</b>					
Elongationsfaktor Tu (EF-Tu)	elf18 (acetylierter N-Terminus)	<i>Brassicaceae</i>	EFR (LRR-RLK)	Induktion von Abwehrreaktionen	1,2
Flagellin	flg22 (konservierter Bereich im N-Terminus)	Fast alle Pflanzen (außer Reis)	FLS2 (LRR-RLK)	Induktion von Abwehrreaktionen	3-5
Harpin	Nicht definiert	Verschiedene Pflanzen	Unbekannt	HR-ähnlicher Zelltod, Induktion von Abwehrreaktionen, SAR	6-8
Kälteschockprotein	csp15 (RNP-1 Motiv)	<i>Solanaceae</i>	Unbekannt	<i>oxidative burst</i> , Ethylenbildung	9
Lipopolysaccharide (LPS)	Lipid A?	<i>Arabidopsis</i> , Tabak, Paprika, Petersilie	Unbekannt	<i>oxidative burst</i> , Produktion antimikrobieller Enzyme, Induktion von Abwehrgenen	10-13
Nep1-ähnliche Proteine (NLPs)	Nicht definiert	Viele Dikotyledonen	Unbekannt	HR-ähnlicher Zelltod, Induktion von Abwehrreaktionen	14-16
Peptidoglykan (PGN)	Nicht definiert	Tabak, <i>Arabidopsis</i>	Unbekannt	Induktion von Abwehrreaktionen	9,17
<b>Oomyceten</b>					
Lipidtransferproteine (Elicatine)	Nicht definiert	Tabak	Unbekannt	HR-ähnlicher Zelltod, Induktion von Abwehrreaktionen, SAR	18,19
Nep1-ähnliche Proteine (NLPs)	Nicht definiert	Viele Dikotyledonen	Unbekannt	HR-ähnlicher Zelltod, Induktion von Abwehrreaktionen	20-23
Transglutaminase	Pep13 (oberflächenexponiertes Epitop des Enzyms)	Petersilie, Kartoffel	Unbekannt	Induktion von Abwehrreaktionen	24,25
$\beta$ -Glukane	Verzweigte Hepta- $\beta$ -glukoside	Hülsenfrüchte	GnGBP (lösliches Protein mit 1,3- $\beta$ -Glukanase Aktivität)	Induktion von Abwehrreaktionen	26,27
Zellulosebindender Elicitor Lectin (CBEL)	CBDs (Zellulosebindende Domänen)	Tabak, <i>Arabidopsis</i>	Unbekannt	Induktion von Abwehrreaktionen	28
<b>Pilze</b>					
Cerebroside A, C	Sphingosid als Grundkörper	Reis	Unbekannt	Phytoalexinbildung	29
Chitin	Chitinoligosaccharide (Polymerisationsgrad > 3)	Tomate, <i>Arabidopsis</i> , Reis, Weizen, Gerste	CEBiP	Induktion von Abwehrreaktionen	30-34
Ergosterol	Nicht definiert	Tomate	Unbekannt	Induktion von Ionenströmen	35
Invertase	N-mannosyliertes Peptid (Fragment der Invertase)	Tomate	Unbekannt	Aktivierung des Phenylpropanstoffwechselweges, Ethylenbildung	36
Nep1-ähnliche Proteine (NLPs)	Nicht definiert	Viele Dikotyledonen	Unbekannt	HR-ähnlicher Zelltod, Induktion von Abwehrreaktionen	37-40
Xylanase	TKLGE Pentapeptid (oberflächenexponiertes Epitop der Xylanase)	Tabak und Tomate	LeEIX2 (LRR-RLP)	HR-ähnlicher Zelltod, Ethylenbildung	41-43
$\beta$ -Glukane	Tetraglukosylgluzitol-verzweigte Hepta- $\beta$ -glukoside	Reis	Unbekannt	Phytoalexinbildung	44
<b>Braunalgen</b>					
$\beta$ -Glukane	Laminarin (lineares $\beta$ -1,3 Glukan)	Tabak	Unbekannt	Induktion von Abwehrreaktionen	45
Sulfatisierte Fukane	Fukanoligosaccharide	Tabak	Unbekannt	Induktion von Abwehrreaktionen	46

1. Zipfel *et al.*, 2006; 2. Kunze *et al.*, 2004; 3. Chinchilla *et al.*, 2006; 4. Gomez-Gomez *et al.*, 2000; 5. Felix *et al.*, 1999; 6. Lee *et al.*, 2001; 7. He *et al.*, 1993; 8. Wei *et al.*, 1992; 9. Felix *et al.*, 2003; 10. Sanabria *et al.*, 2006; 11. Zeidler *et al.*, 2004; 12. Piater *et al.*, 2004; 13. Newman *et al.*, 2002; 14. Gijzen und Nürnberger, 2006; 15. Pemberton *et al.*, 2005; 16. Mattinen *et al.*, 2004; 17. Gust *et al.*, eingereicht; 18. Osman *et al.*, 2001; 19. Ricci *et al.*, 1989; 20. Qutob *et al.*, 2006; 21. Qutob *et al.*, 2002; 22. Fellbrich *et al.*, 2002; 23. Veit *et al.*, 2001; 24. Brunner *et al.*, 2002; 25. Nürnberger *et al.*, 1994; 26. Fliegmann *et al.*, 2004; 27. Umemoto *et al.*, 1997; 28. Gaulin *et al.*, 2006; 29. Koga *et al.*, 1998; 30. Kaku, 2006; 31. Zhang *et al.*, 2002; 32. Peck *et al.*, 2001; 33. Ito *et al.*, 1997; 34. Baureithel *et al.*, 1994; 35. Granado *et al.*, 1995; 36. Basse *et al.*, 1993; 37. Keates *et al.*, 2003; 38. Quayyum *et al.*, 2003; 39. Bailey, 1995; 40. Staats *et al.*, 2007; 41. Ron und Avni, 2004; 42. Rotblat *et al.*, 2002; 43. Enkerli *et al.*, 1999; 44. Yamaguchi *et al.*, 2000; 45. Klarzynski *et al.*, 2000; 46. Klarzynski *et al.*, 2003.

*genesis-related (PR)*-Gene (Batz *et al.*, 1998; Somssich *et al.*, 1989) sowie die Biosynthese antimikrobieller Phytoalexine (Furanocumarine) (Parker *et al.*, 1991).

### 1.1.1.2 NLP<sub>pp</sub>

Die Fähigkeit, Zelltod in Pflanzen auszulösen, ist Merkmal einer neuen Klasse von Proteinen, die in vielen Phytopathogenen anzutreffen ist. Diese Proteine können über eine gemeinsame Domäne, die NPP1- (nekroseninduzierendes Phytophthora Protein) Domäne, identifiziert werden (Fellbrich *et al.*, 2002) und wurden NLPs (Nep1-like proteins) genannt (Gijzen and Nürnberger, 2006; Pemberton and Salmond, 2004). Das erste isolierte Protein, Nep1 (necrosis and ethylene-inducing peptide 1), wurde von Bailey (1995) als ein Bestandteil von *Fusarium oxysporum* Kulturfiltraten identifiziert. Nep1 ruft Nekrosen- und Ethylenbildung im Kokastrauch, *Erythroxylum coca*, hervor (Bailey, 1995). Wie aus Tabelle 1-1 ersichtlich ist die Gruppe der NLPs in Eukaryoten (Oomyceten und Pilze) wie in Prokaryoten (Gram-positive und -negative Bakterien) verbreitet. Charakteristisch für die NPP1-Domäne sind zwei oder vier Cysteinreste, ein zentraler konservierter Bereich mit dem Heptapeptidmotiv „GHRHDWE“ und meistens ein aminoterminales Signalpeptid (Gijzen and Nürnberger, 2006). Aufgrund der vorhandenen Cysteine lässt sich die NPP1-Domäne in zwei Typen unterteilen: die Typ I- (zwei Cysteinreste) NPP1-Domäne ist in Pilzen, Oomyceten und Bakterien vorhanden, die Typ II- (vier Cysteinreste) NPP1-Domäne dagegen nur in Pilzen und Bakterien. Es kann außerdem möglich sein, dass Gene, die Typ I- und Typ II-Domänen kodieren, zusammen in einer einzigen Pilzart auftreten, wie es beispielsweise in *Magnaporthe grisea* der Fall ist (Gijzen and Nürnberger, 2006). Ein weiteres wichtiges Merkmal der NLPs ist ihre Fähigkeit, eine Vielzahl an Abwehrreaktionen, Nekrose und Zelltod in dikotyledonen Pflanzen auszulösen (Bailey *et al.*, 2005; Fellbrich *et al.*, 2002; Keates *et al.*, 2003; Quayyum *et al.*, 2003; Qutob *et al.*, 2006; Staats *et al.*, 2007; Veit *et al.*, 2001).

Ein Vertreter dieser neuen Klasse ist ein NLP aus *Phytophthora parasitica* (NLP<sub>pp</sub>), das ursprünglich als NPP1 aus dem Kulturfiltrat dieses Oomyceten isoliert wurde (Fellbrich *et al.*, 2002). Anders als Pep13 induziert NLP<sub>pp</sub> zelltodähnliche Läsionen in Petersilie (Fellbrich *et al.*, 2002). Frühe induzierbare zelluläre Reaktionen wie ein erhöhtes Niveau an zytoplasmatischem Calcium, die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die Aktivierung von MAPKs werden durch beide PAMPs in Zellsuspensionskulturen der Petersilie angeregt. Die Infiltration von NLP<sub>pp</sub> in *Arabidopsis*-Blätter resultierte in einer Transkriptakkumulation von *PR*-Genen, in der Bildung von ROS und Ethylen, in Kalloseauflagerung und in HR-ähnlichem Zelltod (Fellbrich *et al.*, 2002). Der NLP<sub>pp</sub>-induzierte Zelltod ist lichtabhängig und benötigt einen aktiven Metabolismus der Pflanze (Qutob *et al.*, 2006).

### 1.1.1.3 HRPZ<sub>PSPH</sub>

Phytopathogene Bakterien besitzen *HRP*- (Hypersensitive Reaktion und Pathogenität) Gene, die die Pathogenität in anfälligen Pflanzen und die Fähigkeit, Immunantworten in resistenten Wirts und Nichtwirtspflanzen hervorzurufen, kontrollieren (Bogdanove *et al.*, 1996; Galan and Collmer, 1999). Diese *HRP*-Gene kodieren unter anderem Elemente des Typ III-Sekretionssystems (TTSS), wodurch Bakterien Effektorproteine ins Zytoplasma der Pflanzenzellen einschleusen können (Büttner and Bonas, 2002; Collmer *et al.*, 2002). Eines dieser Genprodukte, die in TTSS-abhängiger Weise aus-

geschieden werden, ist *HrpZ* von *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* ( $HrpZ_{Psp}$ ) (Lee *et al.*, 2001b; Li *et al.*, 2005).  $HrpZ_{Psp}$  inseriert stabil in einer Reihe von synthetischen Phospholipid-doppelschichten sowie Oocyten von *Xenopus laevis* und bildet somit ionenleitende Poren (Lee *et al.*, 2001b; Racape *et al.*, 2005). Für  $HrpZ_{Psp}$  konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von  $Ca^{2+}$  spontan selbst oligomerisiert, so dass vermutet wird, dass die Poren aus homooligomeren Komplexen aufgebaut sind. Die Aufnahme eines CD-Spektrums offenbarte, dass  $HrpZ_{Psp}$  bei einer Einlagerung in Lipidmembranen einer konformatorischen Änderung von  $\beta$ -Faltblatt- zu  $\alpha$ -helikalen Strukturen unterliegt (Engelhardt und Nürnberger, unveröffentlichte Daten). Die Funktion von  $HrpZ_{Psp}$  bei der Infektion von Wirtspflanzen ist noch nicht geklärt. Es scheint jedoch eine duale Wirkung zu besitzen – eine immunstimulierende und eine porenbildende. Die porenbildende Aktivität könnte dazu beitragen, Nährstoffe freizusetzen und/oder Virulenzfaktoren während der bakteriellen Besiedlung von Wirtspflanzen einzuschleusen (Lee *et al.*, 2001b). Konkurrenzexperimente unserer Arbeitsgruppe ergaben, dass  $HrpZ_{Psp}$  nicht an den Pep13-Rezeptor bindet. Ansonsten induziert  $HrpZ_{Psp}$  aber ein sehr ähnliches Muster an Signaltransduktionsreaktionen wie einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom, die posttranslationale Aktivierung von MAP-Kinasen, den *oxidative burst*, die Phytoalexinbildung und eine erhöhte Transkriptakkumulation von Abwehrgenen (He *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2001a).

#### 1.1.1.4 LPS

Lipopolysaccharide (LPS) sind Hauptbestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien und Spuren von LPS (weniger als 1 ng/ml) reichen aus, um in Tieren das angeborene Immunsystem zu aktivieren (Miyake, 2004). LPS ist ein amphiphiles Heteropolymer mit komplexem Aufbau aus drei sehr unterschiedlichen Bereichen: dem hydrophoben Lipid A, der Kernzone mit einem in seiner Zusammensetzung konservierten Oligosaccharid und dem variablen O-Antigen aus langkettigen Oligosacchariden (Alexander and Rietschel, 2001). Obwohl LPS im tierischen System als Prototyp eines PAMPs angesehen wird, müssen die Effekte von LPS im Pflanzenbereich noch weiter aufgeklärt werden. Die Arbeiten der letzten Jahre haben aber gezeigt, dass LPS auch in Pflanzen typische Abwehrreaktionen hervorruft, zu denen der *oxidative burst*, Ionenströme, die Mediumalkalisierung, die Akkumulation von Wasserstoffperoxid bzw. Stickstoffmonoxid und die Aktivierung von MAPKs und Abwehrgenen gehören (Erbs and Newman, 2003; Gerber and Dubery, 2004; Piater *et al.*, 2004; Sanabria and Dubery, 2006; Zeidler *et al.*, 2004). Geringe Konzentrationen (5  $\mu$ g/ml) an LPS von *Pseudomonas syringae* können eine Akkumulation von ROS, die Induktion von *PR*-Genen und die Biosynthese von Phytoalexinen in Petersiliezellkulturen auslösen (Engelhardt und Nürnberger, unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz zu tierischen Systemen, in welchen Lipid A das angeborene Immunsystem stimuliert, reagieren Pflanzen aber offenbar sowohl auf Lipid A als auch auf den Kohlenhydratanteil. Somit scheint LPS zwei PAMPs in sich zu vereinen. Dies wurde durch die Behandlung von *Arabidopsis*-Blättern mit dem Lipid A-Anteil und dem Oligosaccharidbereich aus der Kernzone von LPS aus *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* durch Silipo *et al.* (2005) demonstriert. Beide Anteile waren in der Lage, die HR zu unterdrücken und die Expression der Abwehrgene *PR1* und *PR2* zu induzieren (Silipo *et al.*, 2005). Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass in *Arabidopsis*-Zellen eine Behandlung mit Lipid A, als dem am höchsten konservierten Bereich von LPS, eine ähnliche Menge an NO wie alle getesteten kompletten LPS-Präparationen generierte (Zeidler *et al.*, 2004).

In Säugetieren wird die angeborene Immunantwort auf LPS durch den *Toll-like receptor* (TLR) 4 ausgelöst (Takeda *et al.*, 2003). Dieser besteht aus einer extrazellulären LRR-Domäne und einer zytoplasmatischen Toll-Interleukin-1-Rezeptordomäne (TIR). Während des Erkennungsprozesses bindet LPS an das lösliche LPS-Bindeprotein (LBP) und bildet dann mit dem Glykosylphosphatidylinositol (GPI) verankerten Protein CD14, mit MD-2 und mit dem transmembranen TLR4 einen Komplex, dessen Aktivierung letztendlich die Induktion der Expression der Zielgene veranlasst (Janeway and Medzhitov, 2002; Palsson-McDermott and O'Neill, 2004). Neben TLR4 werden in Tieren alternative LPS-Erkennungsmechanismen vorgeschlagen, z.B. über Scavenger-Rezeptoren (Vishnyakova *et al.*, 2003), über Kollektine (Kollagen-ähnliche Lektine) (McGuinness *et al.*, 2003) oder über Histone (Augusto *et al.*, 2003). Der pflanzliche LPS-Perzeptionsmechanismus ist bisher jedoch nicht bekannt.

### 1.1.1.5 FLG22

Flagellin ist das Hauptstrukturprotein der Flagellen Gram-negativer Bakterien, welche ihnen die Motilität in ihrer Umwelt ermöglichen (Moens and Vanderleyden, 1996) und ein Virulenzfaktor, der für die bakterielle Pathogenität erforderlich ist (Ramos *et al.*, 2004). Die hoch konservierten N- und C-Termini von Flagellinmolekülen verschiedener Bakterien, die für die Filamentarchitektur und die Motilitätsfunktionen notwendig sind, befinden sich im Inneren des Flagellums, die hypervariable zentrale Region wird dagegen auf der Oberfläche des Flagellums präsentiert (Ramos *et al.*, 2004; Yonekura *et al.*, 2003). Die hypervariable Region könnte eine stammspezifische Erkennung durch das erworbene Immunsystem erlauben, die konservierten N- und C-terminalen Regionen scheinen Hauptziele für die Erkennung durch angeborene Immunrezeptoren darzustellen (Zipfel, 2005).

Neben Säugetieren und *Drosophila* können auch Pflanzen Flagellin erkennen und entsprechende Abwehrreaktionen auslösen (Tabelle 1-1) (Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez and Boller, 2002). Ein 22 Aminosäuren umfassendes Peptid des konserviertesten N-terminalen Bereichs von Flagellin – flg22 – stellt das elicitoraktive Epitop in den meisten Pflanzen dar (Felix *et al.*, 1999). In Tomate ist jedoch flg15 das minimale elicitoraktive Epitop, das ausreichend ist, um Stressantworten hervorzurufen und in *Arabidopsis* als Antagonist wirkt (Chinchilla *et al.*, 2006; Felix *et al.*, 1999; Meindl *et al.*, 2000).

Durch einen genetischen *Screen* für flg22-insensitive *Arabidopsis*-Mutanten wurde *FLS2* (*Flagellin Sensing 2*) gefunden, das eine leucinreiche Transmembranrezeptorkinase kodiert (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Im Jahr 2006 konnte mit Hilfe von biochemischen Studien auch gezeigt werden, dass flg22 direkt mit FLS2 interagiert, was demonstriert, dass FLS2 der flg22-Rezeptor in *Arabidopsis* ist (Chinchilla *et al.*, 2006). Obwohl der molekulare Aufbau und die mechanistischen Eigenschaften von FLS2 denen des humanen TLR5 (Flagellinrezeptor) ähneln, scheinen sie sich doch konvergent entwickelt zu haben (Ausubel, 2005).

Die Wahrnehmung von flg22 durch FLS2 stimuliert im Zytoplasma eine nachfolgende MAPK-Kaskade, die aus MEKK1, MKK4/5 und MPK3/6 besteht, und aktiviert wahrscheinlich WRKY-Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis* (Asai *et al.*, 2002; Nühse *et al.*, 2000). flg22-Behandlung induziert außerdem verschiedene allgemeine Abwehrreaktionen wie Ethylen- und ROS-Bildung,

Ionenflüsse, Kalloseauflagerung und Expression von *PR*-Genen (Asai *et al.*, 2002; Felix *et al.*, 1999; Gomez-Gomez *et al.*, 1999; Zipfel *et al.*, 2004) (siehe auch 1.2.2).

Die Beendigung oder Unterbindung der Signalweitergabe unterliegt in Säugetieren oft einer negativen Regulation (Liew *et al.*, 2005). Dies wird in *Arabidopsis* auch für den durch FLS2-Aktivierung eingeleiteten Signalweg vorgeschlagen: Nachdem FLS2 flg22 erkannt hat und Abwehrreaktionen in die Wege geleitet wurden, bilden sich durch Endozytose Vesikel, die FLS2 dem Abbau durch das intrazelluläre Proteasom zuleiten (Robatzek *et al.*, 2006). Ist kein flg22 mehr vorhanden, wird durch *de novo* Proteinsynthese die Zellmembran erneut mit FLS2 bestückt (Robatzek *et al.*, 2006).

#### 1.1.1.6 EF-Tu

Der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) ist das am häufigsten in einer bakteriellen Zelle vorkommende Protein und agiert als PAMP in *Arabidopsis* und anderen *Brassicaceae*, jedoch bis jetzt in keiner anderen Pflanzenfamilie (siehe Tabelle 1-1) (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006). EF-Tu bindet Aminoacyl-tRNAs und katalysiert die Übergabe der Aminosäuren an die wachsende Peptidkette im Ribosom in einem GTP-abhängigen Prozess (Kunze *et al.*, 2004). Wegen seiner essenziellen Rolle in der Proteinbiosynthese wurde das EF-Tu-Protein ausgiebig auf biochemischer und struktureller Ebene untersucht (Kawashima *et al.*, 1996; Krab and Parmeggiani, 1998; Rodnina and Wintermeyer, 2001). Durch proteolytische Spaltung des Proteins konnte ein N-terminales, azetyliertes 18 Aminosäuren langes Fragment (elf18) identifiziert werden, das für die vollständige Aktivität als Elicitor notwendig ist (Kunze *et al.*, 2004). Die elf18-induzierten pflanzlichen Immunreaktionen sind weitestgehend dieselben wie die durch flg22-ausgelösten (Zipfel *et al.*, 2006). Auch die EF-Tu-Perzeption verläuft über einen ähnlichen Mechanismus: Der EF-Tu-Rezeptor EFR kodiert ähnlich wie FLS2 eine LRR-RLK, die ein Signalpeptid, eine LRR-Domäne aus 24 LRR-Kopien, eine Transmembrandomäne und eine zytosolische Ser/Thr-Proteinkinasedomäne besitzt (Zipfel *et al.*, 2006). Zu den durch elf18 ausgelösten EFR-abhängigen Reaktionen gehören eine erhöhte Ethylenbiosynthese, ein *oxidative burst*, eine Mediumalkalisierung in *Arabidopsis*-Zellkulturen und die Aktivierung von Abwehrgenen wie *SIRK/FRK1* (Kunze *et al.*, 2004).

### 1.1.2 EFFEKTORAUSGELÖSTE IMMUNITÄT

Um sich zu vermehren und auszubreiten, entwickelten Pathogene Effektoren oder Virulenzfaktoren, die in der Lage sind, PTI zu unterdrücken (Jones and Dangl, 2006). Im stetigen Kampf ums Überleben bildeten Pflanzen neue Mechanismen aus, um die durch diese Effektoren vermittelte Virulenz überwinden zu können. Dies spiegelt sich in der effektorausgelösten Immunität (ETI) oder kultivarspezifischen Resistenz wider (Shan *et al.*, 2007). Diesen Vorgang beschrieb Flor mit der Gen-für-Gen-Hypothese, da ein Effektor von einem ganz bestimmten Rezeptor in der Pflanze erkannt werden muss (Flor, 1955, 1971). Genetisch betrachtet, wird ETI oder kultivarspezifische Resistenz durch pathogenabgeleitete *Avr*-Gene (Effektoren) und pflanzenabgeleitete *R*-Gene bestimmt (Bonas and Lahaye, 2002; Jones and Dangl, 2006; Nürnberger and Lipka, 2005; Van der Biezen and Jones, 1998). Das Fehlen von zueinander passenden *Avr/R*-Genpaaren führt hiernach zur Erkrankung der Pflanze nach Infektion.

### 1.1.2.1 PATHOGENE EFFEKTOREN

Pathogene Effektoren oder Avr-Proteine werden von Bakterien, Pilzen, Oomyceten oder Viren in die Pflanze eingeschleust. Sie können strukturelle Rollen übernehmen (Schulze-Lefert and Panstruga, 2003), den Verlust von Nährstoffen oder die Pathogenausbreitung fördern (Badel *et al.*, 2002) sowie in großem Ausmaß an der Unterdrückung von PTI oder auch ETI beteiligt sein (Chisholm *et al.*, 2006; Jones and Dangl, 2006).

#### 1.1.2.1.1 Pathogene Effektoren aus Bakterien

Um Virulenzfaktoren an ihren Wirkort zu transportieren, benutzen Bakterien hauptsächlich drei verschiedene Sekretionswege: das Typ II-Sekretionssystem (T2SS), das Typ III-Sekretionssystem (T3SS oder TTSS) und das Typ IV-Sekretionssystem (T4SS).

Das Typ II-Sekretionssystem ist für Mikroben, die die sogenannte Weichfäule auslösen (z.B. *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Eca*) oder subsp. *carotovora* (*Ecc*)), notwendig (Jha *et al.*, 2005; Toth and Birch, 2005). Durch einen zweistufigen Prozess werden über das T2SS Enzyme exportiert, die in den Abbau der pflanzlichen Zellwand - wie Pektinasen, Endoglukanasen und Zellulasen - involviert sind (Abramovitch *et al.*, 2006).

Für *Agrobacterium tumefaciens* spielt das T4SS eine kritische Rolle. Ähnlich dem bakteriellen F-Pilus vermittelt das T4SS den Transfer von bakteriellen Proteinen und DNA in die Pflanzenzelle (Christie *et al.*, 2005).

Das wahrscheinlich am besten untersuchte Sekretionssystem ist das TTSS. Strukturell ähnelt es dem bakteriellen Flagellum und formt einen Pilus, der die Effektoren in die pflanzliche Zelle injiziert, wo sie die Physiologie der Pflanze so verändern, dass es dem Pathogen Vorteile verschafft (Alfano and Collmer, 2004). Diese Effektoren haben diverse enzymatische Aktivitäten wie Cysteinprotease- (Coaker *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005a; Lopez-Solanilla *et al.*, 2004; Shao *et al.*, 2002), ubiquitinähnliche Protease- (Hotson *et al.*, 2003; Roden *et al.*, 2004), E3-Ubiquitinligase- (Abramovitch *et al.*, 2006; Janjusevic *et al.*, 2006) und Proteinphosphataseaktivitäten (Bretz *et al.*, 2003; Espinosa *et al.*, 2003).

Einige Bakterien wie *Pseudomonas syringae* können 20 bis 30 Effektoren während einer Infektion ausscheiden (Chang *et al.*, 2005). Zu diesen Effektoren gehören z.B. AvrPto, AvrRpt2 und AvrRpm1, die Abwehrreaktionen hemmen, welche durch PAMP-Erkennung hervorgerufen wurden (Hauck *et al.*, 2003; He *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2005b). Andere Effektoren wie Mitglieder der *Xanthomonas* AvrBs3 Familie beeinflussen die Gentranskription im Kern, womit sie wahrscheinlich die Abwehrmechanismen des Wirts abschwächen (Chisholm *et al.*, 2006).

#### 1.1.2.1.2 Pathogene Effektoren aus Pilzen und Oomyceten

Pilze und Oomyceten besitzen kein TTSS-ähnliches Sekretionssystem zur Einschleusung von Effektoren. Es wird angenommen, dass Pilze ihre Effektoren über Haustorien in den pflanzlichen Interzellularraum (Apoplast) abgeben (Chisholm *et al.*, 2006). Für einige pilzliche Avr-Proteine (*Uf*-RTP1p und *Us*-RTP1p) wurde eine intrazelluläre Lokalisation (sogar im Zellkern) gezeigt (Kemen *et al.*, 2005). Es wird deshalb angenommen, dass auch pilzliche Effektoren in die Wirtszelle geschleust

werden können. Jedoch ist der Mechanismus, wie diese Effektoren die extrahaustoriale Membran überwinden und im Zytoplasma der Wirtszelle akkumulieren, noch nicht bekannt (Kemen *et al.*, 2005). Die meisten klonierten pilzlichen Effektoren sind kleine Proteine mit unbekannter Funktion, die ein Signalpeptid für die Sekretion in den Apoplasten besitzen, so z.B. AvrP4 und AvrM aus *Melampsora lini* (Catanzariti *et al.*, 2006); Avr2, Avr4 und Avr9 aus *Cladosporium fulvum* (Lauge and De Wit, 1998) oder ATR1<sup>NdWSB</sup> aus dem Oomyceten *Hyaloperonospora parasitica* (Rehmany *et al.*, 2005). Avr2 kodiert z.B. ein cysteinreiches Protein, das an die sekretierte Cysteinprotease Rcr3 aus Tomate bindet und sie inhibiert (Rooney *et al.*, 2005).

### 1.1.2.2 RESISTENZPROTEINE

Um den Suppressionsmechanismen der pathogenen Effektoren entgegenzuwirken, entwickelten einige Pflanzen hoch spezifische Resistenzproteine. Die Erkennung der Effektoren durch R-Proteine führt zur hypersensitiven Reaktion (HR), einem örtlich begrenzten programmierten Zelltod (Abramovitch *et al.*, 2006; Chisholm *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2007). Die R-Proteine werden aufgrund ihrer Struktur in zwei Hauptklassen unterteilt: Erstens Proteine, die eine Nukleotidbindestelle (NBS) und eine carboxyterminale leucinreiche Domäne (LRR) besitzen (NBS-LRR) und zweitens Proteine, die durch eine extrazelluläre LRR- (eLRR) Domäne gekennzeichnet sind (Chisholm *et al.*, 2006).

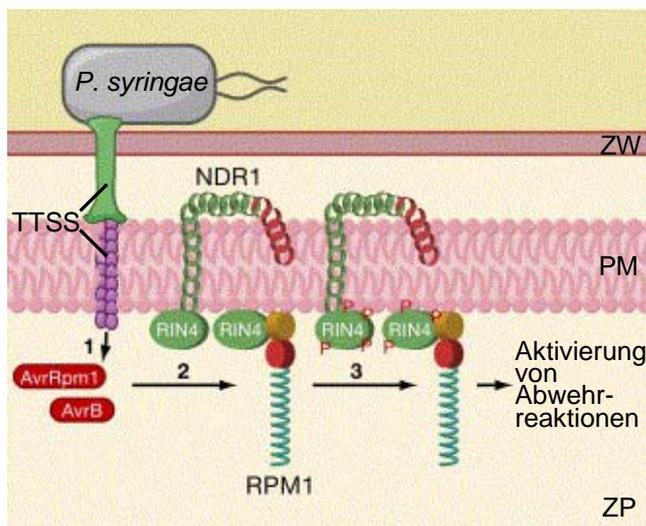
NBS-LRR-Proteine unterscheiden sich an ihrem N-Terminus durch eine *coiled-coil* (CC) Domäne (CC-NBS-LRR- oder CNL-Proteine) oder eine Toll/Interleukin-1 Rezeptor (TIR) Domäne (TIR-NBS-LRR- oder TNL-Proteine) (Nürnberger *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2000; Takken *et al.*, 2006). Die N-terminale Domäne soll in weiterführende Signalwege involviert sein, wohingegen die LRRs für die Erkennungsspezifität verantwortlich sein sollen (Jones and Takemoto, 2004; Martin *et al.*, 2003; Takken *et al.*, 2006). Nukleotidbindemotive kommen in ähnlicher Form auch in den Apoptose-regulatoren CED4 aus *Caenorhabditis elegans* und *Apaf-1* aus Menschen vor (Dangl and Jones, 2001). Deshalb wird die komplette Domäne auch NB-ARC genannt (ARC = *Apaf-1*, *R*-Gen, *CED4*) (Takken *et al.*, 2006; Van der Biezen and Jones, 1998). Am besten charakterisiert sind in der NBS-LRR-Klasse unter anderem RPS2, RPM1 und RPS5. Sie sind *Arabidopsis* R-Proteine, die spezifische Resistenz gegen *Pseudomonas syringae*, welches die entsprechenden Effektoren AvrRpt2, AvrRpm1/AvrB und AvrPphB trägt, ausbilden (Chisholm *et al.*, 2006).

Die eLRR-tragenden Resistenzproteine wurden ihren Strukturen entsprechend in drei Unterklassen eingeteilt (Fritz-Laylin *et al.*, 2005). Diese Unterklassen umfassen RLPs (*receptor-like proteins*; extrazelluläre LRR und TM- (Transmembran-) Domäne), RLKs (*receptor-like kinases*; extrazelluläre LRR, TM-Domäne und zytoplasmatische Kinase) und PGIP (Polygalacturonase-inhibierendes Protein; Zellwand-LRR) (Chisholm *et al.*, 2006). Beispiele für RLPs sind die Cf-Proteine (Cf-2, Cf-4 und Cf-9) aus Tomate, die Resistenz gegen eine Infektion mit dem biotrophen Pathogen *Cladosporium fulvum* vermitteln (Jones *et al.*, 1994). *C. fulvum* scheidet dabei die entsprechenden rassespezifischen Elicitoren Avr2, Avr4 und Avr9 in Tomate aus (de Wit, 1995; Joosten *et al.*, 1994). Ein Modell für eine RLK, die auf Effektormoleküle aus dem Gram-negativen Pathogen *Xanthomonas oryzae* reagiert, ist Xa21 aus Reis (Shen and Ronald, 2002; Song *et al.*, 1995).

1.1.2.3 DIE INDIREKTE ERKENNUNG VON AVR RPM1/AVR B DURCH RPM1 – EIN MODELLBEISPIEL

Obwohl man aufgrund der Gen-für-Gen-Hypothese davon ausgegangen ist, dass Avr- und R-Proteine direkt miteinander interagieren, konnten bisher nur wenige dieser Interaktionen nachgewiesen werden (Deslandes *et al.*, 2003; Dodds *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2000). Es stellte sich vielmehr heraus, dass die Erkennung der Effektoren und die Weiterleitung der Signale indirekt und komplexer ablaufen. Dies führte zur Aufstellung der *Guard*-Hypothese (Cohn *et al.*, 2001; Dangl and Jones, 2001; Holt *et al.*, 2003). Man nimmt an, dass Avr-Proteine als Virulenzfaktoren fungieren und an ihre dazugehörigen Pathogenitätsziele in Wirts- oder Nichtwirtspflanzen binden. Sie wirken aber nur als Effektoren von ETI, wenn das komplementäre R-Protein in einen funktionsfähigen Signalerkennungskomplex einbezogen ist (Nünberger *et al.*, 2004). Die Rolle des R-Proteins ist hierbei die Avr-vermittelte Störung zellulärer Funktionen wahrzunehmen (*to guard*) und ihr durch Einleitung von Abwehrmechanismen entgegenzuwirken.

Ein Modellbeispiel für diese *Guard*-Hypothese ist das *Arabidopsis* Gen *Rpm1*, das Resistenz gegen *Pseudomonas syringae*-Stämme, die die Typ III-Effektoren AvrRpm1 oder AvrB exprimieren, vermittelt. Diese Effektoren interagieren mit RIN4, einem 211-AS-langen, azetylierten und plasmamembranverknüpften Protein (Kim *et al.*, 2002a) und induzieren dessen Phosphorylierung (Mackey *et al.*, 2002). Die Hyperphosphorylierung von RIN4 wird durch Rpm1 erkannt und führt so zur Aktivierung von Abwehrreaktionen (siehe Abbildung 1.2).



**Abbildung 1.2: Indirekte Pathogenerkennung durch Überwachung von Effektorzielen.**

In der Gegenwart der *P. syringae* Effektoren AvrRpm1 und AvrB wird RIN4 hyperphosphoryliert (durch „P“ gekennzeichnet). Das *Arabidopsis* CC-NBS-LRR R-Protein RPM1 nimmt RIN4 wahr und aktiviert nach dessen Phosphorylierung nachfolgende Abwehrreaktionen. ZW: Zellwand, PM: Plasmamembran, ZP: Zytosol, TTSS: Typ III-Sekretionssystem. Modifiziert nach Chisholm *et al.* (2006).

## 1.2 INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION DER PFLANZLICHEN IMMUNITÄT

Sind Pathogene erst einmal durch die entsprechenden Rezeptoren in der Pflanze erkannt worden, erfolgt die Auslösung der Abwehrreaktionen durch verschiedene Signaltransduktionskaskaden. Die dafür genutzten sekundären Botenstoffe und Signalkomponenten sind in den meisten Eukaryoten konserviert. In Pflanzen existieren große Übereinstimmungen in Mechanismen der Signalweiterleitung zwischen PTI- oder ETI-vermittelter Erkennung. Diese sollen anhand der intrazellulären Signalwege, die durch die Interaktion von Pep13 mit Petersilie und flg22 mit *Arabidopsis* ausgelöst werden, exemplarisch dargestellt werden.

### 1.2.1 DAS MODELLSYSTEM PEP13 UND PETERSILIE

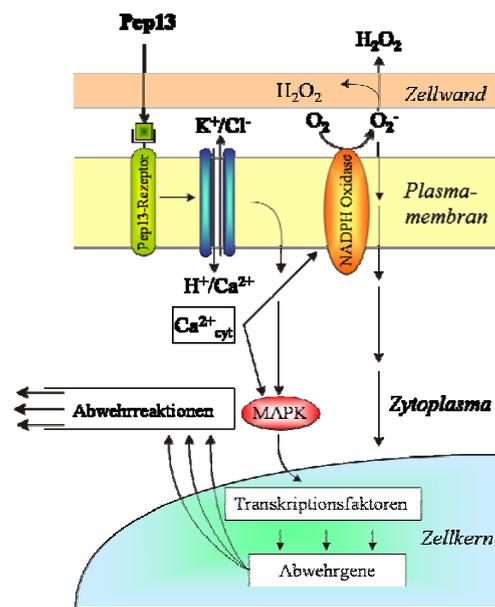
In Studien mit elicitierten Petersiliezellsuspensionskulturen konnten Elemente des Signaltransduktionsweges, die nach Bindung von Pep13 an den Plasmamembranrezeptor initiiert werden, identifiziert und beschrieben werden. Eines der ersten nachgewiesenen Ereignisse in der Signalweiterleitung ist die Depolarisierung der Plasmamembran, die durch die entsprechenden Ionenflüsse ( $H^+$ -,  $Ca^{2+}$ - Einstrom;  $K^+$ -,  $Cl^-$ - Ausstrom) hervorgerufen wird (Jabs *et al.*, 1997; Nürnberger *et al.*, 1994; Scheel *et al.*, 1991). Calcium spielt dabei als sekundärer Botenstoff eine besondere Rolle. Durch den Einsatz von radioaktiv-markiertem  $Ca^{2+}$  konnte gezeigt werden, dass nach Elicitorbehandlung mehr  $Ca^{2+}$  von der Zelle aufgenommen wurde, dagegen aber verschiedene Signalwege blockiert waren, wenn die Aufnahme von  $Ca^{2+}$  verhindert wurde (Blume *et al.*, 2000; Nürnberger *et al.*, 1994). Die Aufnahme von  $Ca^{2+}$  kann durch  $Ca^{2+}$ -permeable Kanäle, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, erfolgen (Zimmermann *et al.*, 1997). Neben dem  $Ca^{2+}$ -Einstrom sind Anionenausströme ein frühes Kennzeichen der pflanzlichen Abwehr. Beispiele dafür sind der erhöhte  $Cl^-$ - und  $K^+$ -Austritt (Jabs *et al.*, 1997; Nürnberger *et al.*, 1994), die miteinander verbunden sind.

Aufgrund des Pep13-induzierten  $Ca^{2+}$ -Einstroms werden innerhalb von 1-5 Minuten mindestens drei mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) posttranslational aktiviert. Eine 46-kDa MAPK zeigt eine hohe Homologie zu einer Kinaseunterklasse, die auch AtMPK6 aus *Arabidopsis* enthält und wird deshalb als PcMPK6 bezeichnet. Zwei andere MAPKs sind in ihrer Nukleotidsequenz zu 89 % identisch und kodieren Proteine mit gleichem Molekulargewicht (~ 44 kDa), die eine hohe Homologie zu AtMPK3 aufweisen und demnach PcMPK3a (früher als ERMK beschrieben) (Ligterink *et al.*, 1997) und PcMPK3b genannt werden (Kroj *et al.*, 2003). Für PcMPK3a konnte nachgewiesen werden, dass sie nach  $Ca^{2+}$ -abhängiger Aktivierung in den Zellkern wandert, wo sie wahrscheinlich an der Phosphorylierung und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Ligterink *et al.*, 1997).

Neben der Aktivierung von MAPK hat der  $Ca^{2+}$ -Einstrom auch einen Einfluss auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die im Kulturmedium von Petersiliezellen beobachtet wurden. So induziert die Zugabe von Pep13 die Bildung von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  in Petersilie, was auf die Aktivierung einer plasmamembrangebundenen NADPH-Oxidase zurückzuführen ist. Wird dem Kulturmedium in Abwesenheit von Pep-13  $O_2^-$  in Form von  $KO_2$ , nicht aber  $H_2O_2$  zugeführt, so wird die Phytoalexinbildung stimuliert. Dies impliziert, dass die Phytoalexinbildung zeitlich nach dem *oxidative burst* erfolgt und von diesem abhängig ist. Durch den Einsatz des NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenyleniodonium (DPI) wird die Pep13-induzierte Bildung der ROS, die Phytoalexin-

bildung und die transkriptionelle Aktivierung von Abwehrgenen verhindert (Jabs *et al.*, 1997). Unverändert bleiben dagegen die elicitorinduzierten Ionenflüsse und die Aktivierung der MAP-Kinasen.

Kroj *et al.* (2003) haben gezeigt, dass die Transkriptakkumulation von Genen, die in unmittelbare und frühe Reaktionen involviert sind (*WRKY*-Transkriptionsfaktoren, *PR1* und *PR2*) (Eulgem *et al.*, 1999; Rushton and Somssich, 1998) durch MAPKs unabhängig vom *oxidative burst* kontrolliert wird. Im Gegensatz dazu ist die Phytoalexinbiosynthese und die transkriptionelle Aktivierung, der für die Phytoalexinbildung erforderlichen Enzyme, von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies abhängig (Kroj *et al.*, 2003). Abbildung 1.3 fasst die Pep13-induzierten Signaltransduktionswege in Petersilie in einem Modell zusammen (modifiziert nach Jabs *et al.*, 1997).



**Abbildung 1.3: Modell der Pep13-induzierten Signaltransduktion in Petersilie.**

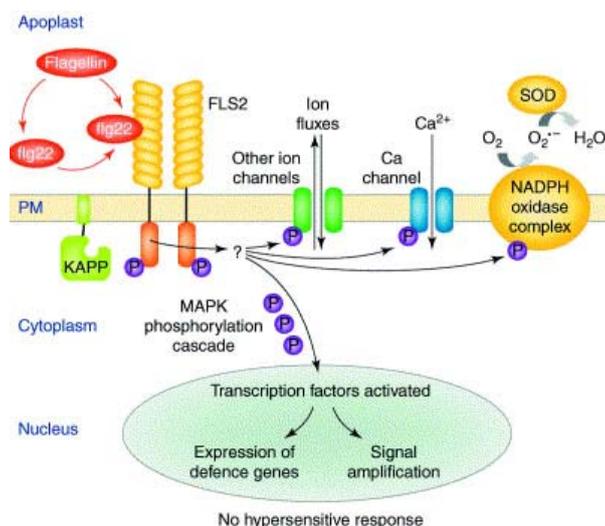
Pep13 wird durch den in der Plasmamembran lokalisierten Pep13-Rezeptor erkannt. Die Erkennung löst verschiedene Ionenströme (insbesondere ein Ca<sup>2+</sup>-Einstrom) aus, die wiederum die Aktivierung einer NADPH-Oxidase und einer MAP-Kinasekaskade hervorrufen. Infolgedessen werden Transkriptionsfaktoren stimuliert, die die Expression verschiedener Abwehrgene induzieren. Modifiziert nach Jabs *et al.*, 1997.

## 1.2.2 DAS MODELLBEISPIEL FLG22 UND ARABIDOPSIS

Die Erkennung von flg22 durch FLS2 und die dadurch eingeleiteten Signalwege gelten als Paradebeispiel der zur pflanzlichen Immunität führenden Reaktionen. Interagiert flg22 mit der extrazellulären LRR-Domäne von FLS2 (eventuell auch mit weiteren Komponenten), wird die intrazelluläre FLS2-Kinasedomäne wahrscheinlich durch Homo- oder Heterodimerisation des Rezeptors und Autophosphorylierung aktiviert (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Diese Aktivierungsprozesse verursachen daraufhin die schnelle Phosphorylierung einer Vielzahl an Proteinen. Auf welche Weise das geschieht, ist noch nicht bekannt. Zu den phosphorylierungsabhängigen Reaktionen gehören die Aktivierung von Ionenkanälen, des NADPH-Oxidase-Komplexes und einer MAP-Kinasekaskade (Gomez-Gomez and Boller, 2002). Es scheint, dass flg22 in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten zu Beginn eine MAP-Kinase-Kinase-Kinase (AtMEKK1) aktiviert, die daraufhin zwei

MAP-Kinase-Kinasen (AtMKK4 und AtMKK5) phosphoryliert. Diese Kinasen phosphorylieren und aktivieren wiederum zwei MAP-Kinasen, AtMPK3 und AtMPK6 (Asai *et al.*, 2002; Gomez-Gomez and Boller, 2002). Die anschließende Aktivierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY22 oder WRKY29) regt die Expression von verschiedenen Abwehrgenen an (z.B. FRK1) (Asai *et al.*, 2002). AtMPK3 oder AtMPK6 werden in Pflanzen jedoch nicht ausschließlich durch AtMEKK1 aktiviert, da die Aktivierung von AtMPK3 und AtMPK6 im Gegensatz zu AtMPK4 in *mekk1*-Pflanzen nicht beeinflusst wird (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007). Es muss also noch ein anderer Mechanismus existieren, durch den diese beiden MAPKs angeregt werden (Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007).

Wie schon in der Interaktion von Pep13 mit Petersilie gezeigt werden konnte, nehmen auch in der Interaktion von flg22 mit *Arabidopsis* Ionenströme eine wichtige Position ein. Innerhalb weniger Minuten kann in *Arabidopsis*zellkulturen eine Alkalisierung des Mediums beobachtet werden (Felix *et al.*, 1999). Außerdem konnte die Induktion des *oxidative burst*, eine Kalloseauflagerung und die Aktivierung verschiedener Abwehrgene (*PR1*, *PR5* und *PDF1.2*) nachgewiesen werden (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). Abbildung 1.4 zeigt ein Modell für die durch flg22 angeregte Signaltransduktion in *Arabidopsis* (modifiziert nach Gomez-Gomez und Boller, 2002).



**Abbildung 1.4: Modell für die Flagellin-Signalweitergabe in *Arabidopsis*.**

Flagellin oder Flagellinfragmente, wie z.B. flg22, werden direkt oder indirekt durch FLS2 in der Plasmamembran (PM) erkannt. Die Erkennung kann zur Autophosphorylierung von FLS2 führen. Außerdem wird über unbekannte Signalwege die schnelle Phosphorylierung nachfolgender Zielproteine induziert. Dazu gehören vermutlich Calcium- und andere Ionenkanäle sowie der NADPH-Oxidasekomplex, der in die Abgabe von  $H_2O_2$  durch die Superoxiddismutase (SOD) involviert ist. Eine kinaseassoziierte Proteinphosphatase (KAPP) ist ein negativer Regulator dieses Signalweges. Zusätzlich wird eine MAP-Kinasekaskade induziert, die in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (z.B. WRKY22 und WRKY29) gipfelt, wodurch die Expression von Abwehrgenen sowie von Genen, die weitere Transkriptionsfaktoren kodieren, induziert wird. Im Gegensatz zur Abwehr, die durch *R*-Gene vermittelt wird, führt dieser Weg nicht zu einer HR und Zelltod. Modifiziert nach Gomez-Gomez und Boller, 2002.

### **1.3 ZIEL DER ARBEIT**

Die Identifizierung und Charakterisierung differenziell exprimierter Gene als Antwort auf die Behandlung mit Elicitoren sind wichtig und notwendig, um ein tieferes Verständnis der molekularen Grundlagen pflanzlicher Abwehrreaktionen und der Signaltransduktionsvorgänge zu erlangen. Vergleiche der Zusammensetzung und der Dynamik verschiedener Sätze früh induzierter Gene lassen Einsicht in die spezifischen Ereignisse der Abwehrreaktionen eines jeden Elicitors und in die gemeinsamen Komponenten der PAMP-Signalwege zu. Dabei wird angenommen, dass durch PAMP-Behandlung unter anderem auch solche Gene transkriptionell aktiviert werden, deren Produkte verstärkt für die pflanzliche Pathogenantwort benötigt werden. Dies konnte für die *Arabidopsis*-Rezeptoren FLS2 und EFR gezeigt werden (Nürnberger and Kemmerling, 2006; Zipfel *et al.*, 2006). Um Gene mit verändertem Expressionsmuster zu identifizieren, sollten zunächst cDNA-AFLP-Analysen von Petersiliezellensuspensionskulturen nach Behandlung mit den oomycetenabgeleiteten PAMPs Pep13 und NLP<sub>Pp</sub> und den bakteriellen Elicitoren HrpZ<sub>PspH</sub> und LPS<sub>Pa</sub> durchgeführt werden. Die im cDNA-AFLP-Experiment gewonnenen Ergebnisse sollten durch eine Analyse von cDNA-*Macroarrays*, die aus den erhaltenen cDNA-AFLP-Fragmenten konstruiert wurden, verifiziert werden. Durch die anschließende Inaktivierung einer Auswahl an PAMP-induzierten Genen, die durch Sequenzvergleich möglicherweise eine Rolle in der Signalaufnahme und/oder -weiterleitung spielen, sollte die funktionelle Bedeutung dieser Gene in Petersilie charakterisiert werden.

Im Verlauf der Arbeit stellte sich durch Analyse von *Microarray*-Daten der *AtGenExpress*-Initiative in *Arabidopsis thaliana* heraus, dass dort ein ähnlicher Satz an Genen durch dieselben PAMPs induziert wird. Daraufhin sollte die funktionelle Charakterisierung einiger ausgewählter Gene in einem vorwärtsgerichteten genetischen Ansatz in *Arabidopsis thaliana* vorgenommen werden, indem entsprechende T-DNA-Insertionslinien unter verschiedenen Bedingungen auf Effekte untersucht werden, die durch das Fehlen des Proteins hervorgerufen werden.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 MATERIAL

#### 2.1.1 CHEMIKALIEN, ENZYME, RADIOISOTOPE UND OLIGONUKLEOTIDE

Chemikalien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Organische Lösungsmittel und Säuren lieferten die Firmen Fluka (Buchs, CH) und Merck. Substanzen für Kulturmedien stellten die Firmen Difco Lab. (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, NL) und Sigma bereit. Enzyme für die molekularbiologischen Arbeiten stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Eurogentec (Seraing, B), Invitrogen (Karlsruhe), MBI Fermentas (St.Leon-Rot), New England Biolabs (Frankfurt/M.) und Promega (Mannheim). Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG Biotech (Ebersberg), Metabion (Martinsried) oder Sigma-Ark (Darmstadt) synthetisiert. Radiochemikalien wie  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ ,  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ ,  $[\alpha\text{-}^{33}\text{P}]\text{dATP}$  sowie  $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{ATP}$  wurden von ICN Pharmaceuticals (jetzt MP Biomedicals, Eschwege) bzw. Amersham Biosciences (jetzt GE Healthcare, Freiburg) geliefert.

Wenn nicht anderweitig angegeben, steht  $\text{H}_2\text{O}$  oder Wasser immer für steriles Millipore-Wasser.

#### 2.1.2 NÄHRMEDIEN

Tabelle 2-1 fasst alle häufig verwendeten Nährmedien zusammen. Für LB-Platten wurden 15 g/l Bacto-Agar, für MS-Platten 8 g/l Agar-Select und für HA-Platten 6 g/l Agarose zugesetzt. Alle Medien für Mikroorganismen wurden autoklaviert (121 °C, 2x105 hPa, 20 min). Bei Bedarf wurden dem Medium – nach dem Abkühlen auf ca. 55 °C – die benötigten Antibiotika zugesetzt (siehe Tabelle 2-2).

**Tabelle 2-1: Zusammensetzung häufig verwendeter Nährmedien**

Bezeichnung	Zusammensetzung (alle Angaben pro Liter)	Kulturmedium für
LB	10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl	<i>Escherichia coli</i>
HA	Modifiziertes Gamborg's B5 Medium	<i>Petroselinum crispum</i>
½ MS	2,2 g/l MS-Fertigmedium; (0,5 g/l MES); pH 5,7 mit KOH einstellen (Murashige and Skoog, 1962)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
DYT	16 g Trypton, 10 Hefeextrakt, 10 g NaCl	<i>Escherichia coli</i>
King's B	20 g/l Glycerin; 40 g/l Proteose-Pepton 3; nach dem Autoklavieren 10 ml/l 10 % $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 10 ml/l 10 % $\text{MgSO}_4$ zugeben	Pseudomonaden

**Tabelle 2-2: Antibiotikazusätze zu Selektionsmedien**

Antibiotikum	Endkonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Stammlösung [ $\text{mg/ml}$ ]	Lösungsmittel
Ampicillin	100	100	Wasser
Cycloheximid	50	12,5	Wasser
Hygromycin B*	20-30	50	Wasser
Kanamycin	50	50	Wasser
Rifampicin	50	5	Methanol
Tetracyclin	50	5	Ethanol

\*Kommerzielle Hygromycin B-Lösung der Firma Carl Roth.

### 2.1.3 VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME

In Tabelle 2-3 sind die verwendeten Bakterienstämme mit ihren Genotypen aufgelistet.

**Tabelle 2-3: Verwendete Bakterienstämme**

Art	Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169 (<math>\Phi</math>80 <i>lacZ</i> <math>\square</math> M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i></i>
	XL1-Blue (Stratagene)	Tet <sup>r</sup>
	ONE SHOT TOP10F <sup>'</sup> (Invitrogen)	F <sup>'</sup> [ <i>lacI</i> <sup>q</sup> Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] <i>mcrA <math>\Delta</math>(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <math>\Phi</math>80<i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math><i>lacX74 recA1 deoR araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara-leu</i>)7697 galU galK rpsL(Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i></i>
	ONE SHOT TOP10 (Invitrogen)	F <sup>'</sup> <i>mcrA <math>\Delta</math>(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) <math>\Phi</math>80<i>lacZ</i><math>\Delta</math>M15 <math>\Delta</math><i>lacX74 recA1 deoR araD139 <math>\Delta</math>(<i>ara-leu</i>)7697 galU galK rpsL (Str<sup>r</sup>) endA1 nupG</i></i>
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	DC3000	Rif <sup>r</sup>
	HrcC <sup>-</sup>	Rif <sup>r</sup> Kan <sup>r</sup> (nptII) (S. Nimchuk)
	avrRpmI	pVSP61-avrRpmI, Rif <sup>r</sup> Tet <sup>r</sup> (Bisgrove <i>et al.</i> , 1994)
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>		Rif <sup>r</sup>

### 2.1.4 VERWENDETE PLASMIDE

Tabelle 2-4 zeigt alle verwendeten Vektoren mit ihren wesentlichen Merkmalen.

**Tabelle 2-4: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Wesentliche Merkmale	Verwendung
pCR <sup>®</sup> 2.1-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)	f1 ori, pMB1 ori, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , pSP6, MCS, und pT7, Kan <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für DNA-Klonierungen
pCR <sup>®</sup> 4-TOPO <sup>®</sup> (Invitrogen)	ori, <i>lacZ<math>\alpha</math>-ccdB</i> , pT3, TOPO <sup>®</sup> CS, pT7, Kan <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für DNA-Klonierungen
pRT100 (Töpfer <i>et al.</i> , 1987)	<i>colE1</i> ori, MCS, p35S, Poly(A)-Signal, Amp <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für Petersilie-Transformation
pCR2.1_HYG (Justin Lee)	f1 ori, pMB1 ori, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , pSP6, MCS, und pT7, Kan <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup> , Hyg <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für Petersilie-Transformation
pB2GW7	<i>colE1</i> ori, pVS1, pBR322 <i>bom</i> , Sm/SpR, LB, Bar, p35S, attR1, CmR- <i>ccdB</i> , attR2, T35S, RB, Str <sup>r</sup>	Zum Ausschneiden des p35S und T35S
pBluescript II KS (Stratagene)	f1 ori, <i>lacZ<math>\alpha</math></i> , pT3, MCS, pT7, pUC ori, Amp <sup>r</sup>	Ausgangsvektor für DNA-Klonierung

## **2.2 METHODEN**

### **2.2.1 KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN**

#### 2.2.1.1 ANZUCHT VON *ESCHERICHIA COLI*

Wenn nicht anders angegeben, so wurden die verschiedenen *E. coli* Stämme entweder über Nacht auf LB-Agar bei 37 °C oder in LB-Medium bei 37 °C bei ca. 180 rpm kultiviert. Den Medien wurden, je nach Bakterienstamm und enthaltener/transformierter Plasmid-DNA, die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

#### 2.2.1.2 ANZUCHT VON PSEUDOMONADEN

Im Allgemeinen wurden die *Pseudomonas*-Stämme entweder auf King's B-Agar (für längere Aufbewahrung) oder aber LB-Agar (Bakterienwachstumsassays) etwa 48 h bei 28 °C inkubiert. Die Kultivierung in flüssigem Medium erfolgte immer über Nacht in King's B-Medium bei 28 °C und 200 rpm. Den Medien wurden, je nach Bakterienstamm, die entsprechenden Antibiotika zugesetzt.

### **2.2.2 KULTIVIERUNG UND BEHANDLUNG VON PFLANZENZELLEN UND PFLANZEN**

#### 2.2.2.1 PETERSILIE

##### 2.2.2.1.1 Kultivierung der Petersiliezellen

Suspensionskulturen von Petersiliezellen (*Petroselinum crispum*) wurden in modifiziertem Gamborg's B-5-Medium (Gamborg et al., 1968) mit 1 mg/l 2,4-D im Dunkeln bei 26°C geschüttelt (110 rpm) und alle sieben Tage in frisches HA-Medium überführt (Hahlbrock, 1975).

##### 2.2.2.1.2 Zellassay in Petersilie

Für Elicitorexperimente wurden sechs-Tage-alte Zellen durch Filtration über einen Büchnertrichter geerntet, mit HA-Medium gewaschen und in frischem HA-Medium resuspendiert, wobei eine Zelldichte von 10 g/100 ml eingestellt wurde. Nach mindestens 15 min Äquilibrieren der Zellen in frischem HA-Medium im Dunkeln bei 26 °C unter konstantem Schütteln (110 rpm) wurde die Suspensionskultur mit Elicitorstammlösung versetzt.

Die Furanocumarinakkumulation wurde 24 h nach Behandlung der Petersiliezellen mit Elicitoren mittels eines Mikrotiterplatten-Fluorometers (Cytoflor II, Biosearch, Bedford, USA oder MWG Sirius HT Injector, MWG Biotech, Ebersbach) ermittelt, wobei die Fluoreszenz des Kulturmediums bei 440 nm nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360 nm (Parker *et al.*, 1991) gemessen wurde.

2.2.2.2 ARABIDOPSIS

Für die Versuche an Pflanzen wurden entweder *Arabidopsis thaliana* Wildtyppflanzen der Kulturvarianten *Columbia 0* (Col-0) oder *Wassilewskija 0* (Ws-0) oder aber die entsprechenden T-DNA-Insertionslinien verwendet. Bei den T-DNA-Insertionslinien wurde das Gen der kodierten Proteine durch Insertion einer T-DNA inaktiviert. Sie wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC, <http://nasc.nott.ac.uk>) (Alonso *et al.*, 2003) oder vom *Institute National de la Recherche Agronomique* (INRA, <http://www.inra.fr>) (Samson *et al.*, 2002) bezogen. In Tabelle 2-5 sind alle verwendeten T-DNA-Insertionslinien aufgeführt.

**Tabelle 2-5: Verwendete T-DNA-Insertionslinien**

AGI-Nummer	T-DNA-Insertionslinie	Insertionsort der T-DNA
At2g39530	Flag_436B11	2. Exon
At2g02220	Flag_407D02	LRR
	N508585	Kinasedomäne
	N506900	Promotor
At1g74360	Flag_234E06	2. Exon
At4g21390	N647359	3. Intron
	N647351	3. Intron
At4g33920	N635730	5'-UTR
	N539779	4. Exon
At5g41990	N603318	3. Exon
	N524887	5. Exon
	Flag_578A06	7. Exon

2.2.2.2.1 Oberflächensterilisation

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden 10 min mit einer 12 %-igen (v/v) Natriumhypochloridlösung, der 0,1 % Triton X-100 zugesetzt wurde, sterilisiert. Anschließend wurden die Samen mindestens 5x mit sterilem Wasser gewaschen.

2.2.2.2.2 Anzuchtbedingungen

Die Aussaat wurde, wie bei den einzelnen Experimenten beschrieben, entweder auf vorher dampfsterilisierter GS90-Erde (Gebr. Patzer) gemischt mit Vermikulit oder auf ½ MS-Agar durchgeführt. Anschließend wurden die Samen zur Stratifikation für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Die Pflanzen wurden in Pflanzenanzuchtkammern unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit, 150 µmol/m<sup>2</sup>s, 22 °C, 40-60 % Luftfeuchtigkeit) angezogen und zur Induktion der Blütenbildung nach ca. sieben Wochen in Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit, 150 µmol/m<sup>2</sup>s, 22 °C, 40-60 % Luftfeuchtigkeit) überführt.

### **2.2.3 PHÄNOTYPISCHE ANALYSEN**

#### **2.2.3.1 WURZELLÄNGENASSAY**

Die Bestimmung des Wurzelwachstums von *Arabidopsis thaliana* var. *Columbia 0* (Col-0) und den *ko*-Linien wurde auf ½ MS-Medium (Sigma, Duchefa) mit 0,8 % Agar-Select (Sigma) vorgenommen. Die zu testenden Stoffe wurden dem autoklavierten Medium steril filtriert zugesetzt. Als abiotische Stressoren wurden verwendet: 100, 130 bzw. 150 mM Natriumchlorid zur Untersuchung des Wachstums bei Salzstress bzw. 300 mM Mannitol als osmotischer Stress. Außerdem wurde noch das Phytohormon Methyljasmonat (2,5 µM) getestet. Da Methyljasmonat in Ethanol gelöst ist, wurde die entsprechende Menge den Kontrollplatten zugesetzt.

Die Samen wurden, wie in Kapitel 2.2.2.2.1 beschrieben, oberflächensterilisiert und auf ½ MS-Agar in Petrischalen ausgelegt. Diese Platten wurden nach zweitägiger Stratifikation, aufrecht stehend im Lichtregal (Growbanks) unter Langtagbedingungen fünf Tage bis zu einer Wurzellänge von etwa 0,5 cm wachsen gelassen. Anschließend wurden die Pflanzen auf den jeweiligen den Stressor enthaltenden ½ MS-Agar in rechteckige Petrischalen (12 x 12 cm) umgesetzt. Diese wuchsen unter denselben Langtagbedingungen im Pflanzenschrank aufrecht stehend bis zu zehn Tage. Die jeweiligen Wurzellängen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten vermessen.

#### **2.2.3.2 PATHOGEN-TEST IN PLANTA**

Um zu untersuchen, ob T-DNA-Insertionslinien im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Anfälligkeit bzw. Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen aufweisen, wurden sechs Wochen alte, auf Erde angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen mit Bakterien infiziert. Es handelte sich dabei um die Bakterienstämme: *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), *Pst* DC3000 *hrcC*<sup>-</sup> (*Pst* *hrcC*<sup>-</sup>), *Pst* DC3000 *avrRpm1* (*Pst* *avrRpm1*) und *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psph*). *Pst* DC3000 ist ein virulentes Pathogen für *Arabidopsis*, *Pst* *avrRpm1* jedoch auf Grund des *AvrRpm1* Proteins avirulent auf Col-0, während *Pst* *hrcC*<sup>-</sup> durch Fehlen des *HrcC*<sup>-</sup>-Proteins im Typ III-Sekretionsapparat apathogen ist. *Psph* wird als Nichtwirtspathogen von *Arabidopsis* verwendet. Als Kontrolle wurden Pflanzen mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> inokuliert. Die Infektion mit Pseudomonaden erfolgte über Inokulation von 10<sup>4</sup> (bakterielle Wachstumskurven) und 10<sup>8</sup> cfu/ml (RNA-Isolation) in 10 mM MgCl<sub>2</sub> mit einer kanülenlosen Spritze. Das infizierte Pflanzenmaterial wurde anschließend auf die Symptome und das Bakterienwachstum hin untersucht bzw. zur Gewinnung von RNA verwendet (siehe Kapitel 2.2.6.1).

#### **2.2.3.3 ANALYSE DES BAKTERIENWACHSTUMS IN PLANTA**

Als Ausgangsmaterial wurden sechs-Wochen-alte *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet, die auf Erde ausgesät, stratifiziert und unter Kurztagbedingungen in einer Pflanzenanzuchtkammer angezogen wurden. 50 ml King's B-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit den verschiedenen Pseudomonaden (*Pst* DC3000, *Pst* *avrRpm1*, *Pst* *hrcC*<sup>-</sup> bzw. *Psph*) angeimpft und 16 Stunden bei 28 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Verwendung wurden die Zellen 6 min bei 4 °C und bei 1300 x g abzentrifugiert, zweimal in 10 mM MgCl<sub>2</sub> gewaschen und eine OD<sub>600nm</sub> von 0,2 eingestellt. Dies entspricht einer Zellzahl von etwa 10<sup>8</sup> cfu/ml. Für den Versuch wurden die Zellen auf 10<sup>4</sup> cfu/ml

verdünnt und in die Blattunterseiten der Pflanzen beidseitig der mittleren Blattachse mit einer nadellosen Spritze inokuliert. Die Probennahme erfolgte nach 0, 1, 2 bzw. 4 Tagen. Aus jedem infizierten Blatt wurden mit Hilfe eines Korkbohrers zwei Blattscheiben herausgeschnitten und in ein mit 100 µl 10 mM Magnesiumchlorid gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Das Blattmaterial wurde mit einem geeigneten Handmörser zerkleinert, die Suspension in unterschiedlichen Verdünnungen auf LB-Agar (enthielten neben den bakterienspezifischen Antibiotika auch 50 µg/ml Cycloheximid) aufgetragen und 48 Stunden bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und die Zellzahl auf die jeweilige Verdünnung zurückgerechnet. Zur statistischen Auswertung wurden stark abweichende Werte nicht herangezogen und von den verbleibenden das arithmetische Mittel gebildet, von dem sich dann auch die jeweilige Standardabweichung ableitet. Pro Zeitpunkt und Pathogen wurden jeweils zwei Blätter von drei Pflanzen inokuliert.

### 2.2.4 TRANSFORMATIONEN

#### 2.2.4.1 TRANSFORMATION VON *E. COLI*

Chemisch kompetente Bakterien (DH5a, XL1-Blue oder TOP 10 F') wurden mittels Hitzeschock transformiert. Die zu transformierenden Plasmide wurden zu den kompetenten Bakterien gegeben, diese für 5-30 min auf Eis inkubiert, für 30-90 s einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und anschließend weitere 5 min auf Eis gestellt. Danach wurde LB- bzw. SOC-Medium zugegeben und die Kulturen für 30-60 min bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt. Anschließend wurden Aliquots der Kulturen auf entsprechenden Agarplatten ausplattiert.

#### 2.2.4.2 TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN

Die Transformation der Petersiliezellkulturen erfolgte durch Partikelbeschuss nach einem modifizierten Protokoll von Finer *et al.* (1992).

##### 2.2.4.2.1 Vorbereitung der Filterplatten

Von 3-Tage-alten Petersiliezellensuspensionskulturen wurde zunächst das Frischgewicht bestimmt, bevor 100-150 mg Frischgewichtszellen in 3 ml HA aufgenommen wurden. Die Zellen wurden über einen Filter (d = 4,5 cm) abgesaugt, der Filter steril auf eine Agarose-Platte mit Mannitol transferiert und anschließend 2 h bei 26 °C im Dunkeln inkubiert.

##### 2.2.4.2.2 Vorbereitung der Goldpartikel und der DNA

Goldpartikel (1,5-3 µm Größe, ABCR, Karlsruhe) wurden mit Ethanol sterilisiert und auf eine Konzentration von 100 µg/µl mit H<sub>2</sub>O eingestellt. Anschließend wurde die DNA (1 µg/µl) mit 1 Vol. (immer auf die Goldlösung bezogen) 2,5 M CaCl<sub>2</sub>, 0,4 Vol. 0,1 M Spermidin und mit 6 Vol. Ethanol (rein, eiskalt) unter ständigem Vortexen und mindestens 30 min bei -20 °C auf die Goldpartikel präzipitiert, kurz zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Partikel trocknen gelassen. Durch Zugabe von 100 µl Wasser wurden die Partikel zu einer feinen Suspension resuspendiert und falls notwendig zum besseren Lösen mit Ultraschall behandelt (1 mg Goldpartikel/2 µg DNA pro Schuss).

#### 2.2.4.2.3 Die *Partikel Inflow Gun* (*P.I.G.*)

Für den Beschuss wurde der Druck der Heliumflasche auf 9 bar eingestellt, 9 µl der gut gevortexten und geschüttelten Partikelsuspension in die Mitte des Swinney-Filterhalters appliziert, der Filter in die Kammer geschraubt, die Petrischale mit den Zellen auf das Zielgitter (ca. 13,5 cm vom Spritzen-Adapter und 5 cm unterhalb des Nybolt-Siebes) gestellt, die *P.I.G.*-Kammer geschlossen, das Vakuum angestellt, bei -0,8 bar der Schuss ausgelöst, das Vakuum entlassen, die Petrischale entfernt und mit Parafilm abgedichtet.

Die Platten wurden unter Zellkulturbedingungen einen Tag inkubiert. Nach 24 h wurden die Filter mit den Zellen auf Selektionsplatten (Hygromycin B) transferiert, wo nach ca 4-6 Wochen Kalli sichtbar sein sollten. Gewachsene Kalli wurden auf frische Hygromycinplatten umgesetzt. Aus ca. 1-2 cm<sup>3</sup> Zellmaterial wurden kleine Flüssigkulturen (100 ml Erlenmeyerkolben, 10 ml HA-Medium und 20 mg/l Hygromycin B) angeimpft. Nach 1-2 Wochen wurde die Suspensionskultur in normale Erlenmeyerkolben mit 35 ml HA (+ 20 mg/l Hygromycin B) transferiert und dann wie üblich subkultiviert.

#### 2.2.4.2.4 Konstruktion des pRT100-Vektors – Einbringen des Markergens für Hygromycin

Genutzt wurde der pRT100-Vektor, in den erst einmal das Markergen für Hygromycin B eingebaut werden musste. Die Hygromycin-Kassette (pNOS-HPT-tNOS) wurde aus dem Vektor pBinHygMCS mit der Pfu-Polymerase amplifiziert und in den *HincII* geschnittenen Vektor pRT100 kloniert, wodurch der Vektor pRT100\_HPT entstand. Die verschiedenen *sense*- und *antisense*-Konstrukte wurden entweder mit den Restriktionsendonukleasen *SmaI* und *HincII* aus dem T-Vektor (modifizierter pBluescript II KS) ausgeschnitten oder Pfu-amplifiziert und nachfolgend in den *SmaI*-geschnittenen Vektor pRT100\_HPT kloniert.

#### 2.2.4.2.5 Konstruktion des pCR2.1\_HPT\_35S-Vektors

Der von Dr. Justin Lee (IPB Halle) zur Verfügung gestellte pCR2.1\_HPT-Vektor enthielt keinen Promotor oder Terminator, unter deren Kontrolle die *sense*- und *antisense*-Konstrukte gestellt werden konnten. Der CaMV-35S-Promotor wurde deshalb aus dem Vektor pB2GW7 über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *SpeI* ausgeschnitten und in den ebenfalls *SacI* und *SpeI* geschnittenen Vektor pCR2.1\_HPT kloniert, so dass der Vektor pCR2.1\_HPT\_p35S entstand. Anschließend wurde der CaMV-35S-Terminator mit neuen Schnittstellen für *SpeI* und *SmaI* aus dem Vektor pB2GW7 amplifiziert, in den als T-Vektor modifizierten pBluescript II KS kloniert, mit dem Restriktionsenzym *SpeI* ausgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pCR2.1\_HPT\_p35S kloniert. Dadurch entstand der Vektor pCR2.1\_HPT\_35S. Über die eingefügte *SmaI*-Schnittstelle konnten nun die verschiedenen *sense*- und *antisense*-Konstrukte eingeführt werden.

## **2.2.5 DNA-ANALYTIK**

### **2.2.5.1 ISOLIERUNG GENOMISCHER DNA AUS PFLANZEN**

#### *Schnell-Präparation genomischer DNA für PCR, nach Edwards*

Ein Blattstück wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl Edwards-Puffer (0,2 M Tris/HCl, pH 7,5; 0,25 M NaCl; 25 mM EDTA, pH 8,0; 0,5 % (w/v) SDS) homogenisiert und 5 min bei RT zentrifugiert (12.000 rpm, Heraeus Biofuge #3325). Der Überstand wurde mit 1 Vol. Isopropanol 10-45 min bei RT präzipitiert und die gefällte DNA abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 14.000 rpm, Eppendorf 5804R). Das Pellet wurde mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50-100 µl 10 mM Tris/HCl, pH 8,5 gelöst, wahlweise 10 min bei 65 °C oder über Nacht bei 4 °C. 2 µl der gelösten DNA wurden in der anschließenden PCR eingesetzt.

#### *Isolierung reiner genomischer DNA, CTAB-Methode*

Gemörsertes Blattmaterial wurde mit dem 10-fachen Vol. (w/v) an Extraktionspuffer (CTAB-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1,4 M NaCl; 20 mM EDTA; 2 % (w/v) CTAB) versetzt, 30 min bei 60 °C inkubiert, mit 1 Vol. Chlorophorm extrahiert und zentrifugiert (15 min, 5.000 rpm, Eppendorf 5804R). Der wässrige Überstand wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Azetat, pH 5,2 und 0,8-1 Vol. Isopropanol 5 min bei RT oder über Nacht bei 4 °C präzipitiert, zentrifugiert (15 min, 5.000 rpm, Eppendorf 5804R), das Pellet 1 h bei RT mit 5 ml 76 % (v/v) Ethanol (versetzt mit 10 mM Ammoniumazetat) gewaschen, anschließend luftgetrocknet und über Nacht bei 4 °C in 2 ml TE (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 0,1 mM EDTA) gelöst. Ein RNase-Verdau erfolgte 30 min bei 37 °C mit 1 µl RNase A (10 mg/ml). Die DNA wurde schließlich aus der wässrigen Phase mit 0,5 Vol. 7,5 M Ammoniumazetat und 2 Vol. Isopropanol 5 min bei RT gefällt, zentrifugiert (15 min, 5.000 rpm, Eppendorf 5804R), 20 min mit 10 ml 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100 µl TE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) resuspendiert.

### **2.2.5.2 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA**

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim and Doly, 1979).

#### *Mini-Präparation*

3 ml Übernachtskulturen in LB-Medium, das mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt war, wurden zentrifugiert (2 min, RT, 12.000 rpm, Heraeus Biofuge, #3325) und in 100 µl Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 15 % (w/v) Saccharose, 10 µg/ml Rnase A, pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl frischer alkalischer SDS-Lösung (0,2 M NaOH, 1 % (w/v) SDS) und 150 µl eiskalter 3 M Kaliumazetatlösung, pH 4,8), 10 minütiger Inkubation auf Eis und anschließender Zentrifugation (10 min, 4 °C, 14.000 rpm, Eppendorf 5804R) wurde aus der wässrigen Phase die DNA mit 0,6 Vol. Isopropanol präzipitiert (15 min, 4 °C, 14.000 rpm, Eppendorf 5804R), in 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) resuspendiert.

Plasmid-DNA, die sequenziert werden sollte, wurde mittels des *QIAprep® Spin Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben präpariert.

### *Midi-Präparation*

Größere Mengen an Plasmid-DNA wurden mit Hilfe des *QIAfilter™ Plasmid Midi Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben isoliert.

#### 2.2.5.3 KONZENTRATIONSBESTIMMUNGEN

Die Nukleinsäurekonzentrationen in Lösungen wurden spektroskopisch ermittelt. Dazu wurde die Extinktion der Lösungen bei 260 nm bestimmt. Über die folgenden Formeln lässt sich die Konzentration der Lösungen errechnen:

DNA:  $E_{260}=1$  entspricht 50 µg/ml      RNA:  $E_{260}=1$  entspricht 40 µg/ml

#### 2.2.5.4 KLONIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

DNA-Fragmente wurden durch Polymerasekettenreaktion (PCR) oder Restriktion mittels geeigneter Endonukleasen nach den Angaben und mit den Puffern der entsprechenden Hersteller gewonnen. PCR-Fragmente wurden entweder über den A-Überhang, den die Taq-Polymerase anhängt, mittels T4-Ligase nach den Angaben des Herstellers in pCR-Vektoren (siehe Tabelle 2-4) oder über die Topoisomerasefunktion der TOPO-Vektoren (siehe Tabelle 2-4) ligiert. Restriktionsfragmente wurden mittels T4-Ligase mit glatten oder kompatiblen überhängenden Enden in linearisierte Vektoren kloniert.

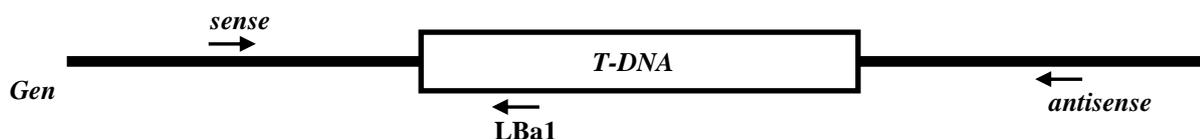
#### 2.2.5.5 POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)

Zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen wurden PE9700- (Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim) und DNA Engine PTC-200-Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) eingesetzt. In der Regel wurden Plasmid-DNA, cDNA, genomische DNA oder Bakterienkolonien als Matritze, 0,5 µM der jeweiligen Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang B), 0,06-0,1 mM dNTPs, 1x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Triton-X-100, pH 9,0) und 1-5 U Taq-DNA-Polymerase (Promega, USA) in einem Reaktionsvolumen von 20-50 µl eingesetzt. Nach einer Denaturierungsphase (94 °C) von 2 min folgte für jedes Primerpaar eine spezifische Anzahl von Zyklen (siehe Anhang B). Ein Zyklus setzte sich aus einer Denaturierungsphase (94°C, 15-30 s), einer Hybridisierungsphase (Temperaturen siehe Anhang B, 30 s) und einer Polymerisationsphase (72 °C, 30-240 s) zusammen. Anschließend wurde die Elongation bei 72 °C für 10 min fortgesetzt und die Reaktion auf 4-15 °C gekühlt.

#### 2.2.5.6 GENOTYPISIERUNG

Zur Überprüfung der T-DNA Insertionen in den einzelnen *Arabidopsis* T-DNA-Insertionslinien wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt, mit denen zwischen WT und *knockout*-Pflanzen unterschieden werden konnte. Folgende Primerpaarkombinationen wurden dazu verwendet: 1.) *sense/antisense* Primer, die die vorhergesagte T-DNA-Insertionsstelle genspezifisch umschließen; 2.) *sense/Lba1*- (T-DNA spezifischer Primer) und 3.) *Lba1/antisense*-Primer (siehe Abbildung 2.1). Die PCR-Ansätze mit den Primerpaaren 2.) und 3.) sollen zeigen, welche Orientierung die T-DNA hat,

im PCR-Ansatz mit den Primerpaaren 1.) sollte im Falle von homozygoten *knockout*-Pflanzen kein PCR-Produkt entstehen.



**Abbildung 2.1: Lokalisierung von T-DNA und Primern für die Genotypisierung.**

#### 2.2.5.7 ELUTION VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN

Nach dem Ausschneiden des DNA-Fragmentes unter UV-Licht erfolgte die Elution des Fragmentes mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) entsprechend dem Herstellerprotokoll.

#### 2.2.5.8 SOUTHERN-TRANSFER

PCR-Fragmente und restriktionsendonukleasebehandelte genomische DNA wurden über ein Agarosegel (Kapitel 2.2.7.1) aufgetrennt und mittels alkalischem Kapillartransfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Biosciences, Freiburg) transferiert. Dazu wurde das Gel zweimal 15 min in 0,25 N HCl, zweimal 15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und anschließend 30 min in Ammoniumazetatlösung (1 M NH<sub>4</sub>Ac, 0,1 M NaOH) inkubiert. Als Transferpuffer diente die Ammoniumazetatlösung. Der Transfer erfolgte über Nacht. Anschließend wurde der Filter an der Luft getrocknet und die einzelsträngige DNA durch Inkubation bei 80 °C, 2 h auf dem Filter fixiert.

#### 2.2.5.9 RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN

Um radioaktive DNA-Sonden für DNA- und RNA-Hybridisierungsexperimente zu erhalten, wurden 25-50 ng gereinigtes DNA-Fragment (Kapitel 2.2.5.7) mit 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP oder [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP durch den *Megaprime-DNA Labelling Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben markiert. Die Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide erfolgte unter Verwendung von *ProbeQuant™ G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellerangaben. Anschließend wurde die Sonde 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und sofort verwendet.

#### 2.2.5.10 RADIOAKTIVE HYBRIDISIERUNG

Die radioaktive Hybridisierung der membrangebundenen Nukleinsäuren erfolgte unter ständiger Rotation bei 65 °C in Hybridisierungsöfen. Dazu wurde die Membran in Hybridisierungsröhren überführt. Nach der Vorhybridisierung für 30 min in 20 ml Hybridisierungspuffer (Church-Puffer: 0,25 M NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 % (w/v) BSA; 1 mM EDTA; 7 % (w/v) SDS), wurde die Vorhybridisierungslösung durch 25 ml Hybridisierungspuffer ausgetauscht, die radioaktiv markierte DNA-Sonde (Kapitel 2.2.5.9) dazugegeben und mindestens 12 h hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurde die Membran einmal kurz bei RT, danach 20-30 min bei 65 °C im Hybridisierungsöfen mit

Waschpuffer I (40 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 5 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA) und zweimal kurz bei RT mit Waschpuffer II (40 mM NaHPO<sub>4</sub>, pH 7,2; 1 % (w/v) SDS; 1 mM EDTA) gewaschen. Die Membran wurde dann in Plastikfolie eingeschlagen und auf einem *Phosphor Screen* (Amersham Biosciences, Freiburg) exponiert, der nachfolgend am *PhosphorImager* (Amersham Biosciences, Freiburg) ausgewertet wurde.

### 2.2.5.11 SEQUENZIERUNG VON DNA

#### 2.2.5.11.1 Nichtradioaktive, automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten wurde zum einen im Service von Regine Weiss (IPB Halle) nach einer modifizierten Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden mit dem *SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ DNA Sequencing Kit* (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) oder dem *ThermiSequenase Fluorescent Labelled Primer Cycle Sequencing Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg) durchgeführt. Die Auftrennung und Analyse der Sequenzreaktion erfolgte mit einem DNA-Sequenzierautomaten LICOR 4000L bzw. LONGREADIR 4200 (MWG Biotech, Ebersberg). Zum anderen wurde der Sequenzierungsservice der Firma MWG Biotech (Ebersberg) genutzt.

#### 2.2.5.11.2 Computergestützte Sequenzdatenverarbeitung

Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte durch die Programme EditSeq, MapDraw, SeqMan II und MegAlign (DNA-Star Inc., USA). Sequenzvergleiche mit Datenbanken erfolgte mit Hilfe des BLAST-Algorithmus (Altschul and Lipman, 1990; Altschul *et al.*, 1997).

## 2.2.6 RNA-ANALYTIK

### 2.2.6.1 RNA-ISOLIERUNG

Gesamt-RNA wurde aus etwa 100 mg Pflanzen- oder Zellmaterial nach der TRIZOL<sup>®</sup>-Methode (Chomczynski and Sacchi, 1987) isoliert.

Das gefrorene und gemörserte Pflanzen- oder Zellmaterial wurde mit 1 ml TRIZOL<sup>®</sup>-Reagenz (0,8 M Guanidiniumthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Na-Azetat, pH 5,0, 5 % (v/v) Glycerin, 38 % (v/v) Phenol) homogenisiert und mit 0,2 ml Chloroform versetzt. Nach 10 min Zentrifugation (12.000 rpm, Eppendorf 5804R, 4 °C) wurde die RNA aus der oberen wässrigen Phase mit 1 Vol. Isopropanol bei RT (oder auch -20 °C) gefällt, präzipitiert (10 min, 4 °C, 12.000 rpm, Eppendorf 5804R) und mit 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20-30 µl Wasser aufgenommen.

### 2.2.6.2 RT-PCR

Die reverse Transkription von PolyA<sup>+</sup>-RNA und anschließende Amplifikation der cDNA zur Analyse der Transkriptakkumulation erfolgte mittels RT-PCR. Die reverse Transkription erfolgte aus 1 bis 10 µg Gesamt-RNA mit Hilfe des *RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits* (MBI

Fermentas, St Leon-Roth) oder des *SuperScript II First-Strand Synthesis Systems* for RT-PCR (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. 1 µl cDNA wurde anschließend in der PCR (Kapitel 2.2.5.5) eingesetzt.

### **2.2.7 AGAROSEGELELEKTROPHORESE**

Diese Gelelektrophorese erlaubt die Auftrennung von DNA und in denaturierenden Gelen auch von RNA in einer Matrix aus Agarose, bei der die Prozentigkeit die Maschenweite des Gels bestimmt. Durch das Anlegen einer Spannung an horizontale pufferüberschichtete Gele können die negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld nach ihrer Größe getrennt werden.

#### **2.2.7.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE ZUR AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN**

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von linearen DNA-Molekülen wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-2 % (w/v) in 1x TAE (40 mM Tris/HCl, 20 mM Essigsäure (Eisessig), 1 mM EDTA, pH 8,0; 500 ng/ml Ethidiumbromid) gewählt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1x TAE verwendet. Die DNA wurde mit 1x Ladepuffer (5 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,025 % (w/v) Bromphenolblau) gemischt und aufgetragen. Als Größenstandard dienten mit der Restriktionsendonuklease *Pst*I (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) gespaltene  $\lambda$ -DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) und die *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* bzw. der *GeneRuler™ DNA Ladder Mix* (beide MBI Fermentas, St. Leon-Roth). Die angelegte Spannung lag je nach Elektrophoresekammer zwischen 30 V und 130 V. Die aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe eines UV-Transilluminators ( $\lambda = 254$  nm) und einer Videokamera dokumentiert.

#### **2.2.7.2 DENATURIERENDE AGAROSE-GELELEKTROPHORESE**

Für die Auftrennung von RNA wurde ein denaturierendes Agarosegel (1 % (w/v) Agarose, 1x MOPS [20 mM MOPS, pH 7,0; 5 mM Natriumazetat, 1 mM EDTA], 6% (v/v) Formaldehyd) verwendet. Je 5-20 µg Gesamt-RNA wurden mit 1,5 Vol. RNA-Probenpuffer (50% (v/v) Formamid, 6% (v/v) Formaldehyd, 6% (v/v) Glycerin, 1x MOPS-Puffer, 0,04% (w/v) Bromphenolblau) 10 min bei 65 °C erhitzt, 5 min auf Eis abgekühlt, mit 1 µl Ethidiumbromidlösung (100 µg/ml) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 75 V (6 V/cm) in 1x MOPS-Laufpuffer durchgeführt. Unter UV-Licht konnte die RNA als Ethidiumbromidkomplex nachgewiesen werden.

### **2.2.8 CDNA-AFLP (AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)**

Die cDNA-AFLP-Analyse wurde nach einer modifizierten Methode von Vos und Bachem (Bachem *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1995) durchgeführt.

Die Elicitierungsversuche wurden an drei verschiedenen Tagen durchgeführt und bis zur selektiven Amplifikation (siehe Kapitel 2.2.8.6) unabhängig voneinander aufgearbeitet. Nach der Präamplifizierung wurden die Proben der einzelnen Tage zu einer gemeinsamen zusammengefasst.

### 2.2.8.1 GESAMT- UND M-RNA-ISOLATION

Aus *Petroselinum crispum* Suspensionskulturen, die für 1 und 4 h mit verschiedenen Elicitoren behandelt wurden, wurde Gesamt-RNA isoliert (siehe Kapitel 2.2.6.1).

150 µg dieser Gesamt-RNA wurden in 200 µl Wasser gelöst und mit 200 µl (1 mg) äquilibrierten Dynabeads<sup>®</sup> des *Dynabeads mRNA Purification Kits* (DYNAL Biotech GmbH, Hamburg) gemischt. Anschließend wurde nach Herstellerprotokoll verfahren, um mRNA zu isolieren.

### 2.2.8.2 cDNA-SYNTHESE

Die gesamte eluierte mRNA wurde für die Erststrangsynthese verwendet. Das Umschreiben der mRNA in cDNA wurde laut Herstellerangaben durchgeführt (First Strand Synthesis Kit, Invitrogen, Karlsruhe). Nach Beendigung der Erststrangsynthese wurde die cDNA 15 min mit RNase H (Invitrogen) behandelt. In einem Volumen von 40 µl, das 1x Zweitstrangpuffer, 5 U DNA Polymerase I (Invitrogen, Karlsruhe) und 0,5 mM dNTPs (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) enthielt, erfolgte die Zweitstrangsynthese 2 h bei 16 °C. Danach wurde das Volumen auf 200 µl aufgefüllt und mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol, 25:24:1, (v/v/v) extrahiert. Die wässrige Oberphase wurde mit 0,1 Vol. 3 M Na-Azetat, pH 5,2 und 2 Vol. Ethanol über Nacht bei -20 °C gefällt, zentrifugiert (15 min, 4 °C, 12.000 rpm, Eppendorf 5804R), in 70 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

### 2.2.8.3 RESTRIKTIONSVERDAU UND ADAPTERLIGATION

10 µl der doppelsträngigen cDNA wurden in 1x NEB3-Puffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, pH 7,9), 0,1 mg/ml BSA und 25 U *Taq*I-Restriktionsendonuklease in einem Volumen von 40 µl 2 h bei 65 °C gespalten. Die anschließende *Apo*I-Restriktionsendonukleasebehandlung erfolgte nach Zugabe von 10 µl *Apo*I-Gemisch (5 U *Apo*I, 1x NEB3-Puffer und 0,1 mg/ml BSA) 2 h bei 50 °C (Gesamtvolumen 50 µl). Nach Erhitzen der *Taq*I- und *Apo*I-Adapteroligonukleotidprimer (Sequenzen siehe Anhang A) in äquimolaren Mengen für 5 min auf 95 °C und anschließendem Abkühlen auf RT, wurde die Ligation unter Zugabe von 10 µl Adapter-Gemisch (1x NEB3-Puffer, 0,2 mM ATP (MBI Fermentas, St. Leon-Roth), 5 pmol *Apo*I-Adapter, 50 pmol *Taq*I-Adapter sowie 5 U T4 DNA Ligase (Invitrogen, Karlsruhe)) in einem Gesamtvolumen von 60 µl für 3 h bei 37 °C durchgeführt.

### 2.2.8.4 PRÄAMPLIFIKATION

10 µl der adapterligierten cDNA-Fragmente wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in 1x PCR-Puffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Triton X-100, pH 9,0), je 100 ng nicht-selektiven *Apo*I+0- und *Taq*I+0-Primer, 0,28 mM dNTPs und 0,5 µl *Taq*-/*Pfu*-DNA-Polymerase-Gemisch (1 U *Pfu*-DNA-Polymerase (Promega, USA) auf 160 U *Taq*-DNA-Polymerase (Promega, USA)) mittels PCR (2 min 94 °C, 20x {30 s bei 94 °C, 30 s bei 52 °C und 1 min bei 72 °C}, 7 min 72 °C, ∞ 4 °C) amplifiziert, anschließend 1:5 verdünnt und die Proben der einzelnen Tage gemischt (siehe 2.2.8).

### 2.2.8.5 RADIOAKTIVE MARKIERUNG DER *ApoI+2*-PRIMER

Die radioaktive Markierung der selektiven Primer erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 25 µl für 15 min bei 37 °C mit folgenden Substanzen: 50 ng des selektiven ApoI+2-Primers, 1x T4 Polynukleotidkinase-Puffer (Invitrogen, Karlsruhe), 25 µCi [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP und 5 U T4 Polynukleotidkinase (Invitrogen, Karlsruhe). Nach Hitzeinaktivierung (10 min, 65 °C) wurde der Ansatz bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.2.8.6 SELEKTIVE AMPLIFIKATION

3 µl der 1:5 verdünnten, voramplifizierten cDNA-Fragmente (Gemisch siehe 2.2.8) wurden in einem Reaktionsvolumen von 10 µl in 1x PCR-Puffer, 30 ng selektivem TaqI+2-Primer; 2 ng [ $\gamma$ -<sup>33</sup>P]ATP-markiertem, selektivem ApoI+2-Primer, 0,8 mM dNTPs; 1x PCR-Puffer; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 U Taq-Polymerase (Promega, USA) zugegeben, mit 10 µl flüssigem *Chill-Out-Wax* (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) überschichtet und mit Hilfe einer *Touchdown-PCR* (1,5 min 94 °C, 13x {30 s 94 °C, 30 s 65 °C [Reduktion der Temperatur pro Zyklus um 0,7 °C], 60 s 72 °C}, 30x {30 s 94 °C, 30 s 56 °C, 60 s 72 °C}, 7 min 72 °C, ∞ 4 °C) amplifiziert. Die Reaktion wurde mit 10 µl Ladepuffer (95 % (v/v) Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % (w/v) Bromphenol-Blau, 0,05 % (w/v) Xylencyanol-Gelb) gemischt und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

### 2.2.8.7 SEQUENZIER-GELELEKTROPHORESE

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (7 M Harnstoff, 1x TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,0); 6 % Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid (19:1, Roth, Darmstadt); 0,047 % (w/v) APS; 44 µl TEMED) mit Hilfe des BRL S2-Elektrophoresesystems (Invitrogen, Karlsruhe). 6 µl des Ansatzes aus der selektiven Amplifikation wurden nach 3 min Inkubation bei 94 °C aufgetragen. Der Gellauf erfolgte ca. 2 h bei 1800 V, 140 mA, 60 W mit 1x TBE-Puffer. Nach dem Lauf wurde das Gel auf Filterpapier (3MM, Whatman, England) transferiert und ca. 2 h bei 80 °C vakuumgetrocknet. Die Autoradiographie erfolgte durch Auflegen von BioMax MR Röntgenfilmen (Amersham Biosciences, Freiburg) für 3-14 Tage.

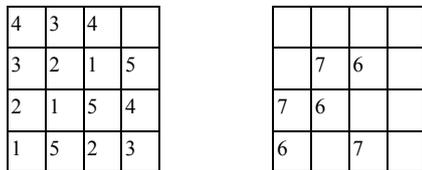
### 2.2.8.8 KLONIERUNG VON AFLP-FRAGMENTEN

Das Lösen der DNA aus dem Gelstück erfolgte durch Zugabe von 25 µl H<sub>2</sub>O und Inkubation bei 95 °C für 10 min oder wahlweise bei 37 °C über Nacht. Um das Fragment zu reamplifizieren wurde in einem Volumen von 50 µl eine PCR-Reaktion mit 1 µl eluiertem Fragment, je 100 ng spezifischen ApoI+2- und TaqI+2-Primern, 1x PCR-Puffer, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs und 1,25 U *Taq*-DNA-Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) eine *Touchdown-PCR* (siehe 2.2.8.6) durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden über ein 1 %-iges (w/v) Agarosegel aufgetrennt und die Banden mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (Qiagen, Hilden) aus dem Gel eluiert. Die Extraktion wurde laut Herstellerangaben durchgeführt und das Volumen für die Eluation der DNA betrug 20 µl. 2 oder 4 µl des Eluates wurden für die TOPO-Klonierung (vgl. 2.2.5) eingesetzt. Anschließend wurden

kompetente *E. coli*-Zellen (DH5 $\alpha$  oder TOP10F') mit 2  $\mu$ l des Ligationsansatzes transformiert (vgl. 2.2.4.1). Nach erfolgreicher Transformation wurden pro Ansatz vier Klone sequenziert.

### 2.2.9 MACROARRAY

Die unter 2.2.8.8 klonierten AFLP-Fragmente wurden für den *Macroarray* mit vektorspezifischen Primern (siehe Anhang B; Tabelle 7-3) amplifiziert, über eine NucleoFast<sup>®</sup>96 PCR-Platte (Machery-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben gereinigt und mit 50  $\mu$ l TE (10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,1 mM EDTA) eluiert. Die Konzentration der einzelnen Fragmente wurde durch Beladung eines 1 %-iges Agarosegels abgeschätzt. Es wurden Konzentrationen von ca. 100 ng/ $\mu$ l ermittelt. Das Aufbringen der DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran (Biodyne B, Pall, England) erfolgte durch einen Mikro GridII-DNA-Spotter (BioRobotics, GeneScan, Freiburg). Die durchschnittliche Größe eines Punktes betrug 400  $\mu$ m. Jedes Fragment wurde dreimal auf den Filter gespottet. Es wurde eine 4x4 Anordnung gewählt (siehe Abbildung 2.2).



**Abbildung 2.2: Schema zur Belegung der Nylonmembran.**

Die einzelnen DNA-Proben wurden in einer 4x4 Anordnung auf die Nylonmembranen aufgetragen.

Nach dem Spotten wurde die Nylonmembran so lange in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) gelegt, bis der Filter komplett feucht war. Anschließend wurde die Membran je zweimal 3 min in Denaturierungslösung, Neutralisierungslösung (1 M Tris/HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl), einmal 3 min in 2x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7,0) und einmal ca. 20 min in 2x SSC gewaschen, getrocknet und durch UV-Licht (Stratalinker<sup>™</sup> 1800, Stratagene, Heidelberg) auf dem Filter fixiert.

#### 2.2.9.1 PRÄPARATION DER SONDE

Für die Sonde wurden 10  $\mu$ g Gesamt-RNA (2.2.6.1) mit dem *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels *ProbeQuant<sup>™</sup> G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die radioaktive Markierung erfolgte wie unter 2.2.5.9 beschrieben mit 50  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dATP (ICN, Eschwege). Die nichteingebauten Nukleotide wurden wiederum unter Verwendung von *ProbeQuant<sup>™</sup> G-50 Micro Columns* (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C in der folgenden Hybridisierungslösung: 5x SSC, 0,1 % SDS, 5x Denhardt (100x Denhardt: 2 g BSA, 2 g PVP, 2 g Ficoll ad 100 ml H<sub>2</sub>O), 125  $\mu$ g/ml denaturierte Lachsspermien-DNA. Nach der Hybridisierung wurde der Filter dreimal 15 min mit 2x SSC, 0,1 % (w/v) SDS bei 65 °C gewaschen. Anschließend wurde die Membran mindestens eine Woche auf einen *Phosphor Screen* (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt. Die Entwicklung erfolgte mit dem *PhosphorImager* (Storm<sup>™</sup>, Amersham Biosciences, Freiburg).

### 2.2.9.2 AUSWERTUNG DER DATEN

Die Evaluierung der Hybridisierungssignale auf den einzelnen Filtern erfolgte mit Hilfe der *AIDA Image Analyzer* und *AIDA Array Compare* Software (Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt). Für die Hintergrundberechnung wurden um jeden Hybridisierungspunkt zwei Kreise (die Ringweite des äußeren war 100 µm größer als die des inneren Kreises) gelegt, aus denen die Hintergrundintensität berechnet wurde. Diese wurde anschließend von den gemessenen Intensitäten subtrahiert. Für den Vergleich der einzelnen Arrays (Elicitorbehandlungen gegenüber Wasserkontrolle) wurden die hintergrundkorrigierten Intensitäten anhand der Intensitäten der konstitutiv exprimierten Gene normalisiert (*AIDA Array Compare*). So wurde für jeden Filter ein Normalisierungsfaktor ermittelt, durch den die Daten dividiert wurden. Für die weiteren Berechnungen wurden nur die Signale verarbeitet, deren Intensität über der doppelten Standardabweichung der Hintergrundsignale lag. Das Programm bietet verschiedene Ausgabetafeln. Für diese Arbeit wurden die *probe tables* benutzt, bei denen für jeden Spot automatisch der Mittelwert der gespotteten Triplikate und dessen Standardabweichung gebildet wurde. Mit diesen Mittelwerten wurde dann das Verhältnis Elicitorbehandlung : Wasserkontrolle berechnet, das die Induktion anzeigt. Alle weiteren Analysen erfolgten mit dem Microsoft-Programm Excel.

Den Angaben in Tabelle 3-2 liegen folgende Beurteilungen zugrunde:

1. Die Expression eines Fragments ist induziert, wenn mindestens zwei der drei gebildeten Verhältnisse pro Triplikate und Hybridisierung größer oder gleich zwei sind.
2. Die Expression eines Fragments ist schwach induziert, wenn mindestens zwei von drei gebildeten Verhältnissen pro Triplikate und Hybridisierung größer oder gleich 1,8 sind.

### 2.2.10 RACE (**RAPID AMPLIFICATION OF CDNA ENDS**)

Die Amplifikation der 3'- und 5'-Enden der cDNA wurde mit dem *GeneRacer™ Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben aus *P. crispum*-Gesamt-RNA (Kapitel 2.2.6.1) durchgeführt. Für die RACE-Experimente wurde die gleiche RNA wie für die Sonden der *Macroarrays* benutzt. Damit später die cDNA-Bibliothek möglichst alle mRNAs der entsprechenden cDNA-AFLP-Fragmente enthielt, wurden die RNAs, die durch Isolation aus den elicitorbehandelten Zellen gewonnen wurden, miteinander vermischt. D.h. 1 µl der entsprechenden RNA (1, 4, 24 h von je Pep13, HrpZ<sub>PspH</sub>, LPS und H<sub>2</sub>O) wurden vermischt, 1:4 verdünnt, so dass eine Endkonzentration von 0,5 µg/µl vorlag. 2 µl dieses Gemisches wurden anschließend für die RACE-Experimente eingesetzt. Die genspezifischen RACE-Oligonukleotidprimer sind in Anhang B, Tabelle 7-2 aufgelistet. Es wurde folgendes PCR-Programm genutzt: 2 min bei 94 °C (Anfangsdenaturierung), 5x {30 s 94 °C, 2 min 72 °C}, 5x {30 s 94 °C, 2 min 70 °C}, 8x {30 s 94 °C, 30 s 68-61 °C (Reduktion der Temperatur pro Zyklus um 1,0 °C), 2 min 72 °C}, 25-30x {30 s 94 °C, 30 s 60 °C, 2 min 72 °C} und 10 min bei 72 °C (abschließende Verlängerung), ∞ 4 °C.

### **2.2.11 AFFYMETRIX-MICROARRAY**

Die *Microarray*experimente, die mit 10  $\mu\text{M}$  HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, 100  $\mu\text{g/ml}$  LPS, 1  $\mu\text{M}$  NLP<sub>Pp</sub> oder 1  $\mu\text{M}$  flg22 infiltrierten *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen durchgeführt wurden, waren Bestandteil der *AtGenExpress*-Initiative (<http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp>). Details für die Pflanzenkultivierung, Infiltration, RNA-Präparation, Aufbau des Arrays und Datensätze können im *AtGenExpress*-Bereich auf *The Arabidopsis Information Resource* im Internet nachgelesen und heruntergeladen werden ([http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=expression\\_setandid=1008080727](http://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?type=expression_setandid=1008080727)).

Affymetrix ATH1 Oligonukleotid-Gen-Arrays hoher Dichte wurden für Hybridisierungen in Triplikaten von jeder biologischen Probe durchgeführt. Eine umfassende Analyse zeitlicher Genexpression wurde durchgeführt, indem die absoluten Expressionswerte einer Skalierung mittels Affymetrix MAS5.0 Software unterzogen wurden. Die skalierten Expressionsmittelwerte wurden in die Genespring Software (Version 7.2; Agilent Technologies, Waldbronn) importiert. Vor der Datenanalyse wurden die Werte mit Hilfe einer gcRMA-Anwendung (Schmid *et al.*, 2005) normalisiert. Die Mittelwerte von drei Replikaten jedes Datensatzes wurden auf PAMP-induzierte differenzielle Genexpression analysiert. Datensätze mit Expressionsniveaus unter 50 wurden von der vergleichenden Analyse ausgeschlossen (Hintergrundniveau des Expressionsschwellwerts). Die Expression der Gene wurde als erhöht oder reprimiert eingestuft, wenn ihre mittleren Expressionswerte mindestens zweifach von denen nichtelicierter Kontrollproben abwichen.

Auf die gleiche Weise wurden auch die für diese Arbeit wichtigen *Microarray*analysen von Pep13-behandelten Col-0-Pflanzen durchgeführt und ausgewertet. Es wurden jedoch nur zwei Hybridisierungen mit unterschiedlichem biologischen Material überprüft. Infolgedessen wurden auch nur zwei Replikate jedes Datensatzes auf PAMP-induzierte differenzielle Genexpression analysiert.

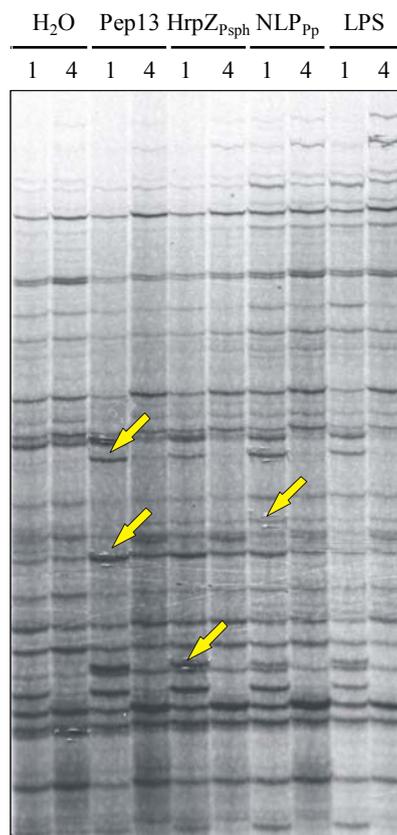
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 IDENTIFIZIERUNG PAMP-INDUZIERBARER GENE IN PETERSILIEZELLKULTUREN

Die Behandlung von Petersiliezellensuspensionskulturen mit Pep13, NLP<sub>Pp</sub> und HrpZ<sub>PspH</sub> löst schon nach kurzer Zeit eine Vielzahl an Abwehrreaktionen aus (Nürnberger *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1997; Blume *et al.*, 2000; Fellbrich *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2001a). Zu diesen Reaktionen gehört unter anderem die erhöhte Expression von Abwehrgenen. Ziel dieser Arbeit war es, herauszufinden, ob durch bakterielle PAMPs wie HrpZ<sub>PspH</sub> oder LPS und von oomycetenabgeleiteten Elicitoren wie Pep13 oder NLP<sub>Pp</sub> die Expression eines ähnlichen Satzes an Genen induziert wird oder ob gravierende Unterschiede bestehen.

##### 3.1.1 CDNA-AFLP-ANALYSE

Mittels cDNA-AFLP sollte zunächst eine möglichst große Anzahl an PAMP-induzierten Genen in Petersilie identifiziert werden.



**Abbildung 3.1: cDNA-AFLP-Analyse PAMP-induzierter Genexpression in Petersilie.**

Dargestellt ist eine repräsentative Primerkombination der cDNA-AFLP-Analyse von Petersiliezellensuspensionskulturen zu den Zeitpunkten 1 h und 4 h nach Behandlung mit 100 nM Pep13, 500 nM HrpZ<sub>PspH</sub>, 50 nM NLP<sub>Pp</sub>, 25 µg/ml LPS und H<sub>2</sub>O als Kontrolle. Gelbe Pfeile markieren induzierte Banden.

Als experimentelles System wurde eine Suspensionskultur von Petersiliezellen verwendet, der verschiedene PAMPs zugesetzt wurden. Diese PAMPs waren die oomycetenabgeleiteten PAMPs Pep13 und NLP<sub>Pp</sub> sowie die bakteriellen Elicitoren Hrp<sub>Z<sub>Psp</sub></sub> und LPS. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 4, 24 h) wurden die Zellen geerntet und für die cDNA-AFLP Analyse eingesetzt. Um das Problem der biologischen Variabilität zu reduzieren, wurden für die Analyse pro Zeitpunkt drei unabhängige Experimente vereinigt. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf Genen, die durch PAMP-Behandlung induziert wurden. Abbildung 3.1 stellt einen repräsentativen Ausschnitt eines cDNA-AFLP-Gels dar, in dem die induzierten Fragmente durch Pfeile markiert wurden.

### **3.1.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG**

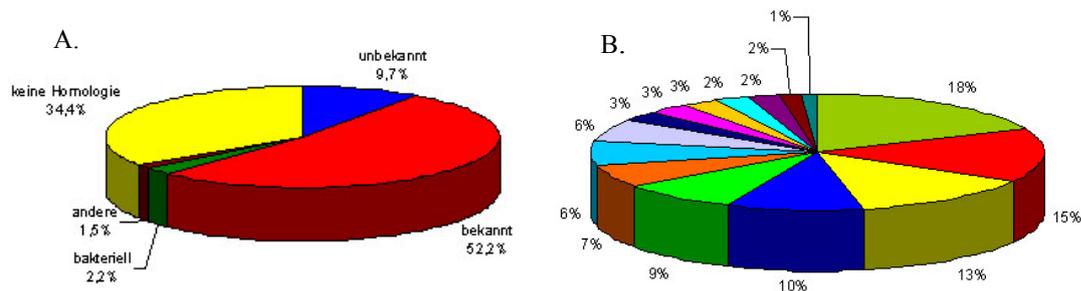
Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle 256 möglichen Primerkombinationen untersucht, von denen 211 ein komplexes Bandenmuster, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, aufwiesen (siehe Tabelle 3-1). Für 45 Primerkombinationen konnte kein Bandenmuster aufgezeigt werden (siehe Tabelle 3-1). Eine mögliche Erklärung liegt darin, dass unter den gewählten PCR-Bedingungen einzelne Primer nicht an die cDNA-Fragmente binden konnten oder in der eingesetzten cDNA keine Primerbindungsstellen vorhanden waren. Durchschnittlich wurden 50 Banden in einem Größenbereich von 20 bp bis 400 bp pro Primerkombination detektiert. Zusammenfassend wurden bei allen Primerkombinationen ca. 10550 Banden detektiert, von denen der größte Teil (92 %) ein gleich bleibendes Expressionsmuster aufwies. Bei 8 % der Fragmente konnte eine Transkriptakkumulation nach Elicitor-/PAMP-Zugabe festgestellt werden. Insgesamt wurden 837 Fragmente, deren Expressionsmuster sich nach Elicitorbehandlung verändert hatte, aus den Gelen ausgeschnitten und eluiert. Von diesen konnten 724 Fragmente durch PCRs mit selektiven Primern (ApoI+2 und TaqI+2, Sequenzen der Primer siehe Anhang A) amplifiziert werden. Nach dieser Reamplifikation wurden die Fragmente in den pCR2.1-Vektor kloniert und pro Konstrukt vier unabhängige Klone sequenziert. 715 der 724 reamplifizierten Fragmente konnten so erfolgreich kloniert und sequenziert werden. Dabei wurden aufgrund gleichen Laufverhaltens im Gel zum Teil mehrere verschiedene cDNAs aus einer Bande kloniert.

Die Auswertung der Sequenzdaten ergab, dass von den 2930 Sequenzen ca. 87 % (2538) evaluierbar waren. Von den restlichen 13 % (392) konnte keine auswertbare Sequenz gefunden werden. Diese 2538 Sequenzen wurden einer Datenbankanalyse mit Hilfe des BLASTX-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) unterzogen und sind in Tabelle 7-5 in Anhang D mit den dazugehörigen ermittelten Homologien zu bekannten Genen aufgelistet. Auf die Auflistung der E-Werte wurde verzichtet, da bei dieser Berechnung die Länge der Fragmente nicht berücksichtigt wird. So besitzen beispielsweise hoch homologe, aber kurze Fragmente (24-40 bp) einen niedrigeren E-Wert als weniger homologe, aber längere Fragmente (> 100 bp). Die Zuordnung der homologen Gene erfolgte daher nach dem ersten Treffer in der BLASTX-Analyse bzw. dem nächsten Homologen aus *Arabidopsis thaliana*.

Es stellte sich heraus, dass 34,4 % der Nukleotidsequenzen keine Homologie zu bekannten Proteinen aufwiesen. Von den verbleibenden 65,6 % (1666) konnten 94 % (1571) pflanzlichen, 3,5 % (56) bakteriellen Proteinen und 2,5 % (39) Proteinen aus anderen Organismen zugeordnet werden. 83 % (1307) der pflanzlichen Proteine hatten wiederum eine bekannte, die verbleibenden 17 % (264) eine unbekannt oder hypothetische Funktion (siehe Abbildung 3.2-A).

**Tabelle 3-1: Zusammenfassung der cDNA-AFLP-Analyse.**

	Anzahl	%
Mögliche Primerkombinationen	256	100
Getestete Primerkombinationen	256	100
Funktionierende Primerkombinationen	211	82
Primerkombinationen mit differenziell amplifizierten Banden	202	79
Summe der dargestellten Banden	ca. 10550	100
Durchschnittliche Bandenanzahl pro Primerkombination	ca. 50	
Differenziell amplifizierte Banden	850	8,0
Ausgeschnittene Fragmente	837	100
Reamplifizierte Fragmente	724	86,5
Klonierte und sequenzierte Fragmente (4 Klone/Fragment)	715	85,4
Sequenzierte Klone mit bekannter oder unbekannter Funktion	1666	100
Sequenzen aller Klone eines Fragments identisch	51	3
Sequenzen dreier Klone eines Fragments identisch	86	5
Sequenzen zweier Klone eines Fragments identisch	185	11
Vier verschiedene Sequenzen pro Fragment	834	50



**Abbildung 3.2: Klassifizierung der beim cDNA-AFLP identifizierten DNA-Sequenzen.**

A.: Für alle auswertbaren Sequenzen. B.: Für Sequenzen, die in A. als bekannt (1307) gekennzeichnet wurden: ■ andere metabolische Prozesse; ■ andere physiologische Prozesse; ■ andere zelluläre Prozesse; ■ Proteinmetabolismus; ■ abiotische oder biotische Stressantwort; ■ unbekannte Prozesse; ■ Elektronentransport und Energie; ■ andere biologische Prozesse; ■ Transport; ■ Zellorganisation; ■ Entwicklung; ■ generelle Stressantwort; ■ Signaltransduktion; ■ Transkription; ■ DNA- oder RNA-Metabolismus. Einteilung erfolgte mit Hilfe der funktionellen Kategorisierung auf [www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp).

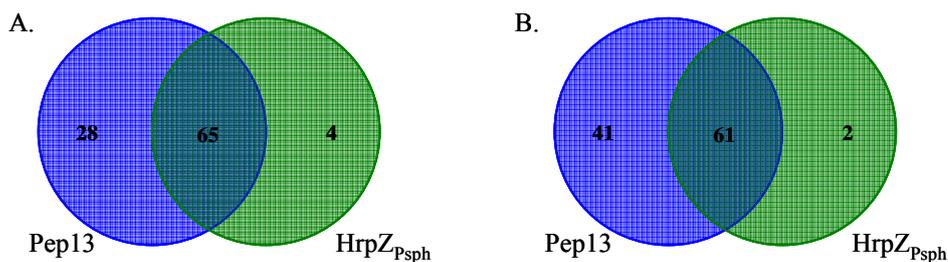
Die Behandlung mit Pep13, HrpZ<sub>PspH</sub>, NLP<sub>Pp</sub> und LPS induzierte die Transkription einer Anzahl von regulatorischen und strukturellen Genen, deren kodierte Proteine in verschiedene Prozesse involviert sind (Abbildung 3.2-B). Die Klassifizierung erfolgte mittels funktioneller Charakterisierung durch die *Arabidopsis*-Datenbank TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; [www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp](http://www.arabidopsis.org/tools/bulk/go/index.jsp)). Die meisten PAMP-induzierten Gene kodieren Proteine, die in anderen als den später genannten metabolischen (18%), physiologischen (15%) und zellulären Prozessen (13%), oder im Proteinmetabolismus (10%) zu finden sind. Eine hohe Anzahl könnte auch an der abiotischen oder biotischen Stressantwort (9%) beteiligt sein. Weiterhin spielen bestimmte induzierte Gene im Elektronentransport und Energiestoffwechsel (6%), in anderen biologischen Prozessen (6%), im Transport (3%), in der Zellorganisation (3%), in der Entwicklung

(3 %), in der generellen Stressantwort (2 %), in der Signaltransduktion (2 %), in der Transkription (2 %) und im DNA- oder RNA-Metabolismus eine Rolle. Die Funktion von ca. 7 % der kodierten Proteine konnte keinem Prozess zugeordnet werden (Abbildung 3.2-B).

Für diese Arbeit waren insbesondere die Gene bedeutend, deren kodierte Proteine in die abiotische und biotische oder generelle Stressantwort sowie in Signaltransduktionswege involviert sein könnten.

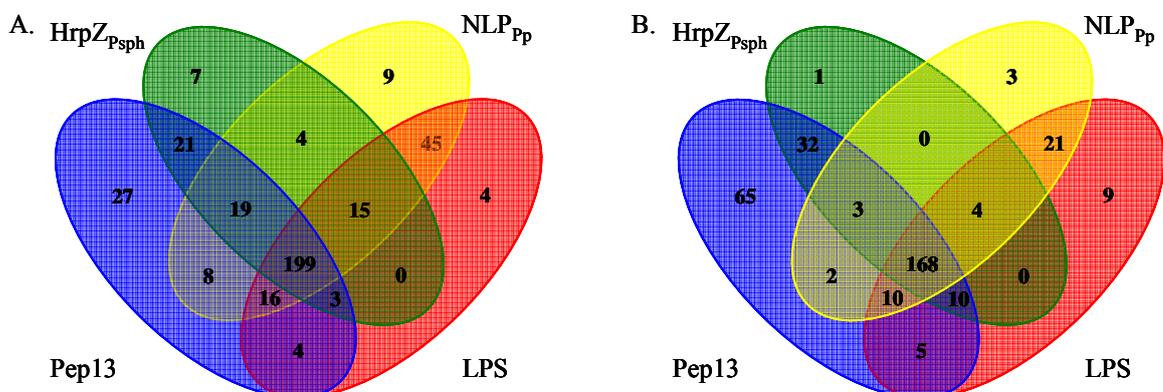
### 3.1.3 AUSWAHL UND CHARAKTERISIERUNG DER KANDIDATENGENE

Das Hauptanliegen für die vergleichenden cDNA-AFLP-Analysen von elicitierten Petersilie-zellsuspensionskulturen war unter anderem herauszufinden, ob durch verschiedenartige PAMPs die Expression gleicher oder unterschiedlicher Gene aktiviert wird. Wie in Abbildung 3.3 und Abbildung 3.4 zu erkennen ist, wird sowohl nach 1 h (65 bzw. 199) als auch nach 4 h (61 bzw. 168) die Expression der meisten Gene durch sowohl Pep13 als auch HrpZ<sub>PspH</sub> (Abbildung 3.3) oder alle vier PAMPs – Pep13, HrpZ<sub>PspH</sub>, NLP<sub>Pp</sub> und LPS – (Abbildung 3.4) induziert. Das deutet daraufhin, dass alle vier Stimuli einen ähnlichen Einfluss auf die Expression pflanzlicher Gene haben.



**Abbildung 3.3: Induktion der cDNA-AFLP-Fragmente pc1 bis pc250 durch Pep13 und HrpZ<sub>PspH</sub>.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der Fragmente, deren Expression nach 1 h (A.) oder 4 h (B.) Elicitorbehandlung in Petersilie-zellsuspensionskulturen nach cDNA-AFLP-Analyse durch beide Stimuli (Überlappung) oder durch die einzelnen Elicitoren Pep13 oder HrpZ<sub>PspH</sub> induziert war. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-6 bis 7-11 des Zusatzmaterials zu finden.



**Abbildung 3.4: Induktion der cDNA-AFLP-Fragmente pc251 bis pc837.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der cDNA-AFLP-Fragmente aus Petersilie-zellsuspensionskulturen, deren Genexpression nach 1 h (A.) oder 4 h (B.) durch die Elicitorbehandlung coreguliert bzw. durch einzelne Elicitoren spezifisch reguliert ist. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-12 bis 7-39 des Zusatzmaterials zu finden.

## 3.1.3.1 AUSWAHLKRITERIEN

Da es die Kapazität dieser Arbeit überstieg, alle Gene, deren Expression induziert war, funktionell zu charakterisieren, wurden bestimmte Kriterien festgelegt, nach denen eine Auswahl an Kandidaten vorgenommen werden sollte. Zunächst sollten solche Gene betrachtet werden, deren Expression elicitorspezifisch (1) zu sein scheint. Dabei wurden hauptsächlich Gene berücksichtigt, deren Expression eine Bedeutung für die Signalaufnahme und/oder -weiterleitung (2) haben könnten. Ein drittes Kriterium war der zeitliche Verlauf der Induktion, nämlich ob sie schnell und/oder transient (3) verlief.

Auf diese Weise wurden die in Tabelle 3-2 aufgezeigten Gene zunächst ausgewählt. Mit der Hilfe von cDNA-Macroarrays (siehe Kapitel 3.1.3.2) und RT-PCRs (siehe Kapitel 3.1.3.3) sollten die in der cDNA-AFLP-Analyse gewonnenen Ergebnisse überprüft werden. Anschließend wurde erneut festgelegt, mit welchen Fragmenten weiter gearbeitet werden sollte.

Tabelle 3-2: Ausgewählte Kandidatengene.

AFLP Fragment	Genbeschreibung	Bemerkung	AGI Code	Macroarray						RT-PCR								
				Pep13		HrpZ <sub>PspH</sub>		LPS		Pep13		HrpZ <sub>PspH</sub>		NLP <sub>Pp</sub>		LPS		
				1h	4h	1h	4h	1h	4h	1h	4h	1h	4h	1h	4h	1h	4h	
<i>AFLP-Fragmente mit bekannten oder putativen Rollen in der Signalerkennung</i>																		
<b>Rezeptorähnliche Kinasen</b>																		
pc36	putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	P:24h, gering	At1g14390	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
pc412-3	putative S-receptor kinase (see 414-2-4)	P: 1 h		-	↑	↑	-	↑	-									
pc492-2	RLK902 (see 611-2)	alle: 4 h	At3g17840	↑	-	↑	-	↑	-									
pc527-1	receptor related protein kinase-like (LRR)	alle: 1+4 h	At5g25930	-	-	-	-	-	-									
pc624-1	putative receptor-like protein kinase	P, N: 1 h		↑	↑	↑	↑	↑	↑									
pc752-1-2	receptor protein kinase	P: 1 h		-	-	-	-	-	-									
<b>Homologe zu disease resistance genes</b>																		
pc550-1-3	ATP binding (disease resistance protein (CC-NBS-LRR class))	H, N, L: 1 h	At5g43730	-	-	-	-	-	-	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	
<b>Homologe zu Genen, die für die Resistenz benötigt werden</b>																		
pc359-4	MLO8	P, L: 4 h	At2g17480	-	-	-	-	-	-									
<i>AFLP-Fragmente mit bekannten oder putativen Rollen in der Signalweiterleitung</i>																		
<b>Kinasen und Phosphatasen</b>																		
pc10	unknown protein (see 25)	P, H: 4 h	At2g39530	↑	-	↑	-	↑	-									
pc17-3	catalytic/ protein phosphatase type 2C		At1g79630	-	-	-	-	-	-									
pc25	unknown protein (see 20)	P, H: 4 h	At2g39530	-	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	-			↑	
pc55-2	ATP binding / casein kinase I	-	At5g44100	-	-	-	-	-	↑	-	↑	-	↑	-	↑		↑	
pc68-2	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	P,H:4+24 h, ↓	At2g17220	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	-		↑	
pc114-4	hydrolase/ protein serine/threonine phosphatase	P: 1 h	At1g13750	-	↑	-	↑	↑	↑									
pc207-3	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	P: 1 h	At1g16670	↑	-	↑	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑			↑	
pc228-2	<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> SHAGGY-RELATED KINASE 11 (ATSK11)	P,H: 1,4+24 h	At5g26751	-	-	-	-	↑	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
pc230-4	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	P: 24 h	At3g20860	-	-	-	-	-	-									
pc258-1	AGC2-1 (OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1; protein kinase)	P, H: 1+4 h	At3g25250	↑	-	↑	-	↑	↑									
pc263-1	ATP binding / protein kinase	N, L: 1 h	At1g06840	-	-	-	-	↑	-									
pc276-1	ATP binding / kinase/ protein kinase (see 564-1)	H: 1 h	At2g28590	-	↑	↑	-	↑	↑									
pc322	serine/threonine protein kinase-like	alle: 1+4 h	At5g35960	-	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
pc329-2	putative protein kinase	N, L: 1 h		-	-	↑	-	↑	-									
pc349-1	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding (see 654)	alle: 1+4 h	At4g27290	-	-	↑	-	↑	-									
pc359-1	ATP binding / protein kinase	P, L: 4 h	At4g27290	-	-	-	-	-	-									
pc417-4	ATSR1 (SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 1)	alle: 1+4 h	At5g01820	-	-	-	-	-	-									
pc451-1	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	alle: 1+4 h	At2g32850	-	-	-	-	-	-									
pc482-2	catalytic/ protein phosphatase type 2C (BUT no apo)	alle: 1+4 h	At4g33920	-	-	↑	-	↑	-	↑	-	↑	-			↑	-	
pc551	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	-	At5g15730	-	-	-	-	-	-									
pc554-2	PDF1 (ser/thr protein phosphatase 2A (regulatory chain))	alle: 1 h	At3g25800	-	-	-	-	-	-									
pc568-1	ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase	N, L: 1 h	At1g77280	-	-	-	-	↑	↑									
pc607-2	kinase (see 610-2) (putative wall-associated kinase)	alle: 1 h	At1g19390	-	-	-	-	↑	↑									
pc624-4	MAPKKK19 (see 628-1)	P, N: 1 h	At5g67080	↑	↑	↑	-	↑	↑									
pc629-1	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	P, H: 4 h	At1g74360	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑			↑	
pc661-2	ATP binding / carbohydrate binding / kinase/ protein kinase (see 219-3)	N, L: 4 h	At4g27300	↑	-	↑	-	↑	↑									
pc675-1	ATP binding / protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	alle: 1 h; P, H: 4 h	At3g57120	-	↑	-	↑	-	↑	?	?	?	?			?	?	



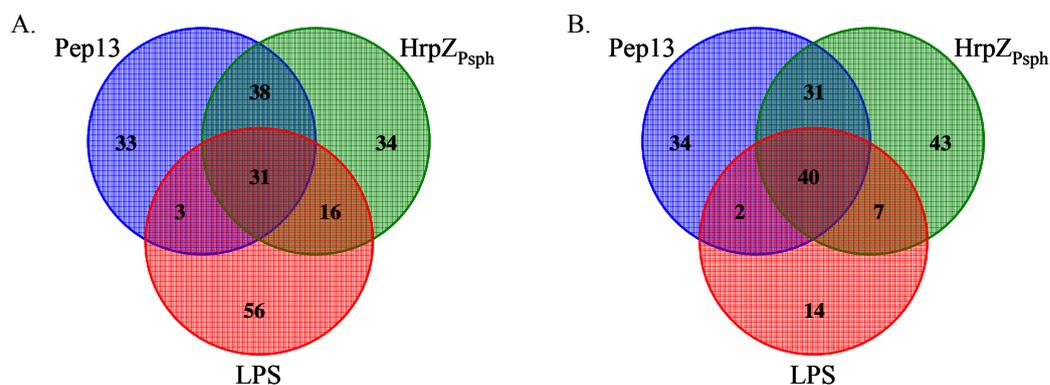
pc307-4	GTP binding ( <i>ARABIDOPSIS</i> RAB GTPASE HOMOLOG A1D)	-	At4g18800	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	↓	↑	↑	-
pc353	Esterase/lipase/thioesterase (see 358-3)	H, N, L: 1 h		-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pc452-2	Esterase/lipase/thioesterase (similar to late embryogenesis abundant protein)	alle: 1+4 h	At1g34340	-	↑	↑	↑	↑	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
pc477-3	ATPase, coupled to transmembrane movement of substances	alle: 1 h	At2g36380	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pc521-2	patatin-like protein 3 (see 399)	alle: 4 h		-	↑	-	↑	↑	↑	-	↑	-	↑	-	↑	-	↑
pc583-1	XPO1A (exportin protein family)	N, L: 1+4 h	At5g17020	-	-	-	-	-	-	?	?	?	?	-	-	-	?
pc586-1	unknown protein (see 764-4) (sec34-like family protein)	P, H, N: 1 h	At1g73430	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pc773-1	GTP binding / translation elongation factor	alle: 1+4 h	At2g31060	-	-	↑	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pc779-2	ATGCN4 (GENERAL CONTROL NON-REPRESSIBLE 4)	alle: 4 h	At3g54540	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pc815-2	putative 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	alle: 1 h	At1g06650	-	-	-	-	-	↑	-	-	-	-	-	-	-	-
pc819-3	stress enhanced protein 2 (SEP2)	alle: 1 h	At2g21970	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Aufgelistet sind die AFLP-Fragmente mit ihren Proteinbeschreibungen (aus BLASTX-Analyse), zu welchem Zeitpunkt und wodurch (P = Pep13, H = HrpZ<sub>PspH</sub>, N = NLP<sub>pp</sub>, L = LPS) ihre Expression im AFLP-Experiment induziert war, wenn möglich der *Arabidopsis* AGI Code, und ob die entsprechenden Fragmente auf den *Macroarrays* und/oder in der RT-PCR als induziert nachgewiesen werden konnten (↑ = induziert, ↑ = schwach induziert, - = keine Änderung, leeres Feld = PCR nicht durchgeführt oder Fragment nicht auf *Macroarray* gespottet, ? = nicht eindeutig bestimmbar).

### 3.1.3.2 ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS DURCH *MACROARRAYS*

Um die Expressionsdaten der durch die cDNA-AFLP-Analyse gewonnenen Resultate zu überprüfen, wurde vorerst die Methode der Filterhybridisierung (*Macroarray*) verwendet. Im Anschluss daran sollten für ausgewählte Fragmente RT-PCR-Analysen durchgeführt werden (siehe Kapitel 3.1.3.3).

Wie bereits in Kapitel 3.1.2 beschrieben, wurden pro cDNA-AFLP-Fragment vier unabhängige Klone sequenziert. Diese wurden mit vektorspezifischen Primern erneut amplifiziert und wie in Kapitel 2.2.9 erläutert, für die Herstellung der *Macroarrays* verwendet. Daneben wurden konstitutive Kontrollgene aus *P. crispum* aufgetragen, um anhand dieser Gene eine Normalisierung der einzelnen Arrays vornehmen zu können.



**Abbildung 3.5: Verifikation der in cDNA-AFLP-Analysen beobachteten Induktion der Genexpression durch *Macroarray*-Analysen.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der Gene, deren Expression nach 1 h (A.) oder 4 h (B.) Elicitorbehandlung in Petersiliezellensuspensionskulturen nach *Macroarray*-Analyse coexprimiert oder durch spezifische Elicitoren gesteigert war. In die Auswertung einbezogen sind alle diejenigen Fragmente, deren Verhältnis der Intensitätsmittelwerte der Elicitorbehandlung zur Kontrolle in drei verschiedenen Hybridisierungen mindestens zweifach induziert war. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-40 bis 7-53 des Zusatzmaterials zu finden.

Petersiliezellensuspensionskulturen wurden 100 nM Pep13, 500 nM HrpZ<sub>PspH</sub>, 25 µg/ml LPS oder H<sub>2</sub>O als Kontrolle zugegeben, die Zellen nach 1, 4 und 24 h geerntet und Gesamt-RNA daraus isoliert. Die aus der Gesamt-RNA synthetisierte cDNA wurde als Sonde für die Hybridisierung der Filter

verwendet (Kapitel 2.2.9.1). Pro Zeitpunkt und Behandlung wurden mindestens drei Hybridisierungen durchgeführt und jeweils drei davon evaluiert. Aufgrund von Inaktivität des rekombinant hergestellten NLP<sub>pp</sub> konnten die cDNA-AFLP-Daten nicht durch *Macroarrays* verifiziert werden.

Abbildung 3.5 zeigt eine Zusammenfassung der *Macroarray*-Experimente. Diese wurden, wie in Kapitel 2.2.9.1 beschrieben, an drei unterschiedlichen Tagen und mit verschiedenen Sonden durchgeführt. Die Signalintensitäten waren im Allgemeinen nicht sehr hoch und lagen auch nur geringfügig über den Hintergrundintensitäten. Deshalb war es schwierig zu entscheiden, wo eine erhöhte Genexpression vorlag. Für Abbildung 3.5 wurden nur die Fragmente benutzt, deren Mittelwerte der gespotteten Triplikate in allen drei Hybridisierungen mindestens zweifach induziert waren. Da knapp 2500 Fragmente gespottet wurden, erkennt man aus den beiden Abbildungen deutlich, dass nicht sehr viele Fragmente sich gleich verhalten haben, was aber hauptsächlich von der Qualität der Hybridisierungen abhängt und nicht an der Induktion selbst liegt. Aber auch hier wird deutlich, dass eine große Anzahl an Genen durch alle drei Elicitoren verstärkt exprimiert wird, was auch schon in Kapitel 3.1.3 erwähnt wurde.

Anhand der in Kapitel 2.2.9.2 aufgestellten Beurteilungen wurde die Expression, der in Tabelle 3-2 genannten Fragmente, als induziert oder schwach induziert eingestuft und durch entsprechende Pfeilgrößen in Tabelle 3-2 festgehalten. Es stellte sich heraus, dass die in den cDNA-AFLP-Analysen gefundene Induktion der Expression der meisten Gene auch durch die *Macroarray*-Experimente gezeigt werden konnte. Sie variierte aber für die meisten Kandidaten die Perzeptionskinetik und die Elicitorspezifität. So scheint z.B. keines der für Pep13- oder HrpZ<sub>PspH</sub>-spezifischen Gene nur durch den jeweiligen Elicitor erhöht exprimiert zu werden, sondern eher durch alle drei, wie am Beispiel von pc412-3 (putative S-Rezeptorkinase; Pep13-spezifisch) oder pc276-1 (Proteinkinase; HrpZ<sub>PspH</sub>-spezifisch) zu erkennen ist (Tabelle 3-2).

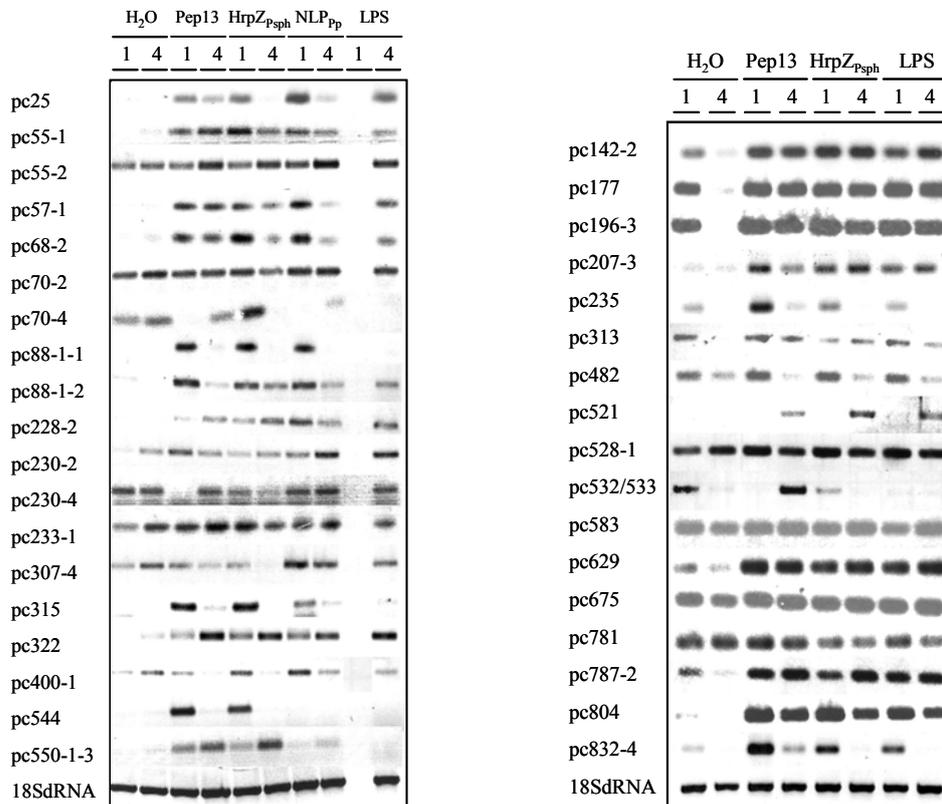
### 3.1.3.3 ÜBERPRÜFUNG DES EXPRESSIONSMUSTERS MITTELS RT-PCR

Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen sollten die im cDNA-AFLP und im *Macroarray* gewonnenen differentiellen Expressionsmuster zusätzlich verifiziert werden. Dazu wurde zum Teil die Gesamt-RNA benutzt, die schon für die *Macroarrays* hergestellt wurde (siehe Kapitel 2.2.9.1), in Ergänzung aber auch Gesamt-RNA aus neu durchgeführten Experimenten. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und 1 µl davon in PCRs eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.6.1 und 2.2.6.2). Die benutzten Primer sind aus den Sequenzierungen abgeleitet worden und in Anhang B in Tabelle 7-1 aufgeführt.

Die Ergebnisse der RT-PCR-Experimente sind zum einen in Abbildung 3.6 und zum anderen in Tabelle 3-2 dargestellt. Abbildung 3.6 zeigt eine Auswahl an erhaltenen RT-PCR-Ergebnissen, die deutlich macht, dass die ausgesuchten Kandidatengene unterschiedliche Expressionsmuster aufweisen. So gibt es z.B. die transient exprimierten Gene wie pc88-1-1, pc315, pc544, pc235 und pc832-4. Die Transkription anderer Gene wiederum wird durch alle Elicitoren zu beiden Zeitpunkten beeinflusst: pc55-1, pc55-2, pc57-1, pc68-2, pc88-1-2, pc142-2, pc207-3, pc228-2, pc322, pc629, pc787-2 oder pc804 und andere werden gar nicht differentiell reguliert wie pc583-3, pc675-1 und pc781-1.

Sieben von den im *Macroarray* erworbenen Expressionsmustern konnten auch durch RT-PCR-Analysen belegt werden, nämlich für die Fragmente pc528, einem möglichen Transkriptionsfaktor; pc68-2, einer Proteinkinase; pc142-2, einem leucinreichen und extensin-

ähnlichen Protein (LRX2); pc196-3, einer Ubiquitin-Proteinligase; pc521-2, einem patatinähnlichen Protein; pc629-1, einer weiteren Proteinkinase und pc832-4, einer calcium- und calmodulinabhängigen Proteinkinase. Andere RT-PCRs zeigten entweder ein von den *Macroarrays* verschiedenes Expressionsmuster, waren nun induziert (pc510-3, pc533-1, pc550-1-3, pc400-1-2, pc315, pc307-4, pc233-1 und pc230-2) oder waren nicht induziert (pc583-3, pc675-1, pc781-1).



**Abbildung 3.6: RT-PCR-Experimente zur Überprüfung der Genexpression.**

Petersiliezellkulturen wurden 100 nM Pep13, 500 nM HrpZ<sub>Psph</sub>, 50 nM NLP<sub>Pp</sub>, 25 µg/ml LPS oder H<sub>2</sub>O als Kontrolle zugegeben und nach 1 und 4 h Inkubation geerntet. Gesamt-RNA wurde aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und 1 µl davon in einer PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Als cDNA-Ladekontrolle diente die Amplifikation der konstitutiv exprimierten 18SdRNA.

#### 3.1.3.4 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE

Von den 100 ausgewählten Fragmenten, die in Tabelle 3-2 aufgelistet sind und deren Expression zu den aufgeführten Zeitpunkten in den cDNA-AFLP-Analysen sichtbar war, zeigten nur 69 eine Expressionsänderung in den *Macroarrays* und/oder RT-PCRs. Allerdings erfolgte die Induktion nicht unbedingt durch dieselben Elicitoren oder zum gleichen Zeitpunkt. Eine Ausnahme bildet Fragment pc521-2, das Ähnlichkeit zu dem patatinähnlichen Protein 3 aus Tabak aufweist. Es zeigt zumindest bei drei der vier Elicitoren in allen drei angewandten Methoden eine Expressionserhöhung nach 4 h (siehe Tabelle 3-2). Patatin ist das Hauptglykoprotein in Kartoffelknollen und zeigt eine Lipidacylhydrolase-Aktivität. Untersuchungen am patatinähnlichen Protein 3 aus Tabak (NtPat3) wiesen darauf hin, dass die *NtPat*-Genexpression spezifisch während der pflanzlichen Antwort auf mikrobielle Pathogene oder Elicitoren induziert wird (Dhondt *et al.*, 2002).

Da die Elicitorspezifität und die transiente Expressionssteigerung durch *Macroarray*- und RT-PCR-Analysen nicht bestätigt werden konnten, wurden für weitergehende Untersuchungen nur Gene ausgesucht, die Proteine möglicher Signaltransduktionswege kodieren und die nachfolgend kurz erläutert werden sollen. So weit nicht anders angegeben, wurden die Erklärungen der *Arabidopsis*-Datenbank *TAIR* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) entnommen.

(1) Fragment pc25 (alle vier cDNA-AFLP-Klone) hatte eine Länge von 121 bp und besaß Homologie zu einem möglichen integralen Membranprotein (At2g39530) aus *Arabidopsis thaliana*.

(2) Klone 36-1 und 36-4 umfassten je 114 bp, waren identisch und zeigten durch BLASTX-Analyse Homologie zur Sequenz einer putativen leucinreichen Transmembranproteinkinase (At1g14390).

(3) Fragment pc68 (Klone pc68-2, pc68-3, pc68-4) war 94 bp lang. Die Sequenzanalyse ergab eine Homologie zu einer Proteinkinase (At2g17220), die Serin- oder Threoninreste phosphorylieren kann.

(4) Der Klon pc88-1-1 umfasste 161 bp und hatte Ähnlichkeit mit GLR2.8 (*glutamate receptor family protein*; At2g29110), einem Mitglied der pflanzlichen Glutamatrezeptorfamilie, der intrazelluläre ligandenvermittelte Ionenkanalaktivität aufweist und in die Calciumhomeostase involviert sein könnte (Lacombe *et al.*, 2001).

(5) Der Klon pc207-3 zeigte eine Länge von 140 bp und hatte Homologie zu einer Proteinkinase (At1g16670).

(6) Der Klon pc228-2 war 235 bp lang. Der Sequenzvergleich mit der Datenbank zeigte eine Homologie zu einer SHAGGY-verwandten Kinase (At3g05840), die in die Meristemorganisation involviert ist (Dornelas *et al.*, 1999). SHAGGY (SGG) ist eine Ser/Thr Proteinkinase, die zu der Glykogensynthasekinase-3 (GSK-3) aus Säugetieren homolog ist. GSK-3 wurde ursprünglich als ein Regulator des Glykogenmetabolismus identifiziert, später wurde aber gezeigt, dass sie Transkriptionsfaktoren wie *c-jun* und *c-myc* phosphoryliert und herunterreguliert (Jonak and Hirt, 2002). In verschiedenen Organismen wurde nachgewiesen, dass SGG/GSK-3-Homologe in Signaltransduktionswege involviert sind, die das Schicksal der Zelle oder die Strukturbildung bestimmen (Dornelas *et al.*, 1999).

(7) Der Klon pc258-1 umfasste 281 bp und scheint zu AGC2-1 (OXII), einer Proteinkinase aus *Arabidopsis* (At3g25250) homolog zu sein, die auf oxidativen Stress reagiert (Anthony *et al.*, 2006). Die OXII-Kinaseaktivität selbst wird auch *in vivo* durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert. OXII wird nach Behandlung mit ROS oder Elicitoren für die vollständige Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) MPK3 und MPK6 benötigt und ist für mindestens zwei verschiedene ROS-vermittelte Prozesse notwendig: die Grundresistenz gegen eine Infektion mit *Peronospora parasitica* und das Wurzelhaarwachstum. Daraus folgt, dass OXII ein essenzieller Teil des Signaltransduktionsweges ist, der Signale, die durch oxidativen Stress ausgelöst wurden, mit verschiedenen nachfolgenden Reaktionen verbindet (Rentel *et al.*, 2004).

(8) Fragment pc315 (Klone pc315-1, pc315-3, pc315-4) hatte eine Länge von 147 bp und besaß Homologie zu einem Avr9/Cf-9 *rapidly elicited protein* 231 mit Glykosyltransferaseaktivität

(At1g19300). Der neueste Eintrag in der Datenbank (05.11.2006) beschreibt die Sequenz als zu einem Protein mit einer möglichen Galakturonosyltransferaseaktivität gehörend.

(9) Fragment pc322 (alle vier Klone) war 226 bp lang und ähnelt einer Ser/Thr-Proteinkinase (At5g35960).

(10) Fragment pc544 (alle vier Klone) zeichnete sich durch eine Länge von 260 bp aus. Für dieses Fragment konnte eine Sequenzhomologie zu einem Calmodulin-Bindeprotein (At4g31000) aus *A. thaliana* ermittelt werden. Calmodulin, ein ubiquitärer und multifunktionaler Calciumsensor, interagiert mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen und moduliert ihre Aktivität oder Funktion, sodass es verschiedene zelluläre Prozesse reguliert (Reddy *et al.*, 2002).

(11) Klon pc832-4 hatte eine Länge von 276 bp und zeigte Homologie zu CPK30 (At1g74740), einer calcium- und calmodulinabhängigen Proteinkinase (CDPK). CDPKs sind an vielen Prozessen beteiligt, die Calcium benötigen, so z.B. auch in der Pathogenabwehr (Cheng *et al.*, 2002).

### 3.1.4 RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE)

Da die oben ausgewählten Fragmente relativ kurz waren, sollten sie mit Hilfe der schnellen Amplifikation von cDNA-Enden (RACE) verlängert werden, um zusätzliche Sequenzinformationen zu erhalten und sie in weiteren Experimenten einsetzen zu können.

Ausgangsmaterial war die gleiche RNA, die auch für die Herstellung der *Macroarray*-Sonden verwendet wurde. Wie unter 2.2.10 beschrieben wurden die RNAs vor dem Einsatz in den RACE-Experimenten vermischt, damit ein breites Spektrum an cDNAs gebildet werden konnte. Von den Sequenzen der einzelnen Fragmente wurden genspezifische Primer abgeleitet, die dann mit den entsprechenden *Gene-Racer*-Primern an cDNAs der adapterligierten cDNA-Bibliothek binden konnten. Auf diese Weise konnten mit vorwärtsgerichteten genspezifischen und dem *Gene-Racer*-3'-Primer die 3'-Enden der Fragmente pc25, pc36-1, pc88-1-1, pc258-1, pc315 und pc322 und mit rückwärtsgerichteten genspezifischen und dem *Gene-Racer*-5'-Primer die 5'-Enden der Fragmente pc25, pc36-1, pc315 und pc322 amplifiziert werden (siehe Tabelle 3-3).

**Tabelle 3-3: Zusammenstellung der RACE-Experimente.**

RACE – Primer für Genbeschreibung	Sequenzen für				
	Fragment	5'	3'	cDNA	ORF
Putative integral membrane protein	pc25	339 bp	330 bp	656 bp	510 bp
Putative RLK	pc36-1			2371 bp	1397 bp
Putative protein kinase	pc68				
Putative ligand-gated ion channel (glutamate receptor)	pc88-1-1		1107 bp		
Putative Ser/Thr protein kinase	pc207-3				
Shaggy-related protein kinase	pc228-2				
Protein kinase family (OXI1)	pc258-1		585 bp	1444 bp	1202 bp
ACRE 231, glycosyl transferase family 8	pc315	411 bp	319 bp	648 bp	(435 bp)
Ser/Thr-like protein kinase	pc322	1133 bp		2205 bp	1310 bp
Calmodulin binding protein	pc544				
CDPK	pc832-4				

ORF: Offener Leserahmen (*open reading frame*).

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden sequenziert, mit Computerprogrammen wie SeqMan und EditSeq von DNASTar ausgewertet, theoretisch zu einer kompletten cDNA zusammengesetzt und die kodierende Sequenz herausgesucht. Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Sequenzen einer BLASTX-Analyse unterzogen. Mit Ausnahme von pc36-1 stimmten die ausgewerteten Ergebnisse mit den Sequenzangaben für die kurzen cDNA-AFLP-Fragmente überein.

Klone 36-1 und 36-4 umfassten je 114 bp, waren identisch und zeigten durch BLASTX-Analyse Homologie zur Sequenz einer putativen leucinreichen Transmembranproteinkinase (At1g14390). Nach erfolgreichen 5'- und 3'-RACE-Experimenten umfasste nun die vollständige Sequenz 2371 bp, wobei 1397 bp davon kodierend sind. Diese kodierende Sequenz zeigte nun aber in der BLASTX-Analyse eine stärkere Homologie zu einer anderen leucinreichen rezeptorähnlichen Kinase (At2g02220), welche wahrscheinlich ein Ortholog des Phytosulfokinrezeptors (*DcPSKRI*) aus der Karotte (*Daucus carota*) ist (Matsubayashi *et al.*, 2006). Weitere Ausführungen zu diesem Gen sind in Kapitel 3.3.2 zu finden.

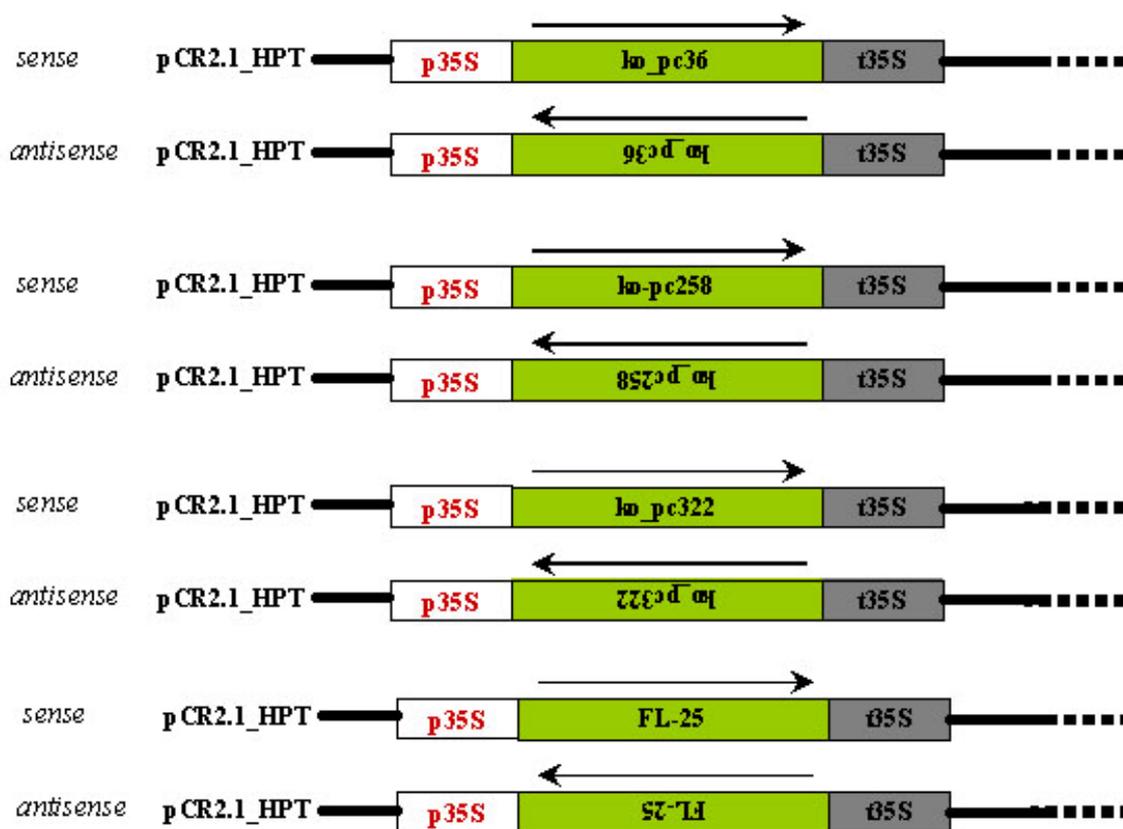
### **3.1.5 STABILE TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN**

Um herauszufinden, ob die durch die RACE-Eperimente vollständig erhaltenen Gene pc25, pc36, pc258 und pc322 eine Rolle beim Ca<sup>2+</sup>-Eintritt in die Zelle, bei der posttranslationalen Aktivierung der MAP-Kinasen, der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, der *PR* Genexpression oder der Phytoalexinbiosynthese spielen, sollten diese in Petersiliezellkulturen mit Hilfe von *antisense*- und *sense*-Konstrukten und des Partikelbeschusses mit der *Particle Inflow Gun (P.I.G.)* (Finer *et al.*, 1992) inaktiviert oder überexprimiert werden. Hintergrund für die Benutzung des Partikelbeschusses zur Transformation von Petersiliezellen war die Tatsache, dass auf diese Weise zum einen eine DNA-Kassette, die Apoäquorin kodiert, erfolgreich in Petersiliezellkulturen eingeführt worden war (Blume *et al.*, 2000). Durch den stabilen Einbau dieser DNA-Kassette konnte die zytosolische Calciumkonzentration unter Einfluss von Pep13 beobachtet und charakterisiert werden. Zum anderen konnten in einer früheren Arbeit zur Untersuchung der physiologischen Funktion von RBOH2 (*respiratory burst oxidase homolog*) in der elicitorvermittelten Signaltransduktion und der Aktivierung von Abwehrreaktionen stabile *rboh2-sense*- und *antisense*-Linien mit dieser Methode erzeugt werden (Zinecker, 2001). Zur technischen Kontrolle wurden deshalb zunächst Petersiliezellkultursuspensionskulturen mit der Apoäquorin-Kassette transformiert. Nachdem – zwar mit geringer Effizienz – transgene Linien erzeugt werden konnten, wurden diese mit dem pRT100-Vektor, in den erst einmal das Markergen für Hygromycin B und anschließend die verschiedenen *sense*- und *antisense*-Konstrukte eingebaut wurden (Kapitel 2.2.4.2.4), transformiert. Als Kontrolle wurde außerdem der von Dr. Justin Lee (IPB Halle) zur Verfügung gestellte Vektor pCR2.1\_HPT eingeführt.

Für die Herstellung der *sense*- und *antisense*-Konstrukte wurde nur für das Fragment pc25 die vollständige DNA-Sequenz der einzelnen Gene genutzt. Für die anderen drei Fragmente (pc35, pc258, pc322) wurde ein ca. 400 bp großer Bereich des 5'-Terminus verwendet. Nachdem die vier verschiedenen *sense*- und *antisense*-Konstrukte (siehe Abbildung 3.7) zunächst in den Vektor pRT100\_HPT integriert worden waren, wurden Petersiliezellen, mit der entsprechenden Plasmid-DNA mit Hilfe des Partikelbeschusses transformiert (Kapitel 2.2.4.2). Neben den Vektoren mit den *sense*- und *antisense*-Konstrukten wurden die Petersiliezellen auch mit den leeren Plasmiden pRT100\_HPT und pCR2.1\_HPT transformiert. Pro *sense*- und *antisense*-Konstrukt wurden ca. 65, für den Vektor

pRT100\_HPT ca. 100 und den Vektor pCR2.1\_HPT ca. 25 Petersiliezellplatten transformiert. Davon konnten zwei transgene Petersiliezellkultursuspensionskulturen, die den Vektor pCR2.1\_HPT enthielten, generiert werden.

Da die Transformation nur mit dem zur Kontrolle mitgeführten Vektor pCR2.1\_HPT erfolgreich war, sollte er als Ausgangsvektor für eine neue Transformation dienen. Aus diesem Grund wurden, wie in Kapitel 2.2.4.2.5 beschrieben, der CaMV-35S-Promotor aus dem Vektor pB2GW7 und der CaMV-35S-Terminator in den Vektor pCR2.1\_HPT kloniert. Dadurch entstand der Vektor pCR2.1\_HPT\_35S. Über die eingefügte *Sma*I-Schnittstelle konnten nun die verschiedenen *sense*- und *antisense*-Konstrukte eingeführt und die Petersiliezellen erneut transformiert werden. Es konnte leider keine transgene Petersiliezelllinie erzeugt werden. Woran es gelegen hat, konnte im Zuge dieser Arbeit nicht herausgefunden werden. Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Zellkulturen aufgrund der jahrelangen Kultivierung verändert und ihre leichte Transformierbarkeit verloren haben.



**Abbildung 3.7:** Schema für die Herstellung der *sense*- und *antisense*-Konstrukte.

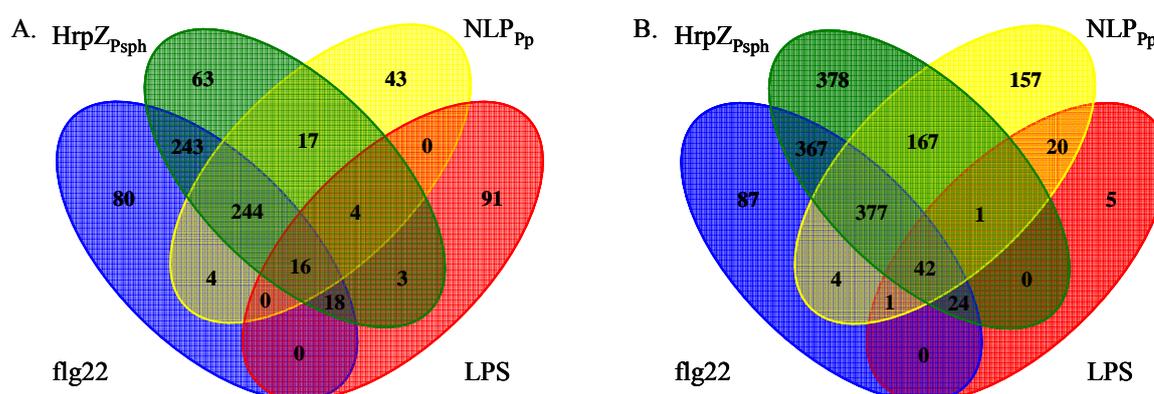
Anstelle des pCR2.1\_HPT wurde zunächst der Vektor pRT100\_HPT verwendet. Der CaMV-35S-Promotor (p35S) ist weiß dargestellt, der CaMV-35S-Terminator (t35S) ist grau und die eingefügten Konstrukte sind grün unterlegt. Die Pfeilrichtung steht für die Richtung, in der die Fragmente eingefügt wurden.

### 3.2 VERGLEICHENDE ANALYSE VON PAMP-INDUZIERTEN GENEN IN PETERSILIE UND *ARABIDOPSIS*

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war der Vergleich von PAMP-induzierbaren Genen in zwei verschiedenen Organismen (Petersilie und *Arabidopsis*) und unterschiedlichen Systemen (Zell-suspensionskulturen für Petersilie, Pflanzen und Protoplasten für *Arabidopsis*). Dazu wurden zunächst die *Microarray*-Daten der *AtGenExpress*-Initiative betrachtet, in der Daten von Experimenten mit *Arabidopsis*-Blättern nach Behandlung mit verschiedenen PAMPs oder Pathogenen zusammengefasst wurden. Dann wurden diese Daten mit *Microarray*-Analysen verglichen, bei denen *Arabidopsis*-Protoplasten mit denselben PAMPs behandelt wurden (unveröffentlichte Daten aus Jen Sheen's Labor, Massachusetts General Hospital, Boston, USA). Im Anschluss daran wurden die gewonnenen *Arabidopsis*-Ergebnisse mit denen aus Petersilie verglichen. Die verwendeten Daten wurden nicht mit einem statistischen Programm wie ANNOVA berechnet, sondern wurden, wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben, nur skaliert und anschließend normalisiert.

#### 3.2.1 VERGLEICH DER *MICROARRAY*-DATEN VON *ARABIDOPSIS*-PFLANZEN UND PROTOPLASTEN

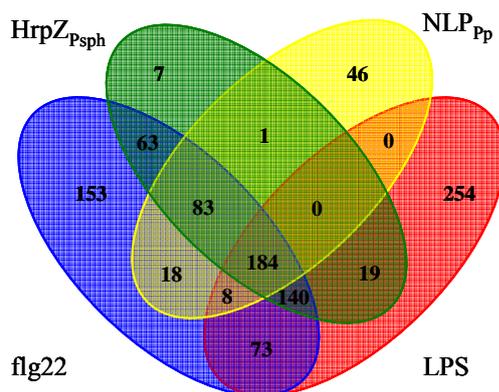
Durch vergleichende cDNA-AFLP-Analysen von PAMP-behandelten Petersiliezell-suspensionskulturen konnte einen Einblick in ihr Expressionsmuster gewonnen werden. Für die Untersuchungen in *Arabidopsis*-Pflanzen und Protoplasten wurden Affymetrix ATH1 Arrays genutzt. Diese enthalten 22.746 DNA-Proben, die mehr als 80 % der annotierten Gene in *Arabidopsis thaliana* repräsentieren. Um PAMP-induzierte Veränderungen im Transkriptom von *Arabidopsis*-Pflanzen aufzuklären, wurden *Microarray*-Experimente der *AtGenExpress*-Initiative, die unter <http://www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp> zu finden sind (*Response to bacterial*- (flg22, HrpZ<sub>PspH</sub> and LPS) and *oomycete-derived* (NLP<sub>Pp</sub>) *elicitors*), ausgewertet.



**Abbildung 3.8: PAMP-induzierte Genexpression in *A. thaliana*-Pflanzen.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der Gene, deren Expression nach 1 h (A.) oder 4 h (B.) PAMP-Infiltration in *Arabidopsis*-Blättern nach cDNA-*Microarray*-Analyse durch einen oder mehrere PAMPs induziert war. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-54 bis 7-78 des Zusatzmaterials zu finden.

Eine erste Analyse der PAMP-spezifischen Transkriptomprofile offenbarte zum einen zwischen den bakteriellen PAMPs flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> einen hohen Anteil der Coexpression, aber auch zwischen diesen beiden und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>, einem oomycetenabgeleiteten PAMP. Im Gegensatz dazu steht das bakterielle LPS, das nach 1 h hauptsächlich ein eigenes Set an Genen induzierte (Abbildung 3.8). Durch die Behandlung mit LPS wurden aber vergleichsweise wenig Gene induziert. Nach 1 h waren es 132 (0,58 % aller Gene des Arrays), nach 4 h nur noch 93 (0,4 %). Im Gegensatz dazu war nach 1 h die Expression von 604 Genen (2,66 %) durch flg22, 610 (2,68 %) durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und 328 (1,44 %) durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub> verstärkt ausgeprägt. Nach 4 h waren es deutlich mehr Gene, deren Expression erhöht vorlag: 903 (4 %) durch flg22, 1357 (6 %) durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und 769 (3,4 %) durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>. Durch alle vier PAMPs wurde die Transkriptakkumulation von 16 (1 h) bzw. 43 (4 h) Genen gesteigert. Bei der Betrachtung von beiden Zeitpunkten stellte sich heraus, dass nur die Expression von drei Genen, nämlich MLO12, ein mögliches calmodulinverwandtes Protein und ein exprimiertes Protein, sowohl nach 1 als auch nach 4 h induziert war. Es ist interessant, dass zu den Genen, die zu beiden Zeitpunkten verstärkt gebildet werden, ein MLO-Protein und ein calmodulinverwandtes Protein gehören. Kim und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die MLO-Aktivität durch Calmodulinbindung gesteigert wird und das Calmodulin wahrscheinlich eine Aktivatorrolle in *Mlo*-vermittelter Abwehrunterdrückung einnimmt (Kim *et al.*, 2002b).



**Abbildung 3.9: PAMP-induzierte Genexpression in *Arabidopsis*-Protoplasten.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der Fragmente, deren Expression nach 1h PAMP-Behandlung in *Arabidopsis*-Protoplasten nach cDNA-Microarray-Analyse durch einen oder mehrere PAMPs induziert war. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-79 bis 7-91 des Zusatzmaterials zu finden.

Für die Aufklärung von PAMP-induzierten Veränderungen des Transkriptoms in *Arabidopsis*-Protoplasten wurden uns vorläufige Daten von Jen Sheen zur Verfügung gestellt. Es wurden die gleichen PAMPs benutzt, die auch in den Pflanzen verwendet wurden, wobei jedoch nur nach 1 h geerntet wurde, um die frühen Antworten auf PAMP-Stress zu analysieren. Abbildung 3.9 zeigt deutlich, dass die Expression eines großen Anteils aller Gene durch alle vier PAMPs verstärkt hervorgerufen wurde (184, ca. 17,5 % aller induzierten Transkripte). Insgesamt wurde durch flg22 die Expression von 722 Genen (3,2 % aller Gene des Arrays), durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> die von 497 (2,2 %), durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub> die von 339 (1,5 %) und durch LPS die Expression von 680 Genen (3 %) angeregt.

Von den 16 Genen, die in Pflanzen nach 1 h in allen PAMP-Behandlungen erhöht exprimiert wurden, wurden fünf auch in den Protoplasten verstärkt transkribiert (siehe Tabelle 3-4). Eins davon

wird auch nach 4 h durch alle vier PAMPs induziert, nämlich das mögliche calmodulinverwandte Protein (At3g01830).

**Tabelle 3-4: Auflistung der Gene, deren Expression nach 1 h PAMP-Behandlung in *Arabidopsis*-Pflanzen und -Protoplasten durch alle vier PAMPs induziert war.**

Array Code	AGI Code	Beschreibung
265670_S_AT	At2g32210	expressed protein
258947_AT	At3g01830	calmodulin-related protein, putative
254408_AT	At4g21390	S-locus lectin protein kinase family protein
245209_AT	At5g12340	expressed protein
250149_AT	At5g14700	cinnamoyl-CoA reductase-related

Betrachtet man die PAMP-induzierten Gene etwas eingehender, kann man wie Qutob *et al.* (2006) feststellen, dass sowohl in *Arabidopsis*-Protoplasten als auch in *Arabidopsis*-Pflanzen zum einen durch jeden der einzelnen Elicitoren zahlreiche Gene, die rezeptorähnliche Proteinkinasen, *disease resistance-like proteins* und pathogenitäts-/abwehrverwandte Proteine kodieren, induziert wurden und dass zum anderen die Expression der meisten Gene von mehr als einem PAMP beeinflusst wurde (siehe Tabelle 3-5) (Qutob *et al.*, 2006).

So konnten 34 Gene, die leucinreiche rezeptorähnliche Proteinkinasen (LRR-RLKs) kodieren, identifiziert werden, deren Genexpression auf die Zugabe von flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, NLP<sub>Pp</sub> und/oder LPS in Pflanzen und/oder Protoplasten reagiert. Von diesen LRR-RLKs scheinen nur zwei PAMP-spezifisch zu reagieren und zwar At4g28490 und At5g65240 auf die Behandlung mit HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Ansonsten finden sich einige, die in Pflanzen durch mehrere PAMPs nur nach 1 h (At1g17750, At1g35710) induziert wurden und andere, die nur nach 4 h (At1g09970, At1g29750) zu sehen waren. Die Expression von At2g13790 wiederum wird durch diese PAMPs hauptsächlich in Protoplasten ausgelöst.

Andere Gene, deren Expression durch die Behandlung mit flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, NLP<sub>Pp</sub> und LPS beeinflusst wurde, waren solche, die Proteinkinasen, Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie, verschiedene PR- oder abwehrrassoziierte Proteine wie Chitinasen, Peroxidasen, Protease-Inhibitoren und biosynthetische Enzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (Phenylalanin-Ammonium-Lyase 1 und 4-Cumarat-CoA-Ligase 1 und 2), und Proteine, die in die Phytoalexinbiosynthese oder in den Hormonhaushalt involviert sind, kodieren.

Von den 38 Genen, die in Qutob *et al.* (2006) in Tabelle 1 nur NLP<sub>Pp</sub> und nicht flg22 responsiv waren, werden nur neun nicht durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> oder LPS in Pflanzen beeinflusst. Von den neun Genen werden aber wiederum vier in Protoplasten durch flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> oder LPS induziert: ein *disease resistance family protein* (At1g22900) durch flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und LPS, eine Chitinase (At2g43570) durch alle vier PAMPs, Cytochrom P450 71B1 (PAD3, At3g26830) und ein Ethylenresponsives Protein (At1g09740) durch LPS.





At3g53260	Phenylalanine ammonia-lyase 2 (PAL2)	PAL2	4,0	-	-	3,2	-	5,1	3,2	-	3,8	2,8	-	-
At4g39030	enhanced disease susceptibility 5 (EDS5)	EDS5/SID1	-	-	-	-	-	4,9	-	-	4,7	-	-	-
At1g74710	salicylic acid induction deficient 1 (SID1)													
At1g74710	Isochorismate synthase / mutase	ICS1/SID2/ EDS16	-	-	-	-	-	7,9	-	-	5,9	-	-	-
At1g01480	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 / ACC synthase 2 (ACS2)	ACC1	2,0	4,5	-	-	5,1	-	-	2,8	-	2,3	-	-
At1g05010	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase / ethylene-forming enzyme (ACO) (EAT1)	EAT1	-	-	-	-	-	3,4	-	-	2,1	-	-	-
At4g11280	1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 6 / ACC synthase 6 (ACSACS6)		2,6	-	2,8	2,1	-	7,2	-	-	6,2	4,0	-	-
At1g05710	ethylene-responsive protein		-	2,1	3,7	-	-	2,6	11,1	-	3,9	-	-	-
At1g09740	ethylene-responsive protein		-	-	-	-	-	-	-	-	2,5	2,1	-	-
At4g17490	ethylene-responsive element-binding protein		-	-	9,4	-	-	6,5	-	-	4,2	-	-	-
At5g44210	ethylene-responsive element-binding factor 9 (ERF9)	ERF9	-	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-	-
At5g47230	ethylene-responsive element-binding factor 5 (ERF5)	ERF5	4,3	3,4	-	2,1	5,0	6,8	-	2,4	3,1	4,3	-	-
At5g54510	Auxin-responsive GH3 protein	DFL-1	3,2	-	4,4	2,5	-	8,1	2,8	-	4,8	2,8	-	-
<i>andere</i>														
At2g39530	integral membrane protein		8,6	-	-	6,1	-	-	3,7	-	22,7	4,3	-	4,8
At4g15610	integral membrane family protein		-	-	8,7	-	-	8,8	-	-	2,3	-	-	2,4
At3g01830	putative calmodulin-related protein		7,5	3,7	28,9	5,3	4,3	65,3	2,8	3,1	4,6	3,7	2,3	2,2

Angegeben sind die Verhältnisse der skalierten und normalierten Signalstärken von PAMP-behandelten Proben und den dazugehörigen Kontrollen für die Expression in Pflanzen (gemittelt von drei unabhängigen Experimenten) und Protoplasten (erstes Experiment). Expressionsänderungen, die kleiner als zweifach zwischen PAMP-Behandlung und Kontrolle waren, sind durch ein (-) gekennzeichnet.

Von den 186 Genen, die in dieser Tabelle gegenüber gestellt sind, wird die Expression von 116 (62 %) dieser Gene sowohl in Pflanzen als auch in Protoplasten durch die Zugabe von PAMPs erhöht. Die Expression der restlichen 70 Gene wird nur in Pflanzen induziert. Von den hier ausgewählten Genen wird keines nur in Protoplasten verstärkt transkribiert. Die Tabelle zeigt auch deutlich, dass die meisten Gene (173) PAMP-unspezifisch und im Gegensatz dazu nur 13 (7 %) PAMP-spezifisch reguliert werden. Davon werden zehn nur durch NLP<sub>Pp</sub>, zwei durch HrpZ<sub>PspH</sub> und eins durch flg22 beeinflusst.

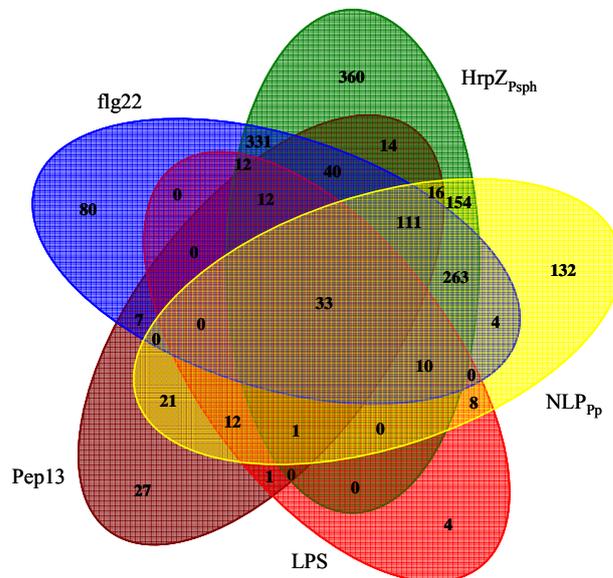
### 3.2.2 VERGLEICH DER PAMP-INDUZIERTEN GENEXPRESSION IN PETERSILIE UND ARABIDOPSIS

Sowohl in Petersilie als auch in *Arabidopsis thaliana* konnte durch den Einfluss der PAMPs Pep13 oder flg22, HrpZ<sub>PspH</sub>, NLP<sub>Pp</sub> und LPS generell die Expression eines breiten Spektrums an Genen, die in mögliche Signalwege von Abwehrreaktionen involviert sind, aktiviert werden. Da es aufgrund des nichtsequenzierten Genoms von Petersilie sehr schwer war, die Veränderungen im Transkriptom beider Organismen durch die Behandlung mit PAMPs zu vergleichen, wurde eine Auswahl an induzierten Genen (ca. 2/3 davon sind putative Proteinkinasen) aus *Petroselinum crispum* getroffen, deren Expression der der Homologen aus *Arabidopsis thaliana* gegenüber gestellt wurde.

Die in Tabelle 3-6 aufgeführten Gene lassen sich in drei Gruppen einteilen, die von der Anzahl etwa gleich groß sind, nämlich (1) Gene, deren Expression in Blättern und Protoplasten von *Arabidopsis* induziert wird, (2) Gene, die entweder hauptsächlich in den Blättern oder in den Protoplasten verstärkt transkribiert werden oder (3) Gene, deren Expression sich weder in Blättern noch in Protoplasten erhöht, sondern konstitutiv ist oder reprimiert wird. Den Gruppen 1 und 2 sind auch die in Kapitel 3.2.4 beschriebenen „Ausgewählten Gene“ zugeordnet. Daraus folgt, dass ca. 2/3 der in Petersilie durch HrpZ<sub>PspH</sub>, NLP<sub>Pp</sub> oder LPS induzierten Gene (von den hier betrachteten) auch in *Arabidopsis* durch diese PAMPs beeinflusst werden, also artübergreifend konserviert sind. Dies zeigt, dass nur etwa 1/3 der Antworten eines Transkriptoms auf die Behandlung mit PAMPs artspezifisch sind.



eingesetzt. Die Experimente wurden nur zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Um einen Überblick zu bekommen, wurden die gewonnenen Ergebnisse mit denen der *AtGenExpress*-Initiative (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.2) in einem Venn-Diagramm zusammengefasst (siehe Abbildung 3.10). Diesem Diagramm zufolge wurde durch Pep13 eine ganze Reihe an Genen induziert, deren Expression auch durch die anderen PAMPs angeregt wurde.



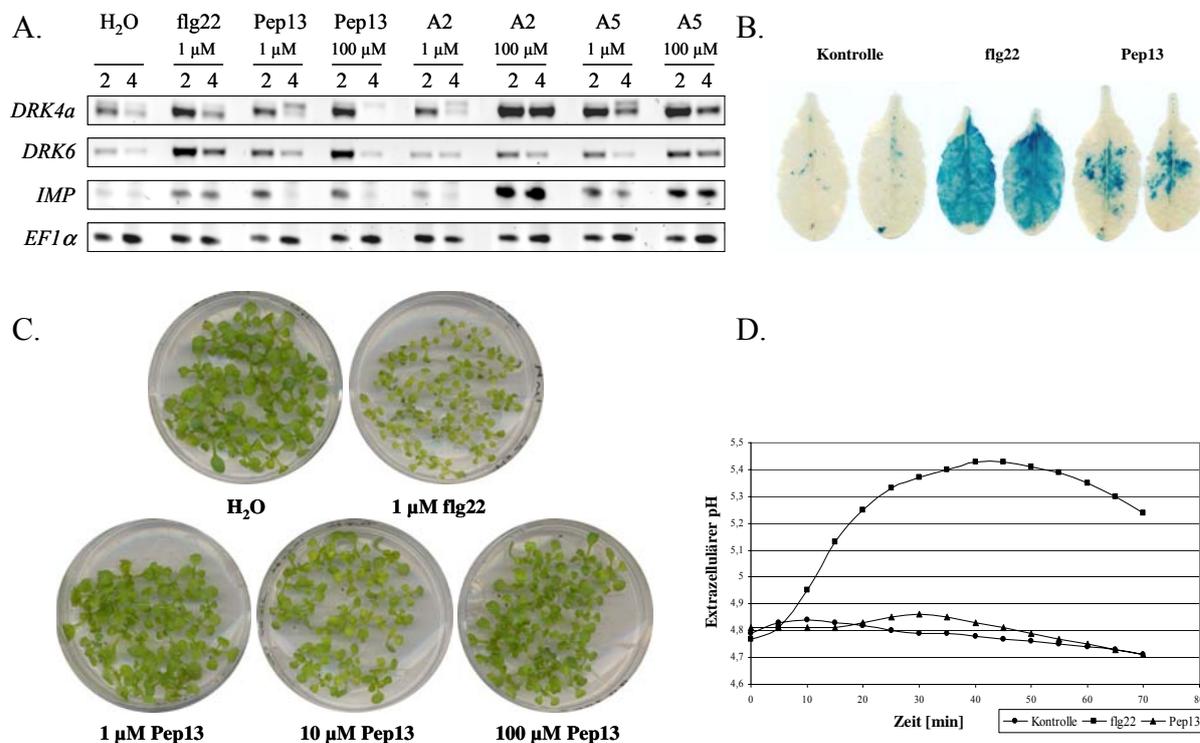
**Abbildung 3.10: Vergleich der durch Pep13 und weiterer PAMPs hervorgerufenen Induktion der Genexpression in *Arabidopsis*.**

Gezeigt ist in einem Venn-Diagramm jeweils die Anzahl der Gene, deren Expression nach 4 h PAMP-Behandlung in *Arabidopsis*-Blättern nach cDNA-Microarray-Analyse durch einen oder mehrere PAMPs induziert war. Die Auflistung der entsprechenden Gene ist in Tabellen 7-92 bis 7-114 des Zusatzmaterials zu finden.

Da die bei den *Microarray*-Experimenten eingesetzte Konzentration von 100  $\mu$ M Pep13 ziemlich hoch war, sollte mit Hilfe von semiquantitativen RT-PCRs und zwei in Petersilie inaktiven Strukturanaloga von Pep13 überprüft werden, ob die Induktion selektiver Markergene von Pep13 selbst stammt. Die inaktiven Strukturanaloga sind auf AS-Austausche an Positionen 2 oder 5 des Peptids durch Alanin zurückzuführen (VWNQPVRGFKVYE). Als Markergene dienten Gene, die in der Arbeitsgruppe charakterisiert werden und eine ausgeprägte Transkripterhöhung nach Behandlung mit PAMPs oder Pathogenen aufweisen. Als Positivkontrolle wurden deshalb *Arabidopsis*-Blätter neben Pep13 und seinen inaktiven Peptiden auch mit flg22 behandelt. Abbildung 3.11-A zeigt eine prägnante Erhöhung der *DRK4a*- (At1g51820), *DRK6*- (At5g25930) und *IMP*- (At2g39530) Transkripte durch 1  $\mu$ M flg22 nach 2 und 4 h. Ebenso scheint die Expression dieser Markergene durch Zugabe von 1  $\mu$ M oder 100  $\mu$ M Pep13 aktiviert zu werden. Diese Expressionserhöhung wird jedoch weitestgehend auch durch Infiltration der inaktiven Strukturanaloga A2 und A5 hervorgerufen. Deshalb ist die Aktivierung dieser Gene nicht eindeutig auf Pep13 zurückzuführen.

Ein typisch PAMP- oder pathogeninduziertes Gen ist *PR1* (*pathogenesis-related*). Seine Induktion sollte mit Hilfe einer transgenen PR1::GUS-Linie (Shapiro and Zhang, 2001) durch eine histochemische GUS-Färbung nachgewiesen werden. Dazu wurden Blätter der PR1::GUS-Linie mit 100  $\mu$ M Pep13 infiltriert, nach 24 h geerntet und anschließend histochemisch die GUS-Enzymaktivität

zeigt. Als Kontrollen dienten H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) und flg22 (Positivkontrolle). In Abbildung 3.11-B erkennt man aufgrund der intensiven Blaufärbung der Blätter, dass nach flg22-Behandlung verstärkt *PRI* gebildet wurde. Im Gegensatz dazu sieht man bei der H<sub>2</sub>O-Infiltration keine *PRI*-Aktivierung. *PRI* wird also nicht durch Verwundung induziert. Bei der Behandlung mit Pep13 sieht man eine leichte Blaufärbung der Blätter, was heißt, dass *PRI* geringfügig induziert wird.



**Abbildung 3.11: Analyse von Pep13-Reaktionen in *Arabidopsis*.**

A.: Elicitorinduzierte Transkriptakkumulation. *Arabidopsis*-Blätter (Col-0) wurden 2 und 4 h nach Infiltration von H<sub>2</sub>O, flg22, Pep13, oder den inaktiven Strukturanaloga von Pep13 A2 (Austausch von W zu A) oder A5 (Austausch von P zu A) geerntet, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese in eine PCR mit markergenspezifischen Primern eingesetzt. Als Ladekontrolle diente der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor *EF1α*.

B.: Expression des *PRI::GUS* Reportergens. *Arabidopsis*-Blätter der transgenen *PRI::GUS*-Linie wurden 24 h nach Infiltration von 100 μM Pep13 geerntet und einer GUS-Färbung unterzogen. H<sub>2</sub>O- und 1 μM flg22-Behandlung dienten als experimentelle Kontrollen.

C.: Keimung von *Arabidopsis*-Samen in der Gegenwart von Pep13. Samen vom *Arabidopsis*-Ökotyp Col-0 wurden auf sterilem 1/2 MS-Medium angezogen, dem nichts (Kontrolle), 1 μM flg22 oder verschiedene Konzentrationen an Pep13 (1, 10 oder 100 μM) zugesetzt wurde. Fotos wurden 13 Tage nach Aussaat aufgenommen.

D.: Extrazelluläre Alkalisierung. Gemessen wurde der pH-Wert des Mediums nach Zugabe von 100 μM Pep13 (pH 5), 1 μM flg22 (Positivkontrolle) oder H<sub>2</sub>O (Negativkontrolle) zu *Arabidopsis*-Zellsuspensionskulturen (*Ler*).

flg22 und EF-Tu inhibieren das Wachstum (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006). Um zu überprüfen, ob das Wachstum oder die Entwicklung von *Arabidopsis* durch das Vorhandensein von Pep13 beeinflusst wird, wurden oberflächensterilisierte Samen auf 1/2 MS-Agar, der unterschiedliche Konzentrationen an Pep13 und flg22 – als Positivkontrolle – enthielt, ausgesät (Gomez-Gomez and Boller, 2000). In Abbildung 3.11-C ist deutlich zu sehen, dass das Wachstum der Pflanzen, die auf flg22 wachsen, eingeschränkt ist. Im Gegensatz dazu wachsen die Pflanzen auf dem 1/2 MS-Agar, der unterschiedliche Pep13-Konzentrationen enthält, so wie die Pflanzen auf 1/2 MS-Agar

ohne Zusatz. Pep13 scheint also keinen Einfluss auf das Wachstum oder die Entwicklung von *Arabidopsis*-Keimlingen zu haben.

Veränderungen der Ionenströme von  $H^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$  und  $Cl^-$  über die Plasmamembran gehören zu den ersten detektierbaren Ereignissen, nachdem Petersiliezellen mit verschiedenen Elicitoren behandelt wurden (Nürnberger *et al.*, 1994). Hier wurden *Arabidopsis Ler*-Zellsuspensionskulturen mit 100  $\mu M$  Pep13 behandelt und kontinuierlich der pH des Mediums gemessen, um die extrazelluläre Alkalisierung zu verfolgen. Als Kontrollen dienten zum einen Wasser und zum anderen 1  $\mu M$  flg22 (Positivkontrolle). Wie in Abbildung 3.11-D zu sehen ist, bewirkt eine Zugabe von Pep13 (100  $\mu M$ ) keine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes, die Zugabe von flg22 dagegen schon. Das gleiche Resultat wurde auch durch Zugabe von 1  $\mu M$  Pep13 erreicht (Daten nicht gezeigt).

Pep13 scheint demnach keine typischen Abwehrreaktionen in *Arabidopsis thaliana* hervorzurufen. Da gezeigt wurde, dass die Expression einiger Markergene auch durch die inaktiven Strukturanaloga erhöht wurde (Abbildung 3.11), gehen die in den Arrays induzierten Gene wohl eher auf die hohe Konzentration der Pep13-Lösung und des damit verbundenen niedrigeren pH-Werts zurück, als auf eine PAMP-Wirkung von Pep13 (siehe Abbildung 3.11-A).

### **3.2.4 AUSWAHLKRITERIEN FÜR GENE ZUR FUNKTIONELLEN ANALYSE IN *ARABIDOPSIS THALIANA***

Da die funktionelle Analyse der ausgewählten Gene in Petersilie durch Geninaktivierung nicht erfolgreich verlief, und in Abschnitt 3.2.2 festgestellt wurde, dass erstens zu den meisten cDNA-AFLP-Fragmenten aus *Petroselinum crispum* Homologe in *Arabidopsis* existierten und zweitens die Expression der meisten Kandidatengene auch in *Arabidopsis* beeinflusst wurde (siehe Tabelle 3-6), sollte die funktionelle Analyse mit Hilfe von T-DNA-Insertionslinien in *Arabidopsis thaliana* vorgenommen werden. Basierend auf den Ergebnissen der *AtGenExpress*-Initiative wurden Gene ausgewählt, deren Expression durch PAMPs stark induziert war und die möglicherweise in die Mechanismen der Signalaufnahme und -weiterleitung involviert sein können (siehe Tabelle 3-6 unter „Ausgewählte Gene“).

Diese Gene kodieren ein integrales Membranprotein (pc25, At2g39530), drei LRR-RLKs (pc36, At2g02220; pc527-1, At5g25930 und pc629-1, At1g74360), drei Proteine, die zur Familie der Proteinkinasen gehören (pc255-2-3, At5g41990; pc258-1, OXI1, At3g25250 und pc624-4, At5g67080), eine Proteinphosphatase der Klasse 2C (pc482-2, At4g33920) und eine S-Locus Lectinproteinkinase (pc512-3, At4g21390). Für alle cDNA-AFLP-Fragmente war durch mindestens eine Methode eine Expressionserhöhung ersichtlich (siehe Tabelle 3-6). Die entsprechende Expressionserhöhung in den *Arabidopsis*-Homologen verlief bis auf die Behandlung mit LPS noch ausgeprägter und weitestgehend auch in beiden Systemen (Blätter und Protoplasten) gleich ab. Ausnahmen waren hier die Proteinkinasen Atg541990 und At5g67080, deren Expression in Protoplasten nicht verstärkt wurde.

### 3.3 FUNKTIONELLE ANALYSE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Für die funktionelle Analyse der in Kapitel 3.2.4 genannten Gene in *Arabidopsis thaliana* wurden zunächst T-DNA-Insertionslinien herausgesucht und vom SALK-Institut (Alonso *et al.*, 2003) oder vom *L'institute national de la recherche agronomique* (INRA) (Samson *et al.*, 2002) bezogen. T-DNA-Insertionslinien sind ein wichtiges Werkzeug in der funktionellen Analyse. Durch das Einfügen einer T-DNA in das zu untersuchende Gen kann es funktionsuntüchtig werden. Es kann daraufhin untersucht werden, welchen Einfluss das Fehlen des Genprodukts auf die Entwicklung der Pflanze und andere Prozesse, wie z.B. die Signalübertragung und -weiterleitung, hat. Um zu sehen, ob das Einbringen der T-DNA-Insertion erfolgreich war, werden Genotypisierungen vorgenommen. Die für die Genotypisierung notwendige genomische DNA wurde nach dem Edwards-Protokoll (siehe Kapitel 2.2.5.1) aus den zu testenden Pflanzen gewonnen. Zum Beweis der Homozygotie müssen zwei PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primerpaaren durchgeführt werden. Das erste Primerpaar bindet genspezifisch und schließt die vorhergesagte T-DNA Insertionsstelle ein. Das zweite Primerpaar bindet mit einem Primer spezifisch in der T-DNA und mit dem anderen genspezifisch (siehe Abbildung 2.1, Primersequenzen siehe Anhang B, Tabelle 7-4).

Erhält man nur in der PCR-Reaktion mit dem T-DNA-spezifischen Primer ein Produkt, so ist die getestete Pflanze für die T-DNA-Insertion homozygot. Erhält man ein PCR-Produkt nur in der PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primern, dann besitzt die Pflanze keine T-DNA-Insertion zwischen den Primern. Ist in beiden Reaktionen ein Produkt zu erkennen, dann ist die Pflanze bezüglich des WT-Gens heterozygot.

**Tabelle 3-7: Status der T-DNA-Insertionslinien.**

AGI Code	Beschreibung	ko-Linie	Homozygote ko (T3)	Homozygote ko (T4)
At1g74360	LRR-RLK	Flag_234E06	ja	ja
At2g02220	LRR-RLK (AtPSKR1)	N508585	ja	ja
		N506900	ja	ja
		Flag_407D02	heterozygot	ja
At2g39530	Integrales Membranprotein	Flag_436B11	heterozygot	ja
At3g25250	PK family protein (OXI1)	--		
At4g21390	S-locus lection PK family protein	N647359	nein	
		N647351	ja	ja
At4g33920	PP2C family protein	N635730	heterozygot	ja
		N539779	ja	ja
At5g25930	LRR-RLK (DRK6)	N856397	ja	ja
At5g41990	PK family protein	N603318	ja	ja
		N524887	heterozygot	ja
		Flag_578A06	ja	ja
At5g67080	PK family protein	--		

Tabelle 3-7 gibt zusammenfassend einen Überblick über den Status der den ausgewählten Genen (Tabelle 3-6) entsprechenden T-DNA-Insertionslinien. Die LRR-RLK At5g25930 (DRK6) wird von einer Mitarbeiterin des Labors bearbeitet. In den nächsten Abschnitten werden die Analysen des integralen Membranproteins (At2g39530, siehe Kapitel 3.3.1) und der LRR-RLK At2g02220 (siehe Kapitel 3.3.2) betrachtet.

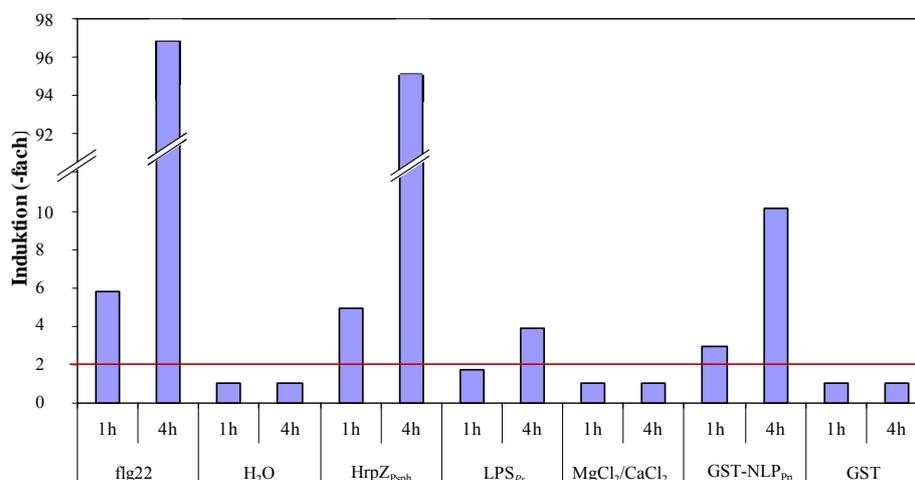
### 3.3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM IMP

Fragment 25 aus Petersilie und auch sein Klon mit der vollständigen Länge zeigten Homologie zu einem integralen Membranprotein (IMP, At2g39530) aus *Arabidopsis thaliana*. Über dieses Protein ist noch nicht sehr viel bekannt. Es besteht aus einer Domäne unbekannter Funktion (DUF588). Sie besitzt ein konserviertes Arginin und eine konservierte Asparaginsäure, die zusammen ein aktives Zentrum bilden könnten (EMBL-EBI, InterPro, [www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)). Es soll drei Transmembrandomänen besitzen, wobei der N-Terminus im extrazellulären und der C-Terminus im intrazellulären Bereich zu finden sein soll (siehe auch Abbildung 7.1).

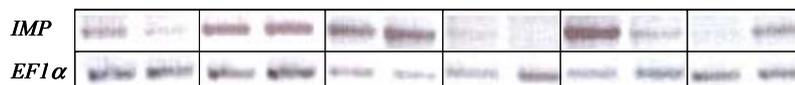
#### 3.3.1.1 EXPRESSIONSANALYSEN DES IMP

Microarray-Analysen der *AtGenExpress*-Initiative (siehe Abbildung 3.12-A), wobei die Daten aus dem *Digital Northern* der Genevestigator-Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004) ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch)) entnommen wurden, zeigten eine hohe Induktion (ca. 95-fach) des *IMP*-Transkripts nach vierstündiger Inkubation mit flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>. Eine leichte Induktion durch diese Elicitoren war auch schon nach einer Stunde erkennbar. Die Expression des *IMP*-Transkripts war nach LPS<sub>P<sub>s</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Applikation weniger ausgeprägt als nach Zugabe der anderen beiden Elicitoren. Es war aber dennoch eine Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar.

A.



B.

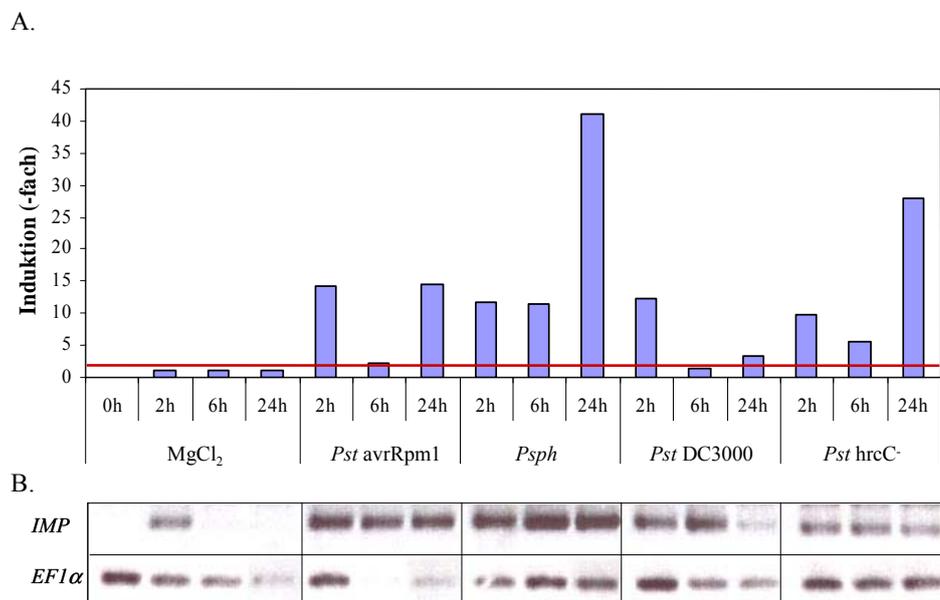


**Abbildung 3.12: Expressionsanalysen des IMP nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren.**

A. *Microarray*-Analysen: Die absoluten Werte der jeweiligen Signalstärke wurden aus der Genevestigator-Datenbank entnommen. Die Mittelwerte der Replikate von jeweils drei unabhängigen Versuchen wurden durch die Mittelwerte der entsprechenden Kontrollproben dividiert. Die Elicitorkonzentrationen waren wie folgt: HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> (10 μM), GST-NLP<sub>P<sub>p</sub></sub> (1 μM), flg22 (1 μM) und LPS<sub>P<sub>s</sub></sub> (100 μg/ml). Nach 1 und 4 Stunden wurden die Proben geerntet. Die rote Linie gibt den Grenzwert der signifikanten Induktion an. B. RT-PCR-Analyse: 6-Wochen-alte *Arabidopsis* Ws-0-Pflanzen wurden mit 10 μM HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, 10 μM pJC40 (anstatt Wasser), 100 μg/ml LPS<sub>P<sub>s</sub></sub>, MgCl<sub>2</sub>/CaCl<sub>2</sub>, ca. 6 μM NLP<sub>P<sub>p</sub></sub> und dem entsprechendem Kontrollpuffer (anstatt GST: 20 mM Tris, pH 9,0; 1 mM GSSG; 1 mM GSSH; 1 mM EDTA; 0,005 % Brij) behandelt. Die behandelten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe A.) geerntet, RNA isoliert und dann eine RT-PCR durchgeführt. Als cDNA-Ladekontrolle diente die Amplifikation von *EF1α*, einem konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor.

Auch mit Hilfe von RT-PCRs konnte gezeigt werden, dass  $HrpZ_{P_{sph}}$ ,  $LPS_{Pa}$  und  $NLP_{pp}$  die Expression des *IMP*-Transkripts induzieren (siehe Abbildung 3.12-B). *flg22* konnte in diesen Versuchen nicht überprüft werden, da für den späteren Vergleich von T-DNA-Insertionslinien zum WT Pflanzen des Ökotyps Wassilewskija genutzt wurden, die im Gegensatz zu Columbia-Pflanzen Flagellin-insensitiv sind (Gomez-Gomez and Boller, 2000).

Des Weiteren wurde untersucht, inwieweit sich die Transkriptmenge des *IMP*-Gens nach Pathogenapplikation verändert. Dazu wurden zunächst auch die *Microarray*-Daten des *AtGenExpress*-Projekts [*Digital Northern* der Genevestigator-Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004; [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch))] ausgewertet (siehe Abbildung 3.13-A) und im Anschluss daran die Ergebnisse mit RT-PCR-Analysen überprüft (siehe Abbildung 3.13-B). Es wurden der virulente Bakterienstamm *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000), der avirulente Bakterienstamm *Pst* *avrRpm1*, die Typ III-Sekretionsmutante *Pst* *hrcC* (apathogen) und als Nicht-wirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*Psph*) verwendet.



**Abbildung 3.13: Expressionsanalysen des *IMP* nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen.**

A. *Microarray*-Analysen: Die absoluten Werte der jeweiligen Signalstärke wurden aus der Genevestigator-Datenbank entnommen. Die Mittelwerte der Replikate von jeweils drei unabhängigen Versuchen wurden durch die Mittelwerte der entsprechenden Kontrollproben dividiert. Alle Versuche wurden mit 5-Wochen-alten Pflanzen durchgeführt. Die Bakterien wurden mit einer Konzentration von  $10^8$  cfu/ml in die Blätter injiziert. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Proben geerntet und aufgearbeitet. Die rote Linie gibt den Grenzwert der signifikanten Induktion an. B. RT-PCR-Analyse: 6-Wochen-alte *Arabidopsis* Ws-0-Pflanzen wurden mit Bakteriensuspensionen von  $10^8$  cfu/ml infiltriert. Als Kontrolle diente 10 mM  $MgCl_2$ . Die behandelten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe A.) geerntet, RNA isoliert und dann eine RT-PCR durchgeführt. Als cDNA-Ladekontrolle diente die Amplifikation von *EF1 $\alpha$* , einem konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor.

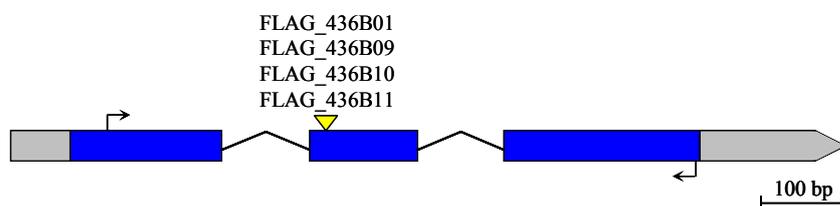
Bei der Auswertung der *Microarray*-Daten fiel auf, dass die Expression des *IMP*-Gens nach Zugabe vom Nichtwirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* und der apathogenen Typ III-Sekretionsmutante *Pst* *hrcC* nach 24 h besonders hoch ausfiel (Abbildung 3.13). Interessant ist auch, dass nach Behandlung mit *Pst* *avrRpm1* die Induktion, die nach 2 h zu sehen war, nach 6 h aufgehoben ist, jedoch nach 24 h wieder auf dem Niveau von 2 h liegt und dass nach Behandlung mit *Pst* DC3000 die anfängliche Expressionserhöhung nach 6 h reduziert wird und sich nicht mehr wesentlich ändert. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch mit den RT-PCRs gezeigt werden. Hier wurden

allerdings, wie oben schon erwähnt, Pflanzen des Ökotyps Wassilewskija genutzt und nicht die des Ökotyps Columbia. Die Expression nach *Psph*-Zugabe war auch in den RT-PCR-Analysen am stärksten. Die *Pst hrcC*<sup>-</sup>-Antwort fiel aber deutlich niedriger aus und der Rückgang der Expressionssteigerung bei *Pst* DC3000 hat sich auf 24 h verschoben. Das Phänomen der *Pst* avrRpm1-Behandlung ist in den RT-PCR-Reaktionen nicht zu sehen.

### 3.3.1.2 ANALYSE VON T-DNA-INSERTIONSLINIEN DES *IMP*

Um die Funktion des *IMP* weitergehend zu charakterisieren, sollten *Arabidopsis*-Linien vom *L'institute national de la recherche agronomique* (INRA) (Samson *et al.*, 2002) untersucht werden, in der das Gen durch Einfügen einer T-DNA (siehe Abbildung 3.14) zerstört wurde (siehe Kapitel 2.2.5.6). Dadurch ist es möglich, unter verschiedenen Bedingungen Effekte zu studieren, die durch das Fehlen des Proteins hervorgerufen werden.

Das *IMP* besteht aus drei Exons und hat insgesamt eine Länge von 986 bp, von denen 537 bp kodierend wirken, so dass das Protein aus 178 Aminosäuren aufgebaut ist. Die vom INRA eingeführten T-DNAs sollen sich im 2. Exon befinden (siehe Abbildung 3.14). Bevor mit den vom INRA bestellten Samen gearbeitet werden konnte, musste überprüft werden, ob die daraus entstehenden Pflanzen die Insertion besitzen, sie für die Insertion homozygot vorliegen und kein Transkript des *IMP* mehr vorhanden ist.

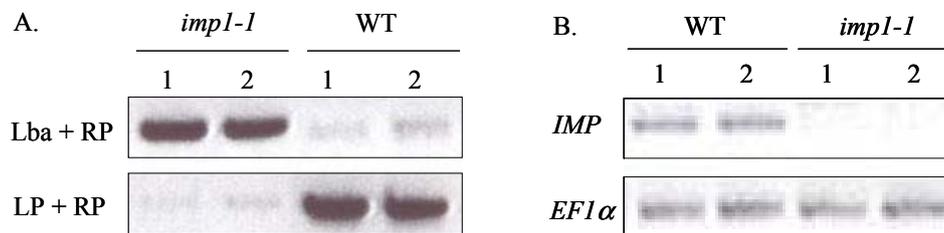


**Abbildung 3.14: Genstruktur und Lage der T-DNA-Insertionen im *IMP*-Gen.**

Das *IMP*-Gen ist auf dem Chromosom 2 lokalisiert, besteht aus drei Exons (blau) und hat eine Größe von 986 bp. Der Insertionsort der T-DNAs ist durch das gelbe Dreieck markiert. 5'-UTR und 3'-UTR sind grau dargestellt, Introns als Linien zwischen den Exons und Lage und Richtung der genspezifischen Primer werden durch die Pfeile angegeben (siehe auch Abbildung 7.1 in Anhang C).

Dazu wurden zum einen genomische DNA nach dem Protokoll von Edwards aus den Blättern isoliert und Genotypisierungs-PCRs durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.5.1 und 2.2.5.6). Diese PCRs ließen erkennen, dass nur eine T-DNA-Insertionslinie auch tatsächlich die Insertion enthielt (Daten nicht gezeigt, persönliche Mitteilung von Dr. Andrea Gust). Daraufhin wurde nur noch mit der Linie FLAG\_436B11 weiter gearbeitet, die von nun an *impl-1* genannt wird. Wie in Abbildung 3.15-A zu erkennen ist, enthält diese *impl-1* die Insertion, da der T-DNA-spezifische Primer an die DNA gebunden hat und ein Produkt entstand, was mit der DNA aus den Wildtypblättern nicht der Fall war. Außerdem sieht man, dass die Insertion in beiden Allelen liegen muss, da bei den Proben der *impl-1*-Linie kein Produkt mit den genspezifischen Primern, die die Insertion umschließen, nachzuweisen war. Die Pflanzen sind also für die T-DNA-Insertion homozygot. Als Kontrolle dienten die Wildtyppflanzen, in denen wiederum nur mit Hilfe der genspezifischen Primer ein Produkt amplifizierbar war.

Zum anderen wurde aus elicitorbehandelten Pflanzen RNA isoliert, die durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und anschließend in einer PCR mit *IMP*-spezifischen Primern amplifiziert wurde. So konnte gezeigt werden (Abbildung 3.15-B), dass das Gen zwar in den Wildtyp-pflanzen transkribiert wurde nicht aber in den *impl-1*-Pflanzen.



**Abbildung 3.15: PCR-Analyse zur Genotypisierung (A.) und zum Nachweis der Geninaktivierung (B.).**

A.: Genomische DNA wurde aus Blättern von Ws-0- (WT) und *impl-1*-Pflanzen isoliert und in Genotypisierungsreaktionen eingesetzt. Es wurden jeweils zwei Pflanzen (1, 2) ausgewählt. Lba = Primer spezifisch für die T-DNA-Insertion, LP und RP = genspezifische Primer. B.: RNA wurde aus jeweils zwei Hrp<sub>Z<sub>P<sub>sph</sub></sub></sub>-induzierten Pflanzen (4 h) isoliert, in cDNA umgeschrieben und in eine PCR eingesetzt. *IMP* = *IMP*-spezifische Primer. *EF1 $\alpha$*  = Elongationsfaktor *EF1 $\alpha$* -spezifische Primer, als cDNA-Ladungskontrolle.

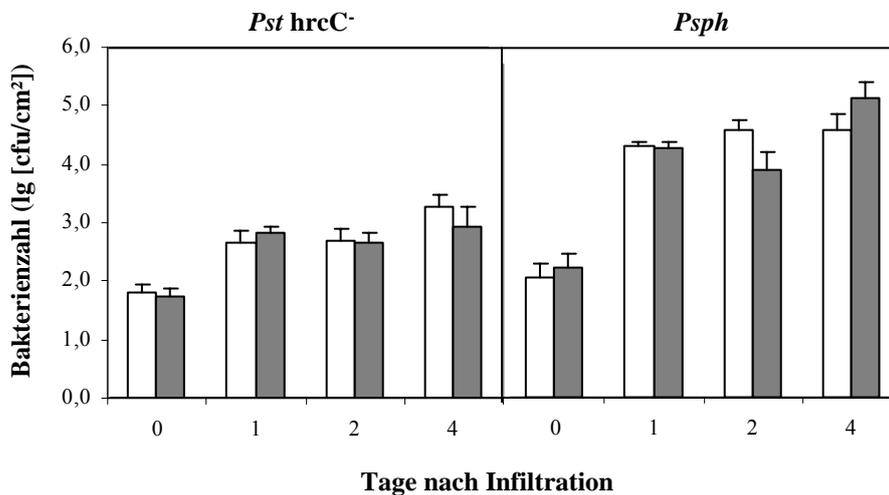
### 3.3.1.3 PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG

Eine einfache Möglichkeit festzustellen, ob die Ausschaltung des Gens einen Einfluss auf andere Prozesse hat, ist die makroskopische Betrachtung der *impl-1*-Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp (Ws-0). Diese zeigten jedoch unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen (siehe Kapitel 2.2.2.2) keinen makroskopischen Unterschied. Sie besaßen gleiche Keimungsraten, wuchsen mit derselben Geschwindigkeit und blühten zur gleichen Zeit wie WT-Pflanzen. Auch die Ausprägung der Pflanzenorgane war makroskopisch identisch (Daten nicht gezeigt).

#### 3.3.1.3.1 Bakterienwachstumstest mit Pseudomonaden

Wie anhand der *Microarray*-Daten und den RT-PCR-Analysen erkennbar war (Kapitel 3.3.1.1), reagierten die Pflanzen auf den Pathogenbefall durch eine verstärkte Bildung des *IMP*-Transkripts. Es war daher nahe liegend, das Verhalten der *impl-1*-Linie unter Pathogenbefall zu betrachten. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum von verschiedenen *Pst*-Stämmen auf der *impl-1*-Linie im Vergleich zum WT untersucht. Da die Expression des *IMP* nach Infektion mit allen vier getesteten *Pseudomonas*-Stämmen (*Pst* avrRpm1, *Pst* hrcC<sup>-</sup>, *Pst* DC3000 und *Psph*) erhöht vorlag, in dieser Arbeit jedoch nicht alle betrachtet werden konnten, wurden Blätter der *impl-1*- und WT-Pflanzen mit der apathogenen Typ III-Sekretionsmutanten *Pst* hrcC<sup>-</sup> und dem Nichtwirtsstamm *Psph* inokuliert. Die infizierten Blätter wurden sofort nach Infiltration und außerdem nach ein, zwei und vier Tagen geerntet, definierte Bereiche ausgestochen, in 10 mM MgCl<sub>2</sub> homogenisiert und in Verdünnungsreihen auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Nach 48 h bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien ausgezählt und die mittlere Bakterienzahl berechnet. Die Versuche mit *Pst* hrcC<sup>-</sup> wurden viermal mit ähnlichem Ergebnis durchgeführt, die Experimente mit *Psph* aufgrund der Zeit nur einmal, so dass das Ergebnis als vorläufig zu betrachten ist. Interessant wäre es in weiteren Experimenten zu untersuchen, wie die *impl-1*-Pflanzen auf eine Behandlung mit dem virulenten Stamm *Pst* DC3000 sowie dem avirulenten Stamm *Pst* avrRpm1 reagieren.

Abbildung 3.16 stellt exemplarisch die Auswertung eines Versuchs dar. Es ist erkennbar, dass das Wachstum der Typ III-Sekretionsmutante auf/in den *imp1-1*-Blättern an allen vier Tagen nicht deutlich anders verläuft als auf/in den WT-Blättern. Das Ausschalten des *IMP* scheint also keinen Effekt auf die Apathogenität von *Pst hrcC*<sup>-</sup> zu haben.

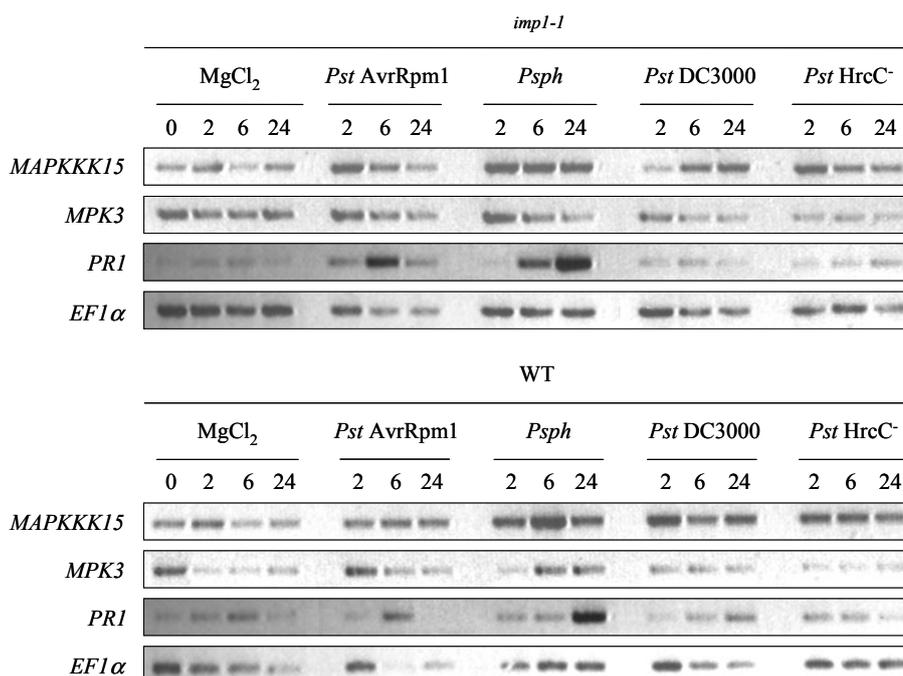


**Abbildung 3.16: Bakterienwachstumsversuche in *imp1-1*-Linien nach Infiltration von *Pst hrcC*<sup>-</sup> und *Psph*.** Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen in Erde angezogen, und pro Pflanze wurden zwei Blätter mit der entsprechenden Bakteriensuspension ( $10^4$  cfu/ml) inokuliert. Direkt nach der Inokulation und am 1., 2. und 4. Tag danach wurden die Blätter geerntet und definierte Bereiche daraus ausgestochen. Die ausgestochenen Bereiche wurden mit einem Handmörser in 10 mM MgCl<sub>2</sub> homogenisiert und in Verdünnungsreihen auf LB-Agarplatten ausplattiert, inkubiert und ausgezählt. Angegeben sind der dekadische Logarithmus der Mittelwerte und deren Standardabweichungen (n = 6). □ = WT (Ws-0), ■ = *imp1-1* (FLAG\_436B11-B9).

Auch *Psph* wächst in den *imp1-1*-Pflanzen nicht signifikant anders als im WT. Als Nichtwirtsbakterium sollte es sich wie auch die *Pst hrcC*<sup>-</sup>-Mutante auf *Arabidopsis thaliana* nicht vermehren. Dies ist in Abbildung 3.16 deutlich zu sehen, da sich die Bakterienzahl an den verschiedenen Tagen nicht wesentlich ändert.

### 3.3.1.3.2 Einfluss von Pseudomonaden auf die Expression typischer Markergene

Eine andere Möglichkeit herauszufinden, ob eine Pflanze nach Inaktivierung des *IMPs* anders auf Pathogenstress reagiert, besteht darin, sich die Expression verschiedener Gene anzuschauen, die für bestimmte Signalwege typisch sind. *PRI* (*pathogenesis-related*, At2g14610) wird als klassischer Marker für die Abwehr in Pflanzen betrachtet (Fellbrich *et al.*, 2002; Zipfel *et al.*, 2004), *MPK3* (Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3, At3g45640) ist auch an der Abwehrantwort beteiligt (Asai *et al.*, 2002). Im Vergleich zu *PRI* kann das *MPK3*-Transkript schon innerhalb weniger Minuten nach Pathogen-/Elicitorkontakt nachgewiesen werden (Navarro *et al.*, 2004). *MAPKKK15* ist eine MAP Kinase Kinase Kinase (At5g55090), die zur MEKK-Unterfamilie gehört ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org), TAIR).



**Abbildung 3.17: Markergenexpression in *impl-1*-Linien nach Behandlung von *Arabidopsis*-Blättern mit verschiedenen *Pseudomonaden*.**

WT- und *impl-1*-Pflanzen wurden mit 10<sup>8</sup> cfu/ml der angegebenen *Pseudomonaden*stämme und 10 mM MgCl<sub>2</sub> infiltriert, nach 2, 6 und 24 h geerntet, die RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese in PCRs mit markergenspezifischen Primern eingesetzt. Als Ladekontrolle diente der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor *EF1α*.

So wurden *impl-1*- und WT-Pflanzen mit vier verschiedenen *Pseudomonas*-Stämmen infiltriert, die infizierten Blätter nach 2, 6 und 24 h geerntet, in flüssigem Stickstoff eingefroren, daraus RNA isoliert und RT-PCRs mit Primern von Markergenen durchgeführt. In Abbildung 3.17 ist zu sehen, dass die Expression der MAP-Kinase Kinase Kinase in *impl-1*-Pflanzen deutlich durch *Psph* zu allen untersuchten Zeitpunkten induziert ist. Eine leichte Erhöhung der Genexpression liegt in den *impl-1*-Pflanzen auch nach 2 h nach *Pst* AvrRpm1- und *Pst* hrcC<sup>-</sup>-Applikation vor. Bei *Pst* DC3000-Zugabe steigt das Expressionsniveau der *MAPKKK15* nach 6 und 24 h. Es ist aber kein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und den *impl-1*-Pflanzen zu sehen. Die Expression der MAP Kinase 3 (*MPK3*) weist nach Infiltration von *Psph* nach 6 und 24 h im WT höhere Werte auf. Bei den anderen Pathogenen ist kein Unterschied zur MgCl<sub>2</sub>-Kontrolle sichtbar. In *impl-1*-Pflanzen ist bei keiner Pathogeninfiltration eine Differenzierung in der Expression von *MPK3* im Vergleich zum WT erkennbar. Die *MPK3*-Transkriptbildung scheint in den *impl-1*-Pflanzen durch die allgemeine Wundreaktion – hervorgerufen durch die Infiltration und sichtbar in der MgCl<sub>2</sub>-Kontrolle – verstärkt zu sein. Die *PR1* Expression wird ganz deutlich durch *Psph* nach 24 h hervorgerufen – in *impl-1* und im WT. Die in diesem Absatz getroffenen Schlussfolgerungen müssen in weiteren Versuchen auf ihre Reproduzierbarkeit überprüft werden.

### 3.3.1.3.3 Einfluss von abiotischen Stressoren auf das Wurzelwachstum

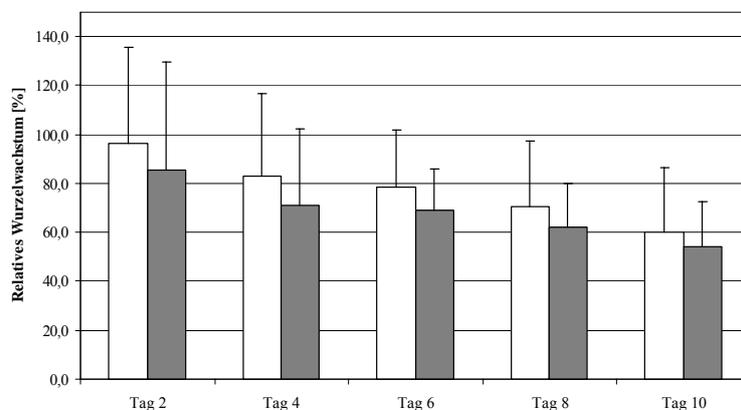
Zur generellen Charakterisierung und Funktionsaufklärung des IMP Proteins wurden Vorversuche zum Wachstum der Wurzeln von *imp1-1*-Keimlingen im Vergleich zu WT-Keimlingen in Bezug auf unterschiedliche Stressbedingungen getestet. Für alle Versuche wurden die Pflanzen wie in Kapitel 2.2.3.1 behandelt.

#### *Salzstress*

Die Auswirkung von NaCl auf das Wurzelwachstum wurde durch die Zugabe von 130 mM NaCl zu  $\frac{1}{2}$  MS-Agar getestet. Während die Pflänzchen auf den  $\frac{1}{2}$  MS-Platten kontinuierlich weiter wuchsen, stagnierte das Wurzelwachstum ab Tag 8 auf den NaCl-Platten. So erreichten die Wurzeln der gestressten Pflanzen am Tag 8 ca. 60 % der Wurzellänge der Kontrollpflanzen und am Tag 11 waren es nur noch ca. 38 %. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen *imp1-1*- und WT-Pflanzen zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

#### *Osmotischer Stress*

Die *Microarray*-Daten zeigten, dass die Expression des IMPs in den Wurzeln durch osmotischen Stress (300 mM Mannitol im Medium) stark reprimiert wurde. Deshalb wurde den  $\frac{1}{2}$  MS-Agarplatten 300 mM Mannitol zugefügt. Die Pflanzen reagierten auch hier auf die Zugabe des Mannitols, was sich im verringerten Wurzelwachstum zeigte. Wie auch schon beim Salzstress reagierten *imp1-1*- und WT-Pflanzen auf die gleiche Weise (Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18: Wurzellängenexperimente in *imp1-1*- und WT-Linien.**

7-Tage-alte, auf  $\frac{1}{2}$  MS angezogene Keimlinge wurden entweder auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar oder auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 300 mM Mannitol-Agar umgesetzt. Die Positionen der Wurzelspitzen wurden an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8 und 10 markiert. Das Längenwachstum der Wurzeln zu den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem Programm Scion-Image vermessen und das relative Wurzelwachstum in % angegeben. Zur Berechnung wurde der Quotient aus dem Wurzelwachstum von Tag 0 bis zu den einzelnen Messtagen auf Stressmedium mit den auf Normalmedium gewachsenen Wurzeln gebildet. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist  $n = 20$ . □ = WT, ■ = *imp1-1*.

#### *Einfluss des Phytohormons Methyljasmonat*

Jasmonsäure spielt als Signalstoff in der Aktivierung von bestimmten *PR*-Genen, und bei der Etablierung der induzierten systemischen Resistenz, aber auch bei Verwundungen, eine wichtige Rolle. Darüber hinaus inhibiert Jasmonsäure das Wurzelwachstum. Es sollte nun getestet werden, ob die *imp1-1*-Linie in der Lage ist Jasmonsäure wahrzunehmen.

Zu diesem Zweck wurde das Wurzelwachstum der *impl-1*- und WT-Linie auf  $\frac{1}{2}$  MS-Platten untersucht, die das physiologisch aktive Jasmonsäurederivat Methyljasmonat ( $2,5 \mu\text{M}$ ) enthielten. WT- und *impl-1*-Pflanzen reagierten gleichermaßen mit verringertem Wurzelwachstum, das aber nicht ganz so stark ausgeprägt war wie beim Salzstress und auch nach 11 Tagen nicht aufgehört hatte (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR LRR-RLK

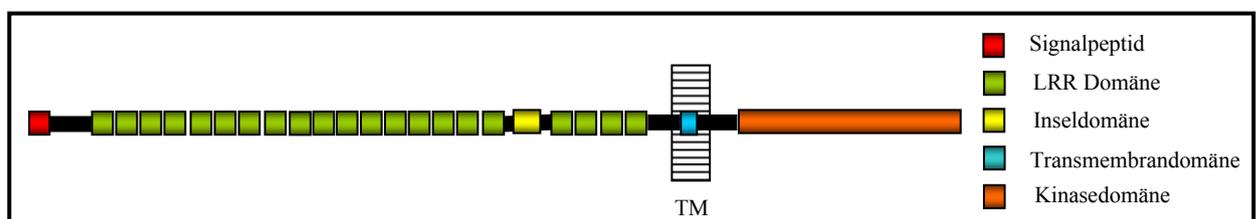
#### 3.3.2.1 EINFÜHRENDE INFORMATION ZUM PHYTOSULFOKINREZEPTOR

Wie in Abschnitt 3.1.4 erwähnt, zeigte die kodierende Sequenz des vollständigen *P. crispum*-Gens, das vom Fragment pc36 abgeleitet wurde, Homologie zu einer leucinreichen rezeptorähnlichen Kinase (At2g02220), welche wahrscheinlich ein Ortholog des Phytosulfokinrezeptors (*DcPSKR1*) aus der Karotte (*Daucus carota*) ist und deshalb AtPSKR1 genannt wird (Matsubayashi *et al.*, 2006). Phytosulfokine (PSKs) sind Pflanzenhormone, die zur wachsenden Klasse der pflanzlichen Peptidhormone gehören. Es wird zwischen PSK- $\alpha$  und PSK- $\beta$  unterschieden, wobei PSK- $\alpha$  ein sulfatisertes Pentapeptid [Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Ile-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Thr-Gln] und PSK- $\beta$  ein C-terminal verkürztes Tetrapeptid [Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Ile-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Thr] ist. PSK- $\alpha$  ist unter anderem das primäre Signalmolekül, das für die Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich ist (Matsubayashi and Sakagami, 1996). Es fördert die *in vitro*-Differenzierung der Tracheenelemente der Mesophyllzellen (Matsubayashi *et al.*, 1996), die somatische Embryogenese (Igasaki *et al.*, 2003), die Nebenwurzelbildung (Yamakawa *et al.*, 1998) und die Pollenbildung (Chen *et al.*, 2000). Es unterdrückt die Seneszenz unter Stressbedingungen, wenn PSK in hohen Konzentrationen zu Pflanzenkeimlingen gegeben wird (Yamakawa *et al.*, 1999).

A.



B.



**Abbildung 3.19: Gen- und Proteinmodell des AtPSKR1.**

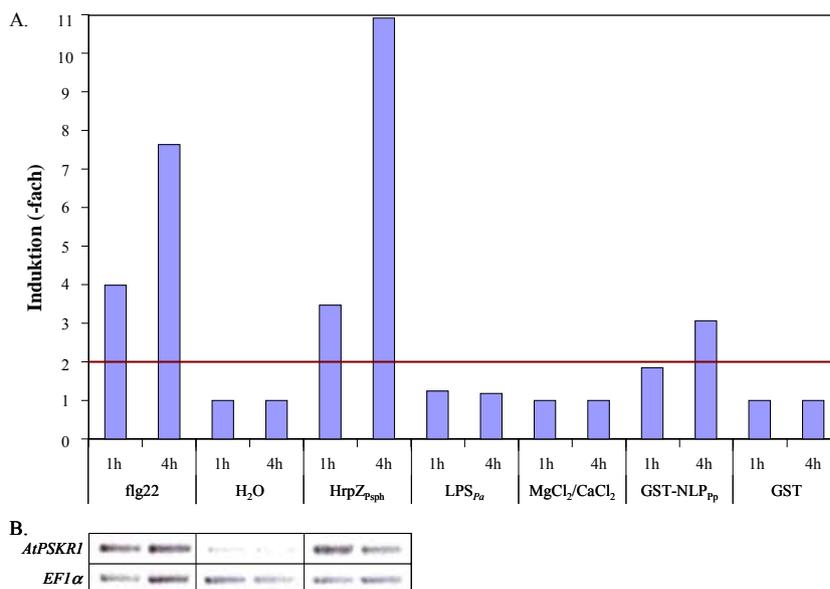
A.: Genmodell mit Kennzeichnung der T-DNA-Insertionsstellen, Genotypisierungsprimerbindestellen und Beginn der jeweiligen Domänen (siehe auch Abbildung 7.4). B.: Proteinmodell mit entsprechenden Domänen. (TM = Transmembran).

*AtPSKR1* (At2g02220) kodiert eine 1008-AS lange LRR-RLK, die 60 % AS-Sequenzübereinstimmung zu *DcPSKR1* zeigt und 21 LRRs, eine 36-AS-große Inseleldomäne zwischen der 17. und 18. LRR, eine Transmembrandomäne und eine zytoplasmatische Kinasedomäne besitzt (siehe Abbildung

3.19 und Abbildung 7.5 in Anhang C) (Matsubayashi *et al.*, 2006). Diese LRR-RLK gehört zur LRR X Unterfamilie, zu der unter anderem auch BRI1 und EMS1/EXS zählen (Shiu and Blecker, 2001; Shiu *et al.*, 2004).

### 3.3.2.2 MICROARRAY-EXPRESSIONSANALYSEN DES *ATPSKR1* NACH PAMP- BZW. PATHOGENBEHANDLUNG

Die Auswertung der *Microarray*-Daten des *AtGenExpress* [*Digital Northern* der Genevestigator-Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004; [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch))] ergab, dass die Expression des *AtPSKR1* zum einen durch das Nichtwirtsbakterium *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* und durch die apathogene TTSS-Mutante *hrcC* induziert ist (Abbildung 3.21-A). Zum anderen wird die Expression dieses Gens durch die Elicitoren *flg22* und *HrpZ<sub>PspH</sub>* nach 4 h erhöht (Abbildung 3.20-A). Im Vergleich zum *IMP* fällt die Induktion des Transkripts des *AtPSKR1* nach bakterieller sowie Elicitorbehandlung deutlich geringer aus. Während die Expression des *IMP* nach 24 h Behandlung mit *PspH* ca. 40-fach und mit *Pst hrcC* ca. 25-fach erhöht war (siehe Abbildung 3.13), ist die Expression des *AtPSKR1* durch beide Pathogene nicht mehr als 4fach erhöht. Die Transkription des *AtPSKR1* wird zwar durch *PspH* nach 6 h stärker induziert als nach 24 h, erreicht aber kaum die 5-fache Menge des Kontrollwertes bei  $MgCl_2$ -Behandlung.



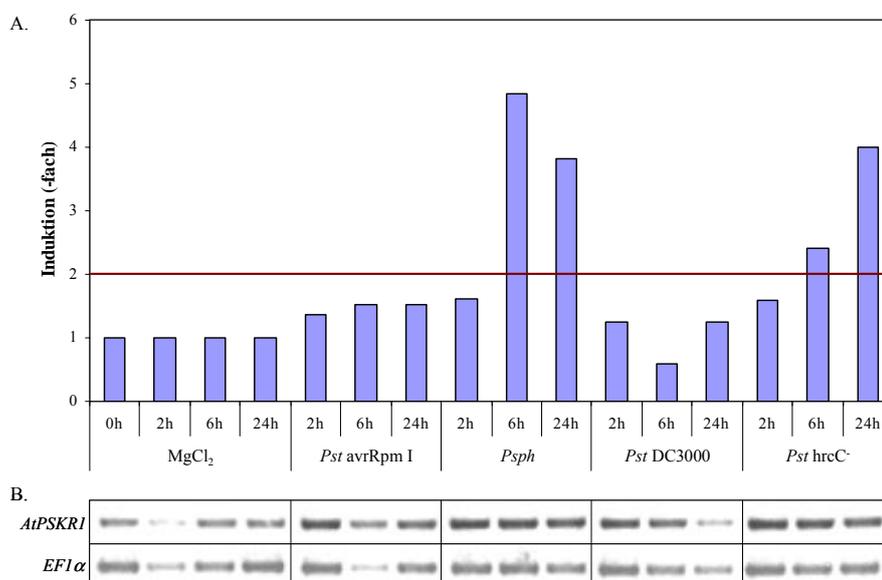
**Abbildung 3.20: Expressionsanalysen für *AtPSKR1* nach Behandlung mit verschiedenen Elicitoren.**

A. *Microarray*-Analysen: Die absoluten Werte der jeweiligen Signalstärke wurden aus der Genevestigator-Datenbank entnommen. Die Mittelwerte der Replikate von jeweils drei unabhängigen Versuchen wurden durch die Mittelwerte der entsprechenden Kontrollproben dividiert. Die Elicitorkonzentrationen waren wie folgt: *HrpZ<sub>PspH</sub>* (10  $\mu$ M), GST-NLP<sub>P<sub>p</sub></sub> (1  $\mu$ M), *flg22* (1  $\mu$ M) und LPS<sub>P<sub>s</sub></sub> (100  $\mu$ g/ml). Nach 1 und 4 Stunden wurden die Proben geerntet. Die rote Linie gibt den Grenzwert der signifikanten Induktion an. B. RT-PCR-Analyse: 6-Wochen-alte *Arabidopsis* Ws-0-Pflanzen wurden mit 1  $\mu$ M *flg22*, H<sub>2</sub>O/10  $\mu$ M pJC40 und 10  $\mu$ M *HrpZ<sub>PspH</sub>* behandelt. Die behandelten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe A.) geerntet, RNA extrahiert in cDNA umgeschrieben und diese in PCRs mit *AtPSKR1*-spezifischen Primern eingesetzt. Als Ladekontrolle diente der konstitutiv exprimierte Elongationsfaktor *EFlα*.

Zur Verifikation der *Microarray*-Daten wurden semiquantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Als Elicitoren wurden nur *flg22* und *HrpZ<sub>PspH</sub>* eingesetzt. Es war deutlich zu sehen, dass

die Expression des *AtPSKR1* durch diese beiden Elicitoren induziert wurde (Abbildung 3.20-B). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden: *flg22* erhöht die Expression des *AtPSKR1* in *Arabidopsis*-Zellen bereits nach 30 min 2,5-fach und nach 60 min 8,7-fach (Kunze *et al.*, 2004), in *Arabidopsis*-Keimlingen nach 30 min 2,7-fach (Zipfel *et al.*, 2006) oder in *Arabidopsis*-Blättern nach 1 h 4,9-fach und nach 4 h 13,6-fach (Qutob *et al.*, 2006). Durch den Elongationsfaktor EF-Tu (*elf26*) wird die Expression des *AtPSKR1* in *Arabidopsis*-Keimlingen nach 1 h 4,8-fach (Zipfel *et al.*, 2006) und durch NLP<sub>pp</sub> in *Arabidopsis*-Blättern nach 1 h 2-fach und nach 4 h 5,4-fach verstärkt (Qutob *et al.*, 2006).

Die RT-PCR zur Überprüfung der *AtPSKR1*-Transkription nach Pathogenbehandlung zeigte keine so starke Induktion der Genexpression wie nach PAMP-Behandlung. Es ist aber trotzdem zu sehen, dass zumindest eine leichte Expressionserhöhung nach Infektion mit allen vier Pathogenen vorhanden ist und dass die Bildung des Transkripts besonders nach Zugabe von *Psph* angeregt wird (siehe Abbildung 3.21-B). Es ist zu erwägen, ob mittels Real-Time-PCR die Unterschiede in der Zukunft besser dargestellt werden könnten.



**Abbildung 3.21: Expressionsanalysen des *AtPSKR1* nach Behandlung mit verschiedenen Pathogenen.**

A. *Microarray*-Analysen: Die absoluten Werte der jeweiligen Signalstärke wurden aus der Genevestigator-Datenbank entnommen. Die Mittelwerte der Replikate von jeweils drei unabhängigen Versuchen wurden durch die Mittelwerte der entsprechenden Kontrollproben dividiert. Alle Versuche wurden mit 5-Wochen-alten Pflanzen durchgeführt. Die Bakterien wurden mit einer Konzentration von  $10^8$  cfu/ml in die Blätter injiziert. Nach 2, 6 und 24 Stunden wurden die Proben geerntet und aufgearbeitet. Die rote Linie gibt den Grenzwert der signifikanten Induktion an. B. RT-PCR-Analyse: 6-Wochen-alte *Arabidopsis* Col-0-Pflanzen wurden mit Bakteriensuspensionen von  $10^8$  cfu/ml infiltriert. Als Kontrolle diente 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Die behandelten Blätter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe A.) geerntet, RNA isoliert und dann eine RT-PCR durchgeführt. Als cDNA-Ladesteuerung diente die Amplifikation von *EFlα*, einem konstitutiv exprimierten Elongationsfaktor.

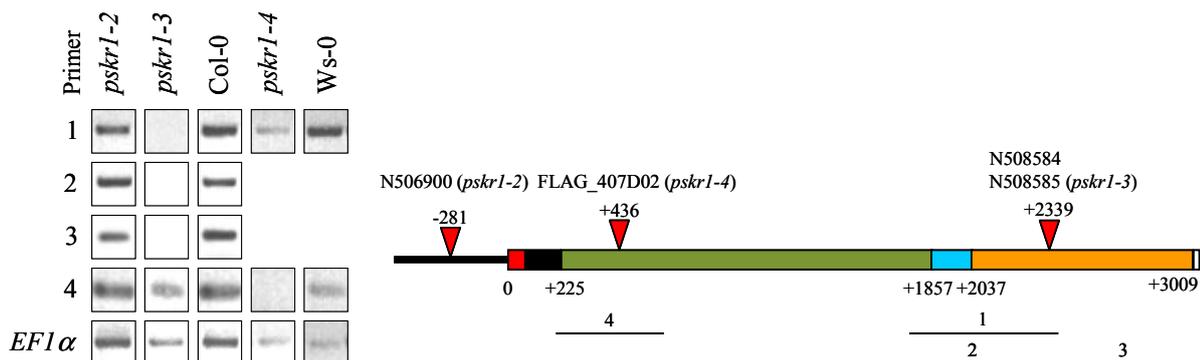
### 3.3.2.3 GENOTYPISIERUNG DER T-DNA-INSERTIONSLINIEN

Um die physiologische Funktion des *AtPSKR1* zu untersuchen, wurden Datenbanken nach möglichen Funktionsverlustmutanten (*loss-of-function mutants*) von *AtPSKR1* durchsucht. Es wurden zunächst drei verschiedene T-DNA-Insertionslinien (N508584, N508585 in der Kinasedomäne und N506900 im Promotorbereich, in Col-0-Hintergrund, Abbildung 3.19) vom SALK-Institut (Alonso *et*

*al.*, 2003) bezogen. Die primäre Genotypisierung dieser Linien wurde durch andere Mitarbeiter dieser Arbeitsgruppe vorgenommen und homozygote T-DNA-Insertionslinien wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt (Susann Möschter, Birgit Kemmerling). Die Genotypisierung ergab, dass die Insertion im Promotorbereich (von hier an als *pskr1-2* bezeichnet) sowie eine der Insertionen in der Kinasedomäne wirklich vorhanden waren, nämlich in der Linie N508585 (*pskr1-3*, Daten nicht gezeigt). Im Verlauf der Arbeit konnte eine weitere T-DNA-Insertionslinie vom *L'institute national de la recherche agronomique* (INRA) (Samson *et al.*, 2002) bezogen werden (FLAG\_407D02 in Ws-0-Hintergrund), deren Insertion im Bereich der LRRs liegt und von nun an als *pskr1-4* bezeichnet wird. Genotypisierungsreaktionen bestätigten auch hier das Vorhandensein der Insertion (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.2.4 NACHWEIS DER GENINAKTIVIERUNG MITTELS RT-PCR

Für den Nachweis der Geninaktivierung des *AtPSKRI* wurden RT-PCR-Reaktionen mit verschiedenen Primerkombinationen durchgeführt. Dazu wurde aus elicitorbehandelten Pflanzen RNA isoliert und diese durch eine Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben, um sie in den PCRs einsetzen zu können.



**Abbildung 3.22: PCR-Analyse zum Nachweis der Geninaktivierung des *AtPSKRI*.**

RNA wurde aus elicitorinduzierten Pflanzen isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese in eine PCR eingesetzt. 1-4 entsprechen den im Modell dargestellten PCR-Produkten. Kombination 1: Primer, die die Kinase-Insertion (*pskr1-3*) umschließen, Kombination 2: Primer, die vor der Kinase-Insertion liegen, Kombination 3: Primer, die hinter der Kinase-Insertion liegen und Kombination 4: Primer, die die Insertion im LRR-Bereich (*pskr1-4*) umschließen (siehe auch Abbildung 7.4 in Anhang C). *EF1α* = Elongationsfaktor *EF1α*-spezifische Primer, als cDNA-Ladungskontrolle.

In Abbildung 3.22 ist zu erkennen, dass für die Primerkombination, die die jeweilige Insertionsstelle umschließt – Kombination 1 für *pskr1-3* und Kombination 4 für *pskr1-4* – in den Pflanzen mit der T-DNA-Insertion im Gegensatz zu den entsprechenden Kontrollpflanzen (Col-0 für *pskr1-3* und Ws-0 für *pskr1-4*) kein Produkt nachzuweisen war. Für *pskr1-3* konnte außerdem gezeigt werden, dass weder mit Primern, die vor der Insertion (Kombination 2), noch mit welchen, die hinter der Insertionsstelle liegen (Kombination 3), ein PCR-Produkt zu amplifizieren war. Ein schwaches Produkt war mit Primern im 5'-Bereich der LRRs (Kombination 4) zu erkennen. Es ist aber wesentlich schwächer als im WT und müsste in Zukunft durch Sequenzierung untersucht werden. In *pskr1-3* könnte also eine vollständige Geninaktivierung des *AtPSKRI* vorliegen. Für *pskr1-4* wurden außer der Insertionsstelle-umschließenden Primer (Kombination 4) noch Primer verwendet, die hinter

der Insertionsstelle liegen (Kombination 1). Mit letzteren Primern ist nach der gleichen Anzahl PCR-Zyklen im WT eine viel stärkere Bande als in *pskr1-4* zu sehen. Das deutet daraufhin, dass die Funktionsfähigkeit des *AtPSKR1* in dieser T-DNA-Insertions-Linie zumindest eingeschränkt sein könnte. Auch hier müsste eine Sequenzierung des PCR-Fragmentes zur Identifikation in Zukunft durchgeführt werden. Bei *pskr1-2*, dessen Insertion im Promotorbereich liegt, existiert dagegen keine Inaktivierung, da mit allen getesteten Primerkombinationen PCR-Produkte ähnlich wie im WT gebildet wurden.

### 3.3.2.5 PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG

Während dieser Arbeit erschien eine Publikation, in der die Phänotypen eines *AtPSKR1*-*knockouts* (*pskr1-1*) und einer *AtPSKR1* überexprimierenden Linie OX2 (*AtPSKR1ox*) mit dem Wildtypphänotyp (Landsberg *erecta*, *Ler*) verglichen wurden (Matsubayashi *et al.*, 2006). Es wurde beschrieben, dass *pskr1-1*-Keimlinge (angezogen bei 22 °C unter Dauerlicht) in etwa mit der gleichen Geschwindigkeit wie Wildtypkeimlinge wuchsen, normal blühten und ihren normalen Lebenszyklus abschlossen, dass aber ihre Blätter eine verfrühte Seneszenz vier Wochen nach der Keimung aufwiesen. Alle Blätter der *pskr1-1*-Pflanzen waren sechs Wochen nach der Keimung abgestorben. Deshalb wurde zunächst der Einfluss von verschiedenen Lichtbedingungen auf die hier verwendeten *AtPSKR1*-T-DNA-Insertionslinien untersucht.

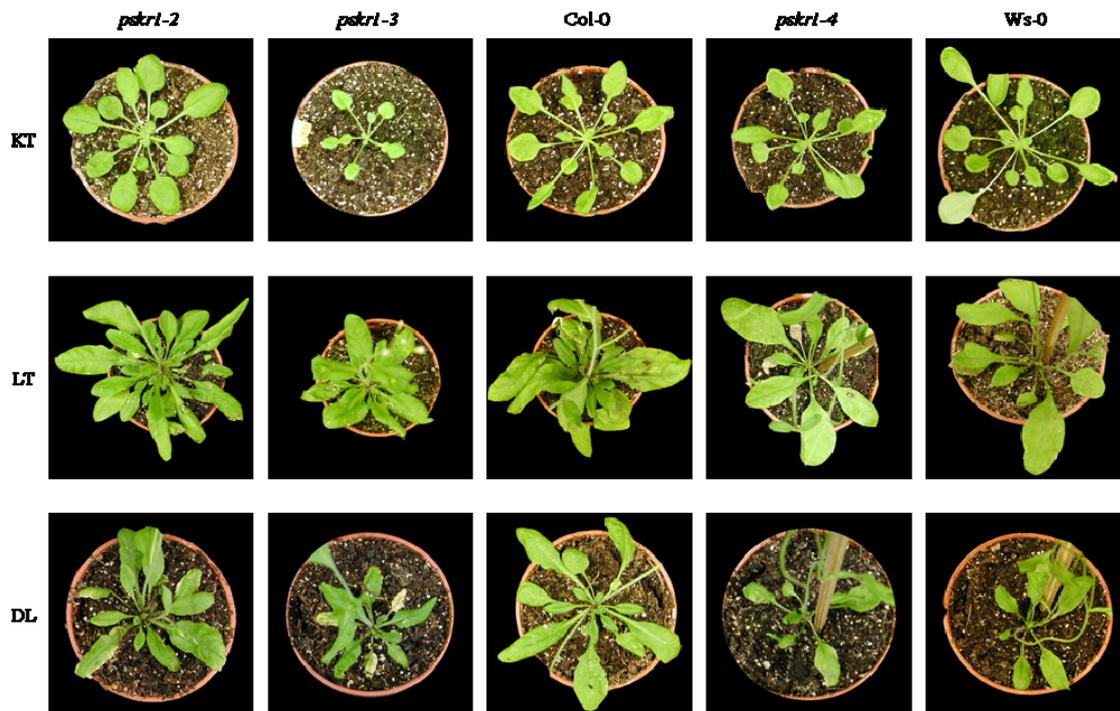
#### 3.3.2.5.1 Lichteinfluss auf das Pflanzenwachstum

Für dieses Experiment wurden die drei Mutanten- und zwei WT-Linien wie gewöhnlich auf Erde ausgesät. Nach der Stratifikation wurden sie einmal unter Kurztag- (bis zum Vereinzeln in Growbanks, danach im Percival), einmal unter Langtag- (Lichtregal) und zum anderen unter Dauerlichtbedingungen (Lichtregal) angezogen.

Die *pskr1-3*-Pflanzen (Abbildung 3.23, 2. Spalte von links) wiesen im Gegensatz zur Beobachtung von Matsubayashi *et al.* (2006), die im Dauerlicht keinen Unterschied im Wachstum erkennen ließen, unter allen drei Bedingungen ein langsames Wachstum als alle anderen Linien auf. Am stärksten sichtbar war dieser Unterschied unter Kurztag-, am wenigsten unter Langtagbedingungen. Dieses verzögerte Wachstum ist nicht auf unterschiedliche Keimungsraten zurückzuführen, da die Samen von *pskr1-3*- und WT-Pflanzen auf ½ MS-Agar gleich schnell gekeimt waren (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung von Matsubayashi *et al.* (2006), dass *pskr1-1*-Pflanzen schon nach vier Wochen Alterungserscheinungen aufzeigten, konnte in diesen Versuchen nur unter Dauerlichtbedingungen, was ihren Versuchsbedingungen entspricht, und hauptsächlich für die Linie mit der T-DNA-Insertion in der Kinasedomäne (*pskr1-3*) bestätigt werden. Nach vier Wochen fingen auch hier die ältesten Blätter zu altern an. Der Unterschied war aber nicht so gravierend, wie bei Matsubayashi *et al.* dargestellt, allerdings wurde dort auch mit einem anderen Ökotyp (Landsberg *erecta*) gearbeitet. Die Pflanzen der Promotorinsertionslinie (*pskr1-2*) wiesen nach fünf Wochen vereinzelt braune Blätter auf, deren Anzahl sich nach der sechsten Woche aber nicht von den Col-0-Pflanzen unterschied. Die Blätter der Linie mit der Insertion im LRR-Bereich (*pskr1-4*) entwickelten innerhalb einer Woche sehr

starke Alterungserscheinungen, was aber eher am Ökotyp (Wassilewskija) lag als an der Schädigung des Gens, da die WT-Pflanzen das gleiche Phänomen aufzeigten.



**Abbildung 3.23: Phänotypen von Pflanzen mit T-DNA-Insertion und WT-Pflanzen nach fünf Wochen.** *Arabidopsis*-Pflanzen sind bei verschiedenen Lichtverhältnissen auf dampfsterilisierter Erde angezogen worden. KT = Kurztag (Percival), LT = Langtag (Lichtregal), DL = Dauerlicht (Lichtregal). Die Pflanzen wurden fünf Wochen nach Stratifikation fotografiert.

### 3.3.2.5.2 Einfluss von Salzstress auf das Wurzelwachstum

Den *Microarray*-Daten von *AtGenExpress* [Genevestigator-Datenbank (Zimmermann *et al.*, 2004; [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch))] zufolge wird die Expression von *AtPSKRI* in den Wurzeln leicht erhöht, wenn die Pflänzchen in einem NaCl-haltigen Medium wachsen (siehe Tabelle 3-8).

**Tabelle 3-8: Einfluss von Salz auf die Expression des *AtPSKRI*.**

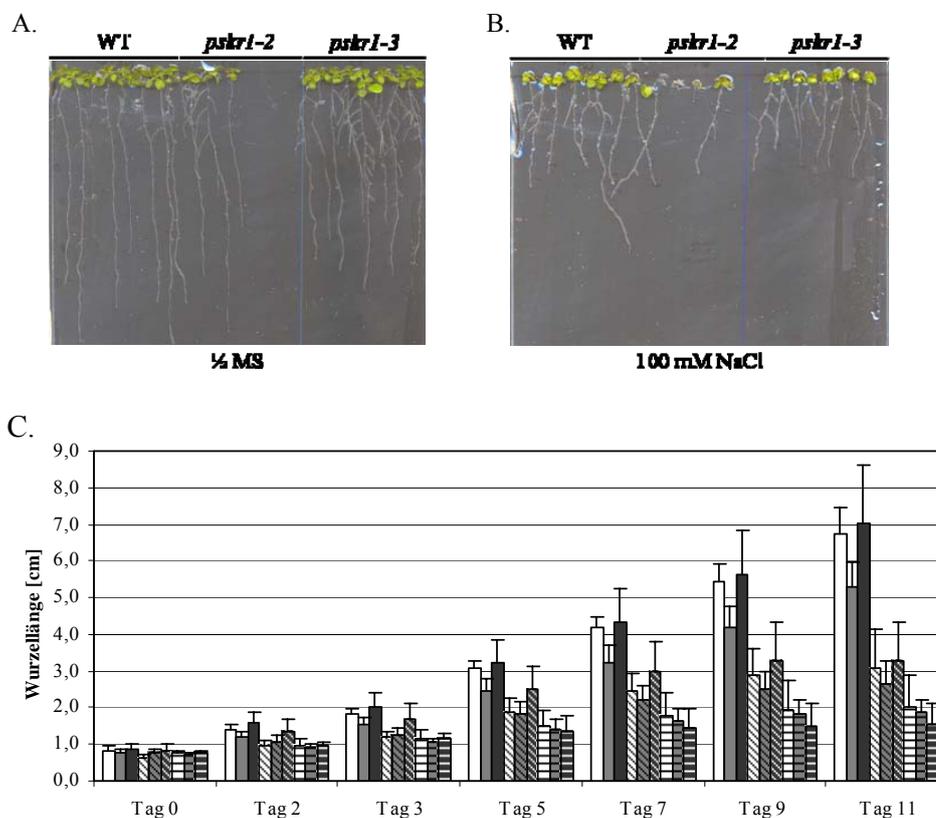
Salzstress				
Zeitpunkt der Ernte	½ h	1 h	3 h	24 h
Induktion (-fach)	1,1	1,8	2,3	1,9

Die Daten wurden der Genevestigator-Datenbank ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann *et al.*, 2004) entnommen.

Deshalb wurden Wurzellängenuntersuchungen auf ½ MS-Agarplatten durchgeführt, denen als Stressor zunächst steril filtriertes 150 mM NaCl zugefügt wurde. Es stellte sich aber heraus, dass diese Konzentration zu hoch war, da die Keimlinge nicht mehr in der Lage waren zu wachsen. Daraufhin wurde die Konzentration auf 100 mM NaCl herabgesetzt. Die Auswertung dieser Experimente zeigte ein unerwartetes Ergebnis (siehe Abbildung 3.24).

Wie schon erwähnt, sieht man deutlich, dass das Salz einen Einfluss auf das Wurzellängenwachstum hat. In Abbildung 3.24-C stellen die unschraffierten Balken das Wachstum auf den

Kontrollplatten, die schräg schraffierten das auf 100 mM NaCl und die waagrecht schraffierten das auf 130 mM NaCl enthaltenen Platten dar. Es ist zu erkennen, dass die Wurzeln der Pflänzchen auf dem Agar mit der hohen NaCl-Konzentration nicht viel mehr als die doppelte Länge erlangten. Viele von ihnen sind gar nicht weiter gewachsen (in Abbildung 3.24-B z.B. bei *pskr1-2* erkennbar). Die Länge der Wurzeln auf den Platten mit 100 mM NaCl nahm im Laufe der Zeit zu. Es ist aber kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Linien wahrnehmbar (siehe Abbildung 3.24-B). Was aber auffällig war, war das langsamere Wurzelwachstum der Linie *pskr1-3* (Insertion in der Kinasedomäne) auf den  $\frac{1}{2}$  MS-Kontrollplatten (siehe auch Abbildung 3.24-A und 3.24-C, graue Balken: ab Tag 5 ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Wurzellängen der WT- und *pskr1-3*-Pflänzchen zu sehen). Das Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt und jedes Mal zeigte sich dieses verkürzte Wurzellängenwachstum der *pskr1-3* schon auf den Kontrollplatten Die Linie mit der Promotorinsertion (*pskr1-2*) zeigte im Vergleich zum WT kein signifikant verändertes Wurzellängenwachstum.

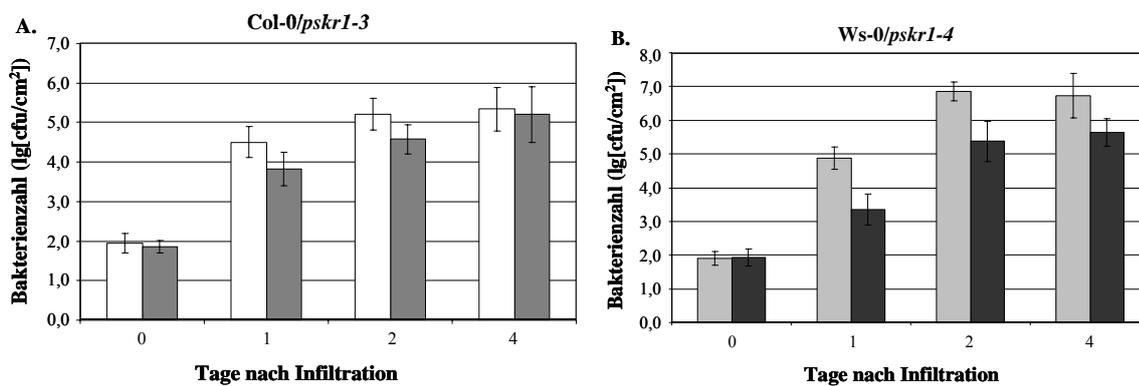


**Abbildung 3.24: Wurzellängenexperimente in *pskr1*- und WT-Linien.**

7-Tage-alte, auf  $\frac{1}{2}$  MS angezogene Keimlinge wurden entweder auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar (A) oder auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 100 mM NaCl (B) umgesetzt und das Foto nach 11 Tagen gemacht. (C) Die Positionen der Wurzelspitzen nach Wachstum auf  $\frac{1}{2}$  MS-Agar oder auf  $\frac{1}{2}$  MS mit 100 mM oder 130 mM NaCl wurden an den Tagen 0, 2, 3, 5, 7, 9 und 11 markiert. Das Längenwachstum der Wurzeln zu den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem Programm Scion-Image vermessen und zur Gesamtlänge zusammengefügt. Die Anzahl der untersuchten Pflanzen ist  $n=24$  (WT und *pskr1-3*) und  $n=9$  (*pskr1-2*). □ = WT, ■ = *pskr1-3*, ■ = *pskr1-2*, ungeschrafft =  $\frac{1}{2}$  MS (Kontrolle), schräg = 100 mM NaCl, waagrecht = 130 mM NaCl.

3.3.2.5.3 Bakterienwachstumstest mit *Pst* DC3000

Die RT-PCR-Analysen zur Expression des *AtPSKRI* wiesen darauf hin, dass eine Behandlung mit dem virulenten *Pseudomonas*-Stamm *Pst* DC3000 in einer erhöhten *AtPSKRI*-Transkriptmenge resultierte. Um zu sehen, welchen Einfluss diese Bakterien auf die T-DNA-Insertionslinien haben, wurden die Blätter der *pskr1-3*- und *pskr1-4*- sowie ihrer entsprechenden WT-Linien mit *Pst* DC3000 infiziert und anschließend wie unter Kapitel 2.2.3.3 weiter bearbeitet. Diese Experimente wurden von Patricia Rodriguez durchgeführt. In Abbildung 3.25 ist zu erkennen, dass sich die virulenten Bakterien in den einzelnen Pflanzenlinien ausbreiten, wobei ihre Vermehrung jedoch in *pskr1-3*- und verstärkt in *pskr1-4*-Pflanzen gehemmt wird.



**Abbildung 3.25: Bakterienwachstumsversuche in *pskr1-3*- (A) und *pskr1-4*- Linien (B) nach Infiltration von *Pst* DC3000.**

Die Pflanzen wurden 6 Wochen unter Kurztagbedingungen in Erde angezogen, und pro Pflanze wurde ein Blatt mit einer Bakteriensuspension von  $10^4$  cfu/ml inokuliert. Direkt nach der Inokulation und am 1., 2. und 4. Tag danach wurden die Blätter geerntet und definierte Bereiche daraus ausgestochen. Die ausgestochenen Bereiche wurden mit einem Handmörser in 10 mM  $MgCl_2$  homogenisiert und in Verdünnungsreihen auf LB-Agarplatten ausplattiert, inkubiert und ausgezählt. Angegeben sind der dekadische Logarithmus der Mittelwerte und deren Standardabweichungen ( $n = 8$ ). □ = Col-0, ■ = *pskr1-3*, ■ = Ws-0 und ■ = *pskr1-4*. (Abbildung von Patricia Rodriguez).

## 4 DISKUSSION

Pflanzen ist es möglich, sich vor Infektionen durch phytopathogene Mikroorganismen wie Bakterien, Oomyceten und Pilze mit einer Vielzahl an Abwehrreaktionen zu schützen. Für die Einleitung der Abwehr ist die Wahrnehmung des potenziellen Pathogens von ausschlaggebender Bedeutung. Die Forschungsarbeiten der vergangenen Jahre haben gezeigt, dass dabei die Erkennung im Zuge der angeborenen Immunität in tierischen und pflanzlichen Systemen ähnlich erfolgt und mit der Bindung von PAMPs an entsprechende Rezeptoren beginnt. Diese Komplexbildung initiiert im weiteren Verlauf intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden und löst die Aktivierung von Abwehrreaktionen aus. Obwohl große Fortschritte in der Aufklärung der Signalerkennung und -weiterleitung erzielt wurden, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen längst nicht vollständig bekannt.

Der Annahme folgend, dass eine transkriptionelle Aktivierung von Signalerkennungs- und -transduktionskomponenten ein Hinweis auf ihre Funktion in PAMP-spezifischen Abwehrreaktionen ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit Gene identifiziert, deren Expression zunächst nach PAMP-Behandlung in Petersiliezellensuspensionskulturen induziert wurde. Ausgewählte Gene wurden hinsichtlich ihrer PAMP-spezifischen Expression in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana* vergleichend untersucht. Anschließend wurden zwei Gene auf ihre Rolle bzw. Funktion in der pflanzlichen Immunantwort in *A. thaliana* näher charakterisiert.

### 4.1 STRATEGIEN ZUR IDENTIFIZIERUNG DIFFERENZIELL EXPRIMIERTER GENE

Für die Isolierung differenziell exprimierter Gene existiert eine Reihe unterschiedlicher Strategien. Es wird zwischen offenen und geschlossenen Expressionssystemen unterschieden. Zu den geschlossenen Systemen zählen solche, die auf bekannten Genomsequenzen aufbauen wie die *Macro*- oder *Microarray*-Technologien (Schena *et al.*, 1995). Ihre Stärke liegt in der gleichzeitigen Betrachtung zehntausender Gene (De Paepe *et al.*, 2004). Die offenen Systeme sind sequenzunabhängig und können zur Identifizierung neuer Gene, besonders in Organismen mit unbekannter Genomsequenz, eingesetzt werden. Während einige dieser Methoden darauf spezialisiert sind, quantitative Expressionsdaten zu erhalten und eine hohe Zahl an Genen zu untersuchen, legen andere ein besonderes Augenmerk auf die Identifizierung neuer und seltener Transkripte, die differenziell exprimiert werden (Reijans *et al.*, 2003). Zu solchen Techniken gehören unter anderem *Differential Display* (Liang and Pardee, 1992), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995) und *cDNA-Amplified Fragment Length Polymorphism* (cDNA-AFLP) (Bachem *et al.*, 1996; Vos *et al.*, 1995).

Die cDNA-AFLP-Analyse ist eine PCR-basierte Transkriptprofiltechnologie, die sowohl eine hohe Spezifität als auch die Fähigkeit seltene Transkripte zu erkennen, miteinander verbindet (De Paepe *et al.*, 2004). Ihre Sensitivität ist deshalb höher als die von Techniken, die auf Hybridisierungen beruhen. Ein besonderer Vorteil des Einsatzes der cDNA-AFLP-Technik liegt darin, dass sie für quantitative genomweite Expressionsanalysen in Organismen genutzt werden kann, bei denen Sequenzinformationen zum Genom nur begrenzt vorhanden sind (Reijans *et al.*, 2003). Dies ist unter anderem bei Petersilie der Fall. cDNA-AFLP-Analysen wurden in zahlreichen Studien bereits

erfolgreich angewandt (Bachem *et al.*, 1996; Breyne *et al.*, 2003; De Paepe *et al.*, 2004; Dubos and Plomion, 2003; Durrant *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Noel *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2000; Simoes-Araujo *et al.*, 2002), weshalb in dieser Arbeit auf diese Methode für die Identifizierung PAMP-induzierbarer Transkripte in Petersilie zurückgegriffen wurde.

Für die vergleichende Analyse in *Arabidopsis thaliana* wurde jedoch die *Microarray*-Technik vorgezogen, da das Genom dieser Pflanze bekannt ist und kommerzielle *Microarrays* mit fast allen Genen zur Verfügung stehen. So konnten gleichzeitig 22.746 DNA-Proben hinsichtlich ihres Expressionsniveaus verglichen werden. Die entsprechenden *Microarray*-Versuche waren außerdem im Zuge der *AtGenExpress*-Initiative innerhalb der Arbeitsgruppe schon durchgeführt worden, so dass die Daten direkt genutzt werden konnten.

## **4.2 IDENTIFIZIERUNG PAMP-REGULierter GENE IN *PETROSELINUM CRISPUM* MITTELS cDNA-AFLP**

Ein Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der cDNA-AFLP-Analyse in Petersilie Gene zu identifizieren, die mögliche Komponenten des Signalweges kodieren, der durch die Erkennung von PAMPs Abwehrreaktionen gegen Pathogene einleitet und die Pflanze so vor Krankheit schützt. Die Versuche sollten in Petersiliezellsuspensionskulturen durchgeführt werden, da dieses System, insbesondere zu Beginn dieser Arbeit, eines der am besten etablierten pflanzlichen Modellsysteme darstellte (Blume *et al.*, 2000; Eulgem *et al.*, 1999; Hirt, 2000; Ligterink *et al.*, 1997; Nürnberger and Scheel, 2001).

Die statistische Auswertung hat gezeigt, dass die cDNA-AFLP-Technik dafür geeignet ist, differenziell regulierte Gene in Petersiliezellsuspensionskulturen zu erkennen, denn im Experiment waren in 79 % der Primerkombinationen Transkripte mit erhöhter Bandenintensität nachweisbar. Dies entspricht ca. 8 % der Gesamtbandenzahl. Dieses Ergebnis ähnelt den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, die durch die cDNA-AFLP-Methode die Änderung des Genexpressionsmusters nach Pathogen- oder PAMP-Behandlung analysiert haben (Durrant *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2006; Mysore *et al.*, 2002).

Beim cDNA-AFLP besteht eine ausgeschnittene Bande in der Mehrzahl der Fälle aus einem heterogenen Gemisch von cDNA-Fragmenten, so dass für die Ermittlung der Sequenz die Klonierung der Fragmente unumgänglich ist (Baldwin *et al.*, 1999). Mit Hilfe der BLASTX-Datenbankanalyse (Altschul *et al.*, 1997) konnte nach erfolgreicher Klonierung für 1571 der 2538 (62 %) Fragmente eine mögliche Funktion in Pflanzen gefunden werden. 95 Klone (3,7 %) wurde eine homologe Funktion aus anderen Organismen zugeordnet. Für die restlichen 872 Klone (34,4 %) wurde keine homologe Sequenz zu irgendeinem Protein anderer Organismen gefunden. Dies kann auf petersiliespezifische Sequenzen hindeuten oder auf Verunreinigungen während einzelner Syntheseschritte zurückzuführen sein.

Da das Ziel der Arbeit in der Identifizierung neuer PAMP-regulierter Gene lag, wurde im Ergebnisteil nicht auf schon für Petersilie beschriebene Proteine wie z.B. solche des Phenylpropanstoffwechsels eingegangen. Es soll aber hier erwähnt werden, dass die Expression der Gene, die Enzyme des ungesättigten Fettsäuremetabolismus,  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6 Fettsäuredesaturase (Kirsch *et al.*, 1997a; Kirsch *et al.*, 1997b), und des Phenylpropanstoffwechsels, trans-Zimtsäure-4-monooxygenase

(C4H) und 4-Cumarinsäure-CoA Ligase (4Cl-1) (Logemann *et al.*, 1995; Lois *et al.*, 1989; Lozoya *et al.*, 1988), sowie der Gene, die das *immediate-early fungal elicitor protein* CMPG1 (Eli17) (Kirsch *et al.*, 2001), Tyrosindecaboxylasen (Kawalleck *et al.*, 1993), verschiedene WRKY-Transkriptionsfaktoren (Rushton *et al.*, 1996), *BPF-1a* (da Costa e Silva *et al.*, 1993), *Eli7* (Fettsäuredesaturase/hydroxylase-ähnliches Protein) (Takamiya-Wik, 1995), *PRI* (Rushton *et al.*, 1996; Somssich *et al.*, 1989; Somssich *et al.*, 1986) und eine anionische Peroxidase (Kawalleck *et al.*, 1995) kodieren (Batz *et al.*, 1998), durch alle vier getesteten PAMPs induziert wird.

Für viele Gene, deren Expression durch Zugabe von PAMPs gesteigert wurde, konnten homologe Sequenzen (Gene) in anderen Pflanzen gefunden werden. Viele Gene mit erhöhter Transkriptmenge kodieren Signalkomponenten, zu denen Transkriptionsfaktoren, Proteinkinasen und –phosphatasen sowie Proteine, die den Proteinumsatz regulieren, gehören (siehe Tabelle 3-2). Es ist gut vorstellbar, dass reversible Phosphorylierungen in der Aktivierung und Deaktivierung von MAP-Kinasekaskaden und anderen kinaseabhängigen Signaltransduktionswegen, die durch Elicitoren oder andere Stresssignale hervorgerufen werden, eine Rolle spielen (Navarro *et al.*, 2004). Die Identifizierung von 26 Proteinkinasen und vier Phosphatasen (Tabelle 3-2) ist daher nicht unerwartet. Einige der identifizierten Proteine sind in den Proteinabbau involviert. Eines der ersten Reaktionen der angeborenen Immunität in Säugetieren ist der Abbau von  $\kappa\text{B}$  durch das Proteasom, der die Translokation von NF- $\kappa\text{B}$ -Transkriptionsfaktoren in den Zellkern ermöglicht und so die Transkription aktiviert (Ben-Neriah, 2002; Karin and Ben-Neriah, 2000; Karin *et al.*, 2006; Read *et al.*, 2000; Silverman and Maniatis, 2001). In pflanzlichen Abwehrmechanismen wird SGT1, ein zum SCF (Skp1–Cullin–E-Box-Protein)-Komplex assoziiertes Protein, für den Proteinumsatz in der Auxinreaktion benötigt (Austin *et al.*, 2002; Dharmasiri and Estelle, 2004; Gray *et al.*, 2003; Kanneganti *et al.*, 2006; Peart *et al.*, 2002). Es wird aber auch beschrieben, dass SGT1 direkt oder indirekt mit einigen NBS-LRR R-Proteinen interagiert, wodurch einerseits ihre Menge, andererseits ihre intra- und intermolekularen Interaktionen kontrolliert werden (Azevedo *et al.*, 2006; Goritschnig *et al.*, 2007; Holt *et al.*, 2003; Mayor *et al.*, 2007). Unter den induzierten Genen existieren auch zwei, die RING-Zinkfingerproteine kodieren. Diesen Proteinen wird eine E3-Ligase-Aktivität zugeschrieben und vorangegangene Studien zeigten ihren Beitrag in Reaktionen nach Elicitorbehandlung (Kawasaki *et al.*, 2005; Takai *et al.*, 2002). Zwei weitere Gene, deren Expression durch die PAMPs aktiviert wurde, kodieren F-Box-Proteine. F-Box-Proteine sind Komponenten des E3-Ligase-Komplexes, geben dem SCF-Komplex seine Substratspezifität, indem sie das Substrat binden, und sind somit in den Transport von zum Abbau bestimmter Proteine involviert, indem sie diese zur Ubiquitinierung an den Komplex führen. Dieser Vorgang wird durch den Abbau im Proteasom vervollständigt (Deshaies, 1999; Kipreos and Pagano, 2000; Risseuw *et al.*, 2003). Neuerdings gab es Hinweise darauf, dass ein durch flg22 aktivierter FLS2-Rezeptor durch Endocytose internalisiert wird und anschließend höchstwahrscheinlich dem Proteasom zum Abbau zugeführt wird (Robatzek *et al.*, 2006). Desweiteren wurden durch die cDNA-AFLP-Analyse einige RLKs identifiziert, die in der Signalerkennung eine Rolle spielen könnten (siehe Tabelle 3-2 und Kapitel 4.6.2).

Von den 100 in Tabelle 3-2 ausgewählten Kandidatengenomen scheinen 17 % PAMP-spezifisch zu reagieren. Dieses Ergebnis konnte aber in den durchgeführten *Macroarray*- oder RT-PCR-Analysen nicht bestätigt werden. Es deutet eher daraufhin, dass die vier untersuchten Elicitoren einen ähnlichen Einfluss auf die Expression pflanzlicher Gene der Immunität ausüben. Zu einer entspre-

chenden Schlussfolgerung kamen auch Zipfel *et al.* (2006), die feststellten, dass die Rezeptoren FLS2 und EFR in *Arabidopsis* durch bakterielles LPS, Chitin aus Pilzen und dem oomycetenabgeleiteten NLP<sub>pp</sub> induziert werden. Zu diesen LRR-RLKs gehört unter anderem auch der in dieser Arbeit untersuchte Phytosulfokinrezeptor AtPSKR1, dessen Expression durch flg22 und EF-Tu (elf26) in *Arabidopsis* bereits frühzeitig erhöht vorliegt (Kapitel 3.3.2.2) (Kunze *et al.*, 2004; Qutob *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006). Dieser Annahme folgend wird vermutet, dass auch der von unserer Arbeitsgruppe untersuchte Pep13-Rezeptor durch Pep13 und möglicherweise andere PAMPs aktiviert wird.

Um die erhaltenen DNA-Sequenzen vielseitig zu nutzen, wurden sie aufgrund ihrer sechs verschiedenen offenen Leserahmen und mit Hilfe des Programms *translate* (<http://expasy.org/tools/dna.html>) des *ExPASy* (*Expert Protein Analysis System*) *Proteomics Servers* des schweizerischen Instituts für Bioinformatik (SIB) in ihre zugehörigen Proteinsequenzen umgeschrieben. Versuche unserer Arbeitsgruppe den Pep13-Rezeptor aus Petersilie mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen, beinhaltete die Ermittlung der Peptidsequenzen einer LC-MS/MS-Analyse nach einem Trypsinverdau. Die erhaltenen Sequenzen waren zwischen fünf und zwölf Aminosäuren lang. Der Vergleich der Peptidsequenzen mit den translatierten DNA-Sequenzen des cDNA-AFLP-Experiments sollte idealerweise dabei helfen, neue Erkenntnisse zum Pep13-Rezeptor zu erlangen. Diese Gegenüberstellung zeigte allerdings höchstens eine Übereinstimmung von fünf zusammenhängenden Aminosäuren, jedoch keine zu einem vollständigen MS-Fragment. Daraus folgt, dass der Pep13-Rezeptor auf diese Weise nicht erfolgreich ermittelt werden konnte. Es macht auch deutlich, dass der cDNA-AFLP-Methode Grenzen gesetzt sind.

Da die cDNA-AFLP-Analyse viel sensitiver als Hybridisierungstechniken ist (De Paepe *et al.*, 2004; Reijans *et al.*, 2003), ist es nicht verwunderlich, dass einige der im AFLP als induziert identifizierten Gene nicht in der *Macroarray*-Auswertung zu finden waren. Erstaunlich ist dagegen, dass die unterschiedliche Expression einiger Gene nicht durch die RT-PCR-Analyse verifiziert werden konnte, da diese Methode wie auch die cDNA-AFLP-Analyse auf der PCR-Technik basiert und somit sehr empfindlich ist. Eine Erklärung wäre, dass die Sequenzdaten, die für die semiquantitative RT-PCR-Analyse ausgesuchten Klone, nicht das Fragment repräsentierten, dessen Expression im cDNA-AFLP-Experiment erhöht vorgelegen hatte.

### **4.3 VERGLEICHENDE ANALYSE PAMP-INDUZIERBARER GENE IN ARABIDOPSIS-PFLANZEN UND -PROTOPLASTEN**

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Gegenüberstellung PAMP-induzierbarer Veränderungen im Transkriptom von *Arabidopsis*-Pflanzen und -Protoplasten anhand von *Microarray*-Analysen der *AtGenExpress*-Initiative und Daten, die von Jen Sheen zur Verfügung gestellt wurden. Die Gruppe von Jen Sheen hat zur Analyse früher Signaltransduktionswege in pflanzlichen Immunreaktionen einen Test etabliert, der auf flg22-induzierbarer Transkription von frühen Abwehrgenen in *Arabidopsis*-Mesophyllprotoplasten basiert (Asai *et al.*, 2002; Sheen, 2001). Sie konnten zeigen, dass isolierte Mesophyllprotoplasten gewöhnlich aktive und homogene Zellpopulationen verkörpern. Diese waren für synchronisierte pharmakologische und biochemische Behandlungen, die Analyse von frühen und transienten Reaktionen und insbesondere für DNA-Transformationen zugänglich (Sheen, 2001) und stellten so eine gute Ausgangsbasis für Transkriptomanalysen dar (Asai *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006). Da bisher nicht gezeigt werden konnte, dass Pep13 einen Einfluss auf *Arabidopsis thaliana*

hat, wurden für die *Microarray*-Experimente die bakteriellen PAMPs flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und LPS und der oomycetische Elicitor NLP<sub>Pp</sub> verwendet. flg22 konnte dagegen nicht in den cDNA-AFLP-Analysen in Petersilie eingesetzt werden, da es wie auch für Reis beschrieben (Felix *et al.*, 1999) keine Stimulation von Abwehrreaktionen hervorzurufen scheint.

Die *Microarray*-Analysen, die mit RNA aus elicitorbehandelten *Arabidopsis*-Blättern durchgeführt wurden, ließen erkennen, dass ein hoher Anteil des Transkriptomts sowohl durch die bakteriellen PAMPs flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> als auch NLP<sub>Pp</sub>, einem PAMP eines Oomyceten, coexprimiert wird. Eine Ausnahme bildete das bakterielle LPS. Dies lag aber wahrscheinlich daran, dass die Expression relativ weniger Gene induziert wurde, LPS also einen vergleichsweise schwachen PAMP in *Arabidopsis* darstellt (siehe Kapitel 3.2.1). Dies ist auch schon anhand der eingesetzten Konzentrationen ersichtlich: LPS wurde mit 100 µg/ml eingesetzt, flg22 dagegen nur mit 1 µM. Zeidler *et al.* haben verschiedene LPS-Präparationen auf ihre Responsivität in *Arabidopsis*-Zellen getestet und festgestellt, dass die eingesetzte Konzentration von 100 µg/ml bei weitem höher ist als die in tierischen Systemen, wo in Makrophagen LPS im pg/ml-Bereich ausreichen, um die TLR4-vermittelte Signaltransduktion einzuleiten (Zeidler *et al.*, 2004). Aufgrund der geringen Menge an LPS-induzierten Transkripten ist nur die Expression eines geringen Prozentsatzes an Genen durch alle vier PAMPs erhöht (siehe Abbildung 3.8). Wird jedoch nur die Schnittmenge der Gene, deren Expression durch flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und NLP<sub>Pp</sub> erhöht wird, betrachtet, so ist zu erkennen, dass die Transkriptmenge der meisten Gene durch alle drei Elicitoren beeinflusst wird. Auch die Auswertung der *Microarray*-Daten, die aus der Behandlung von *Arabidopsis*-Protoplasten mit flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, LPS und NLP<sub>Pp</sub> stammten, lieferten ein ähnliches Ergebnis: Die Expression der meisten Gene wird durch alle vier PAMPs gleichermaßen angeregt (Abbildung 3.9). Werden die PAMP-induzierten Gene in *Arabidopsis*-Pflanzen und –Protoplasten miteinander verglichen, so ist zu sehen, dass nur etwa 60 % der in Pflanzen beeinflussten Transkripte auch in den Protoplasten transkriptionell aktiviert werden (Tabelle 3-6). Zu den restlichen Genen gehören zu 63 % solche, die in Pflanzen erst nach 4 h verstärkt exprimiert wurden, also im Protoplastenassay noch gar nicht wahrgenommen werden konnten (nur 1 h untersucht). Außerdem könnten differenzielle Perzeptionskinetiken eine Rolle spielen.

#### 4.4 KONSERVIERTE SIGNALWEGE IN DER PAMP-AUSGELÖSTEN IMMUNITÄT IN PETERSILIE UND *ARABIDOPSIS*

Werden die durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, LPS und NLP<sub>Pp</sub> ausgelösten Reaktionen in Petersilie und *Arabidopsis* miteinander verglichen, kann festgestellt werden, dass die Expression von ca. 2/3 der betrachteten Gene gleichermaßen induziert wird (Tabelle 3-6). Daraus folgt, dass jeder der PAMPs eine komplexe Transkriptomreaktion hervorruft, die u.a. die Grundlage für die Aktivierung einer allgemeinen pflanzlichen Immunantwort ist. Zu diesen Reaktionen gehören insbesondere die Bildung von Phytoalexinen und die Expressionserhöhung eines breiten Spektrums an Genen, die in die pflanzliche Pathogenabwehr involviert sind. Dies beinhaltet Gene, die rezeptorähnliche Proteinkinasen, *disease resistance-like proteins*, Transkriptionsfaktoren, pathogenitäts-/abwehrverwandte Proteine und eine Reihe anderer Proteine kodieren. Auch Zipfel *et al.* haben 2006 bei der Identifizierung des Rezeptors für den Elongationsfaktor EF-Tu festgestellt, dass nach der EF-Tu-Erkennung die gleichen MAPKs aktiviert werden wie nach flg22-Erkennung (Zipfel *et al.*, 2006). Sie haben außerdem *Microarray*-Experimente mit *Arabidopsis*-Keimlingen durchgeführt, die mit flg22 oder mit elf26 behandelt wurden

(Zipfel *et al.*, 2006). Werden die so gewonnenen *Microarray*-Daten (Zipfel *et al.*, 2006, Supplementary Table 1) mit denen aus Tabelle 3-5 verglichen, ist zu erkennen, dass die Expression von ca. 60 % der dort dargestellten Gene (186) auch durch elf26 induziert wird. 40 der 50 Gene, deren Transkripte durch flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und NLP<sub>Pp</sub> nach 1 h in Pflanzen erhöht werden, werden auch durch elf26 nach 1 h in Keimlingen verstärkt gebildet, d.h. dass ca. 22 % der in Tabelle 3-5 erwähnten Gene coexprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Interessant ist bei dieser Gegenüberstellung, dass die größte Übereinstimmung bei den *S-locus-RLKs* (4/7), bei den MLO-Proteinen (3/4) und bei den WRKY-Transkriptionsfaktoren (6/15) auftritt (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wird hauptsächlich die Expression der frühen Gene durch mehrere PAMPs verstärkt. Gene, die Proteine des Hormonhaushalts kodieren, und einige pathogenitäts-/abwehrverwandte Gene werden erst nach 4 h und nicht durch alle untersuchten PAMPs vermehrt exprimiert. So werden z.B. die Lipidtransferproteine hauptsächlich durch flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> beeinflusst, wogegen einige Gene (wie AIG1, AIG2 und EDS5), die eher Gegenstand der effektorausgelösten Immunität sind, hauptsächlich durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und NLP<sub>Pp</sub> transkribiert werden (Tabelle 3-5). Ein Merkmal pflanzlicher Abwehrmechanismen ist die hypersensitive Reaktion (HR). Während sie für NLP<sub>Pp</sub> in *Arabidopsis thaliana* (Fellbrich *et al.*, 2002) und für HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> in Tabak nachgewiesen werden konnte (Lee *et al.*, 2001a), ist das für HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> in *Arabidopsis* nicht der Fall (unveröffentlichte Daten, Engelhardt und Nürnberger).

Der Vergleich von Petersilie und *Arabidopsis* wies auch daraufhin, dass nur etwa 1/3 der Gene artspezifisch reguliert wird. Es ist durchaus möglich, dass nicht jeder PAMP von jeder Pflanze genauso gut erkannt wird. Dies wird durch die Elicitoren Pep13 und flg22 verdeutlicht. Während flg22 durch FLS2 in *Arabidopsis* erkannt wird (Chinchilla *et al.*, 2006; Gomez-Gomez and Boller, 2000) und anschließend eine Signalkaskade aktiviert, die zur Auslösung von Abwehrreaktionen führt (Asai *et al.*, 2002; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Zipfel *et al.*, 2004), ist das in Petersilie nicht der Fall. Genau umgekehrt verhält sich Pep13. Es wird durch einen 100 kDa-Rezeptor in Petersiliezellen erkannt (Nennstiel *et al.*, 1998; Nürnberger *et al.*, 1995) und löst dort verschiedene Abwehrmechanismen aus (Batz *et al.*, 1998; Jabs *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003; Nürnberger *et al.*, 1994). In dieser Arbeit konnte dagegen gezeigt werden, dass Pep13 in *Arabidopsis* keine typischen Abwehrreaktionen wie eine Alkalisierung des Mediums oder eine Aktivierung von *PR1* sowie weiterer Abwehrgene hervorruft. Auch wird das Wachstum oder die Entwicklung der Pflanzen, die auf Medium wachsen, das Pep13 enthält, nicht beeinflusst (siehe Kapitel 3.2.3). Ein ähnliches Verhalten zeigt EF-Tu. Die Behandlung mit EF-Tu hat bis jetzt nur Abwehrreaktionen in Pflanzen der Familie der *Brassicaceae* wie *Arabidopsis thaliana*, *Brassica alboglabra* oder *B. oleracea* hervorgerufen (Kunze *et al.*, 2004). Andere Pflanzen wie Tabak, Kartoffel, Tomate oder Sojabohne waren unempfindlich auf die Zugabe von EF-Tu (Kunze *et al.*, 2004). Ein anderes Beispiel sind bakterielle Kälteschockproteine, die von Pflanzen der Familie der *Solanaceae* wie Tabak und Kartoffel erkannt werden, jedoch nicht von Pflanzen außerhalb dieser Familie (Felix and Boller, 2003).

Schließlich können die Ergebnisse der vergleichenden Analyse PAMP-induzierbarer Gene in Petersilie und *Arabidopsis* folgendermaßen zusammengefasst werden:

(1) Pflanzen scheinen für bestimmte Mikroorganismen charakteristische PAMPs zu erkennen, reagieren allerdings nicht auf eine PAMP-spezifische Art und Weise. Das deutet daraufhin, dass PAMPs eine generische Reaktion auf „Nicht-Selbst“ repräsentierende Moleküle auslösen und die Konvergenz der Signalwege sehr zeitig erfolgt. Das heißt, dass die PAMPs zwar von verschiedenen

Rezeptoren erkannt werden, jedoch gleiche Signalwege benutzen, um die Expression von Abwehrgenen zu induzieren.

(2) Die Signalkaskaden, die nach PAMP-Erkennung ausgelöst werden, sind konserviert. Nach Bindung der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren werden die Signale zur Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in unterschiedlichen Pflanzen auf die gleiche Art und Weise weitergeleitet. Dies konnte hier in Petersilie und *Arabidopsis* für die PAMP-ausgelöste Immunität demonstriert werden. Interessanterweise scheint auch die effektorausgelöste Immunität sich der gleichen Signaltransduktionswege zu bedienen. Navarro *et al.* (2004) haben gezeigt, dass es zwischen den frühen transkriptionellen Änderungen, die in *Arabidopsis* durch die Interaktion von flg22/FLS2 und in Tabak durch die Interaktion von Avr9 und Cf-9 ausgelöst werden, eine beachtliche Übereinstimmung gibt. Für 13 von 17 vollständigen *ACRE* (*Avr9/Cf-9 rapidly elicited*) cDNAs aus Tabak war die Expression mindestens eines Stellvertreters ihrer Orthologe in flg22-induzierten *Arabidopsis*-Zellsuspensionen und -Keimlingen auch induziert (Navarro *et al.*, 2004).

Da in Petersilie und in *Arabidopsis* gezeigt werden konnte, dass durch PAMPs verschiedenen Ursprungs (Gram-negative Bakterien, Oomyceten) vergleichbare Veränderungen im pflanzlichen Transkriptom hervorgerufen werden, wäre es interessant zu erfahren, was geschieht, wenn PAMPs nacheinander appliziert werden. Reagiert die Pflanze oder die Zellen bei Zugabe eines zweiten Elicitors schneller oder stärker als nach Behandlung mit nur einem PAMP? Dieser Vorgang wird als *Priming* beschrieben (Conrath *et al.*, 2002; Prime-A-Plant-Group, 2006). Der physiologische Zustand, in dem Pflanzen besser und/oder schneller in der Lage sind, mit Abwehrreaktionen gegenüber biotischem oder abiotischem Stress zu reagieren, wird *primed state* (oder sensibilisierter Zustand) der Pflanze genannt. Die Gruppe von Sophien Kamoun hat z.B. gezeigt, dass die transiente Coexpression von PiNPP1.1, einem nekroseinduzierenden Protein der NLP-Familie aus dem Oomyceten *Phytophthora infestans*, und INF1-Elicitin (auch aus *Phytophthora infestans*), einem gut untersuchten und HR auslösenden Protein in *Nicotiana* spp, in einem erhöhten Zelltod in *Nicotiana benthamiana* resultierte (Kanneganti *et al.*, 2006). Dieses Ergebnis deutet an, dass zwischen den beiden Zelltodreaktionen ein synergistisches Zusammenspiel existiert, obwohl zwei separate Signalkaskaden bestehen (Kanneganti *et al.*, 2006). Es ist möglich, dass die Erkennung von PAMPs oder anderen Pathogenmolekülen wie INF1 oder PiNPP1.1 zu einer Sensibilisierung der Wirtszelle gegenüber anderen biotischen Stimuli (Kanneganti *et al.*, 2006) führt. Zipfel und Mitarbeiter beschreiben, dass die gleichzeitige Zugabe von flg22 und elf18 zu *Arabidopsis*-Zellen nur in nicht gesättigten Konzentrationen einen additiven Effekt bewirken, wenn die extrazelluläre Mediumalkalisierung verfolgt wird (Zipfel *et al.*, 2006). Arbeiten unserer Arbeitsgruppe in Petersilie-Zellsuspensionskulturen deuten dagegen an, dass die aufeinanderfolgende Zugabe von LPS und HrpZ<sub>PspH</sub> einen synergistischen Effekt auf die Phytoalexinproduktion ausübt (Engelhardt und Nürnberger, unveröffentlichte Daten). Weitere Analysen könnten Aufschluss darüber geben, ob sich die Effekte nur bei bestimmten PAMP-Kombinationen oder nur in bestimmten Pflanzenarten zeigen.

## 4.5 TRANSFORMATION VON PETERSILIEZELLEN MITTELS PARTIKELBESCHUSS

Die durch die cDNA-AFLP-Analyse ausgewählten Fragmente waren zwischen 80 und 400 bp lang, d.h. sie waren relativ kurz. Um vollständige DNA-Sequenzen zu erhalten, wurden RACE-Experimente durchgeführt. Dadurch war es möglich von elf ausgesuchten Kandidaten fünf vollständige cDNAs zu erhalten, von denen die dazugehörigen offenen Leserahmen abgeleitet werden konnten (siehe Kapitel 3.1.4).

Für eine funktionelle Charakterisierung sind verschiedene genetische und biochemische Ansätze möglich. Zu den biochemischen Methoden zählen Funktionsverlust- oder -gewinnstudien (*loss- or gain-of-function studies*) mit pharmakologischen Effektoren in Elicitor/Zellkultursystemen, und die Reinigung von Elementen der Signaltransduktionskaskaden. Beim genetischen Ansatz unterscheidet man zwischen vorwärts- und rückwärtsgerichteten Methoden. Bei einem vorwärtsgerichteten Ansatz werden z.B. mutagenisierte Pflanzenpopulationen genutzt, um Pflanzen zu finden, die in ihren Pathogenabwehrmechanismen beeinträchtigt sind. Im Anschluss werden die entsprechenden Gene identifiziert. In einem rückwärtsgerichteten genetischen Ansatz werden Gene gezielt ausgeschaltet. Außerdem gibt es molekulargenetische Methoden, wie z.B. das Split-Ubiquitin- oder Hefe-Dihybrid-system, mit denen Interaktionsstudien durchgeführt werden können (Day *et al.*, 2006; Ihara-Ohori *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2007).

In früheren Arbeiten war die Transformation von Petersiliezellen mittels Partikelbeschuss (Finer *et al.*, 1992) zur Untersuchung PAMP-induzierter Calciumströme (Blume *et al.*, 2000) und zur funktionellen Charakterisierung des *respiratory burst oxidase homolog2* (RBOH2) (Zinecker, 2001) bereits etabliert worden. Um die Rolle von  $\text{Ca}^{2+}$  bei der Aktivierung der pflanzlichen Abwehrmechanismen näher zu beschreiben, wurden Petersiliezellen mit einer DNA-Kassette, die Apoäquorin kodiert, stabil transformiert (Blume *et al.*, 2000). Mit der Expression des *Aequora aequorea* Apoäquorin-Gens im Zytoplasma von Pflanzenzellen können Änderungen in der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ ) genau quantifiziert werden (Knight *et al.*, 1991). Wurden diese stabil transformierten transgenen Zelllinien mit Pep13 behandelt, konnte ein biphasischer Verlauf der  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$  beobachtet werden (Blume *et al.*, 2000). Für neue Einblicke in die physiologische Funktion des RBOH2 wurden die Petersiliezellen mit *rboh2-sense*- und *antisense*-Konstrukten transformiert (Zinecker, 2001). Von 29 untersuchten transgenen *rboh2-sense* Kalli wurden vier putative überexprimierende Linien gefunden, deren erhöhte Transkriptmenge mit einer gesteigerten  $\text{O}_2^-$ -Produktion und vermehrten Phytoalexinbildung korrelierte (Zinecker, 2001). Außerdem wurden 42 *rboh2-antisense* transformierte Kalli auf unterdrückte Transkriptakkumulation untersucht. Eine vollständige Unterdrückung war in keiner Linie zu finden. Von neun untersuchten transgenen Zellsuspensionskulturen mit verringerter *RBOH2*-Expression wies keine auf eine signifikante Änderung ihrer Elicitorresponsivität hin (Zinecker, 2001).

Für die Charakterisierung in Petersilie wurden vier Fragmente ausgesucht, die aufgrund ihrer Homologie zu Proteinen aus *Arabidopsis* am ehesten in Signalwege nach PAMP-Behandlung involviert sein könnten. Die DNA-Sequenzen dieser Fragmente könnten drei Proteinkinasen (pc36 – putative LRR-RLK; pc258 – Proteinkinase OXI1; pc322 – Ser/Thr-Proteinkinase) und ein integrales Membranprotein (pc25) kodieren (siehe Kapitel 3.1.3.4). Mit Hilfe von *antisense*- und *sense*-

Konstrukten sollten für diese vier Fragmente transgene *loss-of-function*- und Überexpressionszelllinien durch Transformation mittels Partikelbeschuss hergestellt werden (Finer *et al.*, 1992). Die Transformation war jedoch nur mit der leeren Vektorkontrolle pCR2.1\_HPT erfolgreich (siehe Kapitel 3.1.5). Woran das gelegen haben könnte, ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass die Petersiliezellkulturen trotz vorhandener Elicitoraktivität für die Transformation nicht optimal gewachsen waren. Das könnte zur Folge haben, dass die gewählten Transformationsbedingungen nicht mehr optimal waren. Außerdem ist es auch denkbar, dass sich die Zellkultur durch jahrelange Kultivierung verändert hat und so für die Transformationen nicht mehr zugänglich war. Aufgrund des großen Zeitaufwandes zur Überprüfung aller veränderlichen Parameter, wurde auf eine Charakterisierung PAMP-induzierbarer Gene in *Arabidopsis thaliana* ausgewichen.

## 4.6 CHARAKTERISIERUNG PAMP-INDUZIERBARER GENE IN *ARABIDOPSIS THALIANA*

Da die funktionelle Charakterisierung ausgewählter PAMP-induzierbarer Gene in Petersilie nicht möglich war und im Zuge dieser Arbeit deutlich geworden ist, dass PAMPs eine generische Pflanzenantwort auslösen (Kapitel 3.2.2 und 4.3), wurden weitere Analysen in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* vorgenommen. Es sollten zwei Gene, die zum einen ein integrales Membranprotein und zum anderen eine leucinreiche rezeptorähnliche Kinase (LRR-RLK) kodieren, in Bezug auf ihre physiologische Funktion näher charakterisiert werden. Diese beiden Gene wurden ausgewählt, da sie auf der einen Seite eine starke Reaktion auf die Behandlung mit PAMPs sowohl in Petersilie als auch in *Arabidopsis* zeigten und im Fall von At2g02220 als rezeptorähnliche Kinase eine direkte Funktion bei der Erkennung oder Weiterleitung des Signals haben könnten (Gomez-Gomez and Boller, 2002; Llorente *et al.*, 2005; Zipfel *et al.*, 2006) (siehe auch Tabelle 3-6).

### 4.6.1 CHARAKTERISIERUNG DES INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS

Integrale Membranproteine werden im Allgemeinen in zwei Gruppen eingeteilt: solche, die Bündel von  $\alpha$ -Helices (oder  $\alpha$ -IMP) und solche, die  $\beta$ -barrels (oder  $\beta$ -IMP) enthalten (Bowie, 2005; Bracey *et al.*, 2004).  $\alpha$ -IMPs können die Doppelschicht der Membran ein- bis mehrfach durchqueren. Sie können als Mono- oder Oligomere vorliegen. Außerhalb der Lipiddoppelschicht können die hydrophilen Bereiche dieser Proteine eine enzymatische Aktivität aufweisen, als Anker für lösliche Proteine dienen, Reduktionsäquivalente des Elektronentransports weiterleiten oder Liganden für die Signaltransduktion binden (Bracey *et al.*, 2004). Aufgrunddessen besitzen  $\alpha$ -IMPs vielfältige Funktionen, die Photosysteme, Rezeptoren, Proteine der Atmungskette, Kanäle und Pumpen einschließen (Bracey *et al.*, 2004). Das IMP (At2g39530) soll drei Transmembrandomänen besitzen (TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), woraus wahrscheinlich ein Bündel von  $\alpha$ -Helices entsteht, deren N-Terminus sich im extrazellulären und deren C-Terminus sich im intrazellulären Bereich befindet. Datenbanksuchen ergaben kürzlich, dass das IMP ein nahes verwandtes Protein in *Arabidopsis* besitzt, das aber eine unbekannte Funktion hat (At2g39518, annotiert am 27.04.2007, TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Auf Nukleotidebene sind die Sequenzen zu 85 % identisch, auf Proteinebene zu 72 % (BLAST-Funktionen des NCBI, siehe auch Abbildung 7.2 in Anhang C). Vorhersagen des Expressionsverhaltens von At2g39518 anhand der *Microarray*-Analysen der *AtGenExpress*-Initiative sind nicht möglich, da

At2g39518 nicht auf dem ATH1-Chip enthalten ist. Der Vergleich des IMP mit Proteinen anderer Pflanzen zeigte Homologien zu einem hypothetischen Protein aus *Vitis vinifera* (44 % identisch, CAN64094.1, NCBI-Datenbank) und zu einem pathogeninduzierten Plasmamembranprotein (PIMP1) aus *Capsicum annuum* (40 % identisch, ABC79684.1, NCBI-Datenbank; siehe auch Abbildung 7.3 in Anhang C). Für beide Proteine stehen derzeit keine weiteren Angaben über ihre Funktion zur Verfügung.

### 4.6.1.1 ANALYSE DER *IMP*-EXPRESSION

*Microarray*-Analysen (Genevestigator-Datenbank; [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann *et al.*, 2004) und nachfolgende RT-PCR-Analysen zeigten, dass die Expression des *IMP* durch alle vier PAMPs – flg22, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>, LPS und NLP<sub>pp</sub> – stimuliert wird, wobei die Induktion nach 4 h immer am stärksten und durch flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> am höchsten ist (Abbildung 3.13). Ebenfalls erhöht wurde die Transkriptmenge des *IMP* durch Pathogenapplikation. Ganz besonders hoch fiel sie in den *Microarray*-Analysen nach 24 h durch Infektion mit dem Nichtwirtspathogen *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*P<sub>sph</sub>*) und der Typ III-Sekretionsmutanten *Pst* hrcC<sup>-</sup> (apathogen) aus. Bei der Applikation der anderen Bakterien – *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst* DC3000, virulent) und *Pst* avrRpm1 (avirulent) – fiel auf, dass bei den *Microarray*-Analysen die *IMP*-Expression zunächst nach 2 h induziert, nach 6 h jedoch reduziert und im Fall von *Pst* avrRpm1 nach 24 h wieder deutlich erhöht wurde, bei *Pst* DC3000 keine signifikante Änderung zu verzeichnen war (Abbildung 3.14). Das Ergebnis der RT-PCR-Analyse variierte ein wenig. Die Behandlung mit dem virulenten Stamm *Pst* DC3000 scheint nach 2 h und 6 h die Expression des *IMP* zu induzieren und danach zu reduzieren. Die Infiltration von allen anderen Bakterien scheint die *IMP*-Expression gleich bleibend verstärkt zu beeinflussen. Die Behandlung mit *Pst* DC3000 könnte ein gutes Beispiel für PTI und anschließende ETS sein. Das Pathogen *Pst* DC3000 wird durch die Pflanze erkannt und im Zuge der PTI wird die *IMP*-Expression verstärkt (Abbildung 3.13-B). Im Verlauf der Evolution hat *Pst* DC3000 aber Virulenzfaktoren ausgebildet, die PTI unterdrücken und eine effektorausgelöste Empfänglichkeit (ETS) verursachen (Abbildung 1.1). Das wird darin deutlich, dass die zunächst erhöhte Expression des *IMP* nach 24 h unterdrückt wird (Abbildung 3.13-B). Eine Unterdrückung von frühen Abwehrreaktionen wurde 2006 auch von He *et al.* demonstriert (He *et al.*, 2006). He und Mitarbeiter haben verschiedene *Pseudomonas*-Stämme in *Arabidopsis*-Blätter infiltriert und die Aktivierung von frühen Abwehrgenen (FRK1, At1g51890, At2g17740 und At5g57220) nach 2 h und 6 h untersucht. Sie haben festgestellt, dass die Expression dieser vier Gene durch alle eingesetzten *Pseudomonas*-Stämme (den Nichtwirtsstamm *Psp* NPS3121, den virulenten Stamm *Pst* DC3000 und die Typ III-Sekretionsmutante *Pst* hrcC<sup>-</sup>) nach 2 h eindeutig erhöht wurde (He *et al.*, 2006). Die Transkriptmenge dieser vier Gene wurde nach 6 h durch den virulenten Stamm *Pst* DC3000 jedoch drastisch reduziert, wobei die anderen Bakterienstämme die Aktivierung beibehielten oder noch verstärkten (He *et al.*, 2006). Durch einen zellbasierten genetischen Screen identifizierten He *et al.* (2006) AvrPto und AvrPtoB als spezifische Unterdrücker der frühen PAMP-Signaltransduktionsreaktionen. Es wäre interessant herauszufinden, ob diese beiden Effektoren auch für die Unterdrückung der *IMP*-Expression verantwortlich sind.

In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe wurde anhand der in der Genevestigator-Datenbank gefundenen *Microarray*-Daten ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann *et al.*, 2004)

zeigt, dass das *IMP* hauptsächlich in den Wurzeln exprimiert wird (Cabrillac, 2005). Eine Analyse der Domäne unbekannter Funktion (DUF588), die das *IMP* ebenfalls besitzt (InterPro- und Pfam-Datenbank), wies unter anderem eine geringe Homologie zum MtN24 Protein aus *Medicago truncatula* auf. *MtN24* wird nur während der *Rhizobium meliloti* induzierten Knötchenentstehung an Wurzeln exprimiert (Gamas *et al.*, 1996). Es kann also sein, dass diese Domäne eine Rolle in der Interaktion zwischen Pflanzen und verschiedenen Mikroorganismen spielt.

Laure Cabriallac wertete ferner den Einfluss von abiotischem Stress (Kälte-, Trocken-, Salz- oder osmotischer Stress) auf das Expressionsverhalten des *IMP* aus (Cabrillac, 2005). Dazu standen Arraydaten der Genevestigator-Datenbank ([www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann *et al.*, 2004) in Wurzel- und Blattgewebe zur Verfügung. Interessanterweise wird die Expression des *IMP* in Wurzeln durch Kälte und Trockenheit wenig beeinflusst und durch osmotischen und Salzstress eher unterdrückt. Dagegen variiert die Expression in den Blättern gravierend. Sie scheint zyklisch zu verlaufen: eine Erhöhung der Transkriptmenge nach 30 min, nach 3 h ein Abfall bis zur Repression, gefolgt von einer Induktion nach 6 oder 12 h und schließlich einer erneuten Reduktion nach 24 h.

#### 4.6.1.2 PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG EINER *IMP*-DEFIZIENTEN *ARABIDOPSIS*-LINIE

Für eine funktionelle Charakterisierung des *IMP* wurden Pflanzen mit einer T-DNA-Insertion im 2. Exon des *IMP* mit Wildtyppflanzen (WT) verglichen. Mit Hilfe von Genotypisierungen konnte gezeigt werden, dass die Insertion tatsächlich vorhanden ist. Außerdem wird nach Behandlung der Pflanzen mit Elicitoren in *impl-1* im Gegensatz zum WT kein Transkript mehr gebildet. Nachdem auf diese Weise abgesichert wurde, dass das Gen tatsächlich defekt ist, wurden verschiedene Untersuchungen für eine phänotypische Beschreibung der *impl-1*-Mutante vorgenommen. Dabei ist zu bedenken, dass die Aufgaben des *IMP* auch von dem homologen Protein unbekannter Funktion (At2g39518) übernommen werden könnten, so dass ein Phänotyp nicht erkennbar wäre.

Für verschiedene Proteine (*ERECTA*, Godiard *et al.*, 2003; *BRI1*, Zhou *et al.*, 2004; *HASEA*, Jinn *et al.*, 2000) konnten in *ko*-Pflanzen Wachstums- und Entwicklungsänderungen wahrgenommen werden. Für die Funktionsverlustmutante *impl-1* des *IMP* gibt es jedoch bezüglich des WTs keine makroskopisch sichtbaren Änderungen des Gesamtbilds und der Entwicklung. Deshalb wären in Zukunft auch eine mikroskopische Betrachtung der Anatomie der Pflanze und/oder die Untersuchung des Einflusses entwicklungssteuernder Hormone nötig.

*Microarray*-Analysen, die im Rahmen von *AtGenExpress* durchgeführt wurden, wiesen eine erhöhte Transkriptakkumulation des *IMP* in den Wurzeln auf. Es ist daher denkbar, dass ein Ausbleiben der Expression einen starken Effekt auf das Verhalten der *IMP*-defizienten Pflanzen unter physiologischen Stressbedingungen haben könnte. Das Wurzelwachstum von *impl-1*- und WT-Pflanzen wurde deshalb unter Zugabe einiger abiotischer Stressoren zum Medium analysiert (Kapitel 3.3.1.3.3). Die stimulusabhängige Expression des *IMP* scheint jedoch für die allgemeine Wurzelentwicklung nicht von essenzieller Bedeutung zu sein, da erstens ein Gendefekt keinen Einfluss auf ihr Aussehen und ihr Wachstum unter Kontrollbedingungen hat und zweitens die abiotischen Stressoren (Salz, Mannitol und Methyljasmonat) in *impl-1*-Keimlingen keine veränderte Wirkung auf das Wachstum oder die Vitalität im Vergleich zum WT zeigen. Dies deutet entweder daraufhin, dass das *IMP* zwar induziert wird, aber nicht an pflanzlichen Prozessen, die bei abiotischem Stress ausgelöst

werden, beteiligt ist oder seine Funktion von anderen Proteinen (wie z.B. von At2g39518) übernommen werden kann.

Die verstärkte Transkriptakkumulation des *IMP* nach PAMP- oder Pathogenbehandlung könnte darauf hinweisen, dass das kodierte Protein in die Signalerkennung oder -weiterleitung und somit in die Pathogenabwehr involviert ist. Aufgrund der erhöhten Expression des *IMP* nach Behandlung mit nichtpathogenen Bakterien (der apathogenen Typ III-Sekretionsmutanten *Pst hrcC* und dem Nichtwirtsstamm *Psph*) in den *Microarray*-Analysen wurden *impl-1*- und WT-Pflanzen mit diesen beiden Bakterienstämmen inokuliert. Das Wachstum der Bakterien in den Blättern zeigte jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 3.17) in der WT- und der *impl-1*-Linie. Es ist zu überprüfen, ob die Inokulation von virulenten *Pst* DC3000 in *impl-1*-Pflanzen zur Ausprägung eines vom WT verschiedenen Phänotyps führt. Wenn das IMP als positiver Regulator in der Pathogenabwehr eine Rolle spielt, sollten die Bakterien sich in *IMP*-defizienten Linien besser vermehren können. Sollte es ein negativer Regulator sein, würde die Vermehrung der virulenten *Pst* DC3000 in der *impl-1*-Linie eingeschränkt werden, sie würde resistenter sein. Es ist auch zu überlegen, welche Methode der Inokulation der Bakterien genutzt wird, da festgestellt wurde, dass Infiltrieren und Besprühen der Blätter von *Arabidopsis* mit Bakterien einen unterschiedlichen Effekt auf die Infektion hatte (Zipfel *et al.*, 2004). Bakterien des Stammes *Pst* DC3000, die direkt in den Interzellularraum der Blätter infiltriert wurden, wuchsen in *fls2-17*-Pflanzen mit der gleichen Geschwindigkeit wie in WT-Pflanzen und verursachten die gleichen sichtbaren Krankheitssymptome innerhalb der ersten Woche nach Infektion (Zipfel *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wiesen *fls2-17*-Pflanzen eine schnellere und intensivere Entwicklung von Krankheitssymptomen auf, wenn die Pflanzen mit *Pst* DC3000 Bakterien besprüht wurden (Zipfel *et al.*, 2004).

Wie in Kapitel 3.3.1.3.2 angesprochen, ist die Überprüfung von Markergenen, die für bestimmte Signalwege charakteristisch sind, eine weitere Möglichkeit, die Reaktion einer *IMP*-defizienten Pflanze auf Pathogenstress zu untersuchen. In dieser Arbeit wurden *PRI* als klassisches Markergen für die Abwehr in Pflanzen (Fellbrich *et al.*, 2002; Zipfel *et al.*, 2004), *MPK3* als typische MAP-Kinase in Abwehrreaktionen (Asai *et al.*, 2002; Navarro *et al.*, 2004) und *MAPKKK15* als MAP-Kinase-Kinase-Kinase, die zur MEKK-Unterfamilie gehört (TAIR, [www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), näher betrachtet. Allerdings konnten bei keinem der angeführten Gene signifikante Expressionsunterschiede zwischen *impl-1*- und WT-Pflanzen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.1.3.2). Zum Teil lag es an der relativ hohen Verwundungsreaktion, was in der MgCl<sub>2</sub>-Kontrolle sichtbar ist. D.h. aber nicht, dass das IMP nicht in die Abwehr von Pathogenen involviert sein könnte. Es wäre auch möglich, dass die Funktion des IMP von einem anderen Protein (wie At2g39518) übernommen wird und somit sein Fehlen keinen bedeutenden Einfluss hätte. Damit das ausgeschlossen werden kann, müssten Doppelmutanten dieser beiden Gene (At2g39530 und At2g3918) hergestellt und analysiert werden. Um zu überprüfen, welche Rolle das IMP bei der Pathogenabwehr übernimmt, könnten auch *Microarray*-Analysen mit RNA aus WT- und *impl-1*-Pflanzen, die mit verschiedenen Elicitoren infiltriert wurden, durchgeführt werden.

## 4.6.2 CHARAKTERISIERUNG DES PHYTOSULFOKINREZEPTORS

Um potentielle Pathogene zu erkennen und entsprechende Abwehrreaktionen auszulösen, besitzen Pflanzen eine Reihe an zytosolischen und membranständigen Rezeptoren. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* kodiert unter anderem eine Familie von membranständigen Rezeptoren, zu denen ca. 600 rezeptorähnliche Kinasen (RLKs) gehören und deren größte Unterfamilie (ca. 235) LRR-Rezeptorkinasen (LRR-RLK) bilden (Morillo and Tax, 2006). Obwohl die Funktion der meisten LRR-RLKs noch nicht bekannt ist, zeichnet sich ab, dass sie in eine Vielzahl von Vorgängen in der Pflanze involviert sind. So ist nachgewiesen, dass sie eine Rolle in der Brassinosteroiderkennung, wie z.B. BRI1, BRL1-3 oder BAK1 (Cano-Delgado *et al.*, 2004; Li and Chory, 1997; Li *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2004), in der Meristemdifferenzierung (CLAVATA) (Clark *et al.*, 1997) in der Pflanzenabwehr/Pathogenerkennung [FLS2 (Gomez-Gomez and Boller, 2000) und EFR (Zipfel *et al.*, 2006)], in der bakteriellen Erkennung durch Xa21 (Song *et al.*, 1995) und in vielen weiteren Prozessen spielen (Dievart and Clark, 2003). Für die LRR-RLK ERECTA konnte außerdem eine duale Rolle aufgezeigt werden: Sie beeinflusst Entwicklungsvorgänge wie die Blütenbildung (Lease *et al.*, 2001; Torii *et al.*, 1996) und ist außerdem an der pflanzlichen Immunität gegenüber bakteriellen und pilzlichen Infektionen beteiligt (Godiard *et al.*, 2003; Llorente *et al.*, 2005).

In unserer Gruppe wurden umfangreiche *Microarray*-Analysen mit Fokus auf Pathogen/PAMP-induzierte LRR-RLKs durchgeführt (siehe auch *AtGenExpress*-Initiative). Von den 235 LRR-RLKs werden 49 durch Pathogene und/oder PAMPs induziert (Kemmerling *et al.*, 2007). Eine dieser induzierten LRR-RLKs ist BAK1, die nicht nur als Corezeptor von BRI1 im Brassinosteroid-Signalweg agiert, sondern auch in die Eindämmung von mikrobiell induziertem Zelltod involviert ist (Kemmerling *et al.*, 2007) und eventuell als Interaktor von FLS2 fungiert (Chinchilla *et al.*, 2007). Eine weitere von diesen induzierten LRR-RLKs ist der Phytosulfokinrezeptor AtPSKR1.

### 4.6.2.1 ALLGEMEINE INFORMATION ZUM PHYTOSULFOKINREZEPTOR

Matsubayashi und Mitarbeiter haben gezeigt, dass die Phytosulfokinerkennung in Karotte durch eine LRR-RLK, den Phytosulfokinrezeptor DcPSKR1 vermittelt wird (Matsubayashi *et al.*, 2002). Phytosulfokine werden in PSK- $\alpha$  und PSK- $\beta$  unterschieden, wobei PSK- $\alpha$  das primäre Signalmolekül ist, das für die Zell-Zell-Kommunikation verantwortlich ist und an verschiedenen Differenzierungs- und Entwicklungsreaktionen in der Zelle beteiligt ist (siehe Kapitel 3.3.2.1). Im vergangenen Jahr konnte dieselbe Gruppe zeigen, dass At2g02220 (AtPSKR1) mit großer Wahrscheinlichkeit ein Ortholog von *DcPSKR1* ist (Matsubayashi *et al.*, 2006). AtPSKR1 besteht, wie alle LRR-RLKs, aus einer extrazellulären Domäne mit leucinreichen Wiederholungen und einer intrazellulären Kinasedomäne, die über eine Transmembrandomäne miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 3.20 und Abbildung 7.5). Zwischen der 17. und 18. LRR befindet sich eine 36-AS-große Inseldomäne, wie sie auch für den Brassinosteroidrezeptor BRI1 beschrieben wurde und die mit der direkt angrenzenden LRR essenziell für die Ligandenbindung ist (Kinoshita *et al.*, 2005). Typisch für extrazelluläre Domänen pflanzlicher LRR-Rezeptoren sind Cysteine, die oft gepaart vorliegen. Zwei dieser Paare flankieren die LRRs, so auch in AtPSKR1 (siehe Abbildung 7.5). Welche Funktion sie hier haben, ist aber noch unklar. Im Fall von CLAVATA 1 sind sie für eine Homodimerbildung verantwortlich (Trotochaud *et al.*, 1999).

Durch eine BLASTP-Analyse (Altschul *et al.*, 1997) wurden drei Proteine gefunden, die auf Proteinebene zu 58 % (At5g42440), zu 47 % (At5g53890) und zu 42 % (At1g72300) mit AtPSKR1 identisch sind. Laut *TAIR* ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) ist At5g42440 Teil einer Proteinkinasefamilie, die Ähnlichkeit mit AtPSKR1 aufweist. At5g53890 und At1g72300 sind beides LRR-RLKs der LRR-Xb-Unterfamilie, die AtPSKR1 und OsPSKR1 sowie einander ähneln ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). Keine dieser Kinasen scheint jedoch signifikant auf PAMP-Stress zu reagieren (Datenbankvergleich mit dem Programm Genevestigator [www.genevestigator.ethz.ch](http://www.genevestigator.ethz.ch); Zimmermann *et al.*, 2004 und Zipfel *et al.*, 2006).

#### 4.6.2.2 ANALYSE DER *AtPSKR1*-EXPRESSION

Wie schon bei der Analyse des IMP beschrieben, war eine der Zielstellungen die Charakterisierung der Funktion des AtPSKR1 in der PAMP-Erkennung und Pathogenabwehr. Bei der *Microarray*-Analyse der *AtGenExpress*-Daten wurde deswegen besonderes Augenmerk auf die Behandlung mit PAMPs und Pathogenen gelegt. Es hat sich gezeigt, dass die Transkriptmenge von *AtPSKR1* durch bakterielle PAMPs wie flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> nach 1 h leicht (ca. 3,5 - 4-fach), nach 4 h deutlich erhöht (ca. 8 – 11-fach) vorliegt. Eine geringfügig erhöhte Expression (ca. 3-fach) ist auch nach Infiltration mit NLP<sub>pp</sub> zu erkennen. Auf die Behandlung mit LPS reagiert *AtPSKR1* jedoch nach 1 und 4 h nicht. Eine RT-PCR-Analyse wurde nur für flg22 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> durchgeführt und weist dort eine erhöhte Transkriptmenge nach 1 und 4 h auf (siehe Kapitel 3.3.2.1).

Die *Microarray*-Analyse nach Pathogenbehandlung ergab eine geringe Erhöhung der Transkriptmenge durch Inokulation mit dem Nichtwirtsbakterium *P<sub>sph</sub>* und mit der apathogenen Typ III-Sekretionsmutante *P<sub>st</sub> hrcC* nach 6 und 24 h. RT-PCR-Analysen zeigten jedoch, dass alle vier getesteten Bakteriensuspensionen, also auch die des virulenten Stamms *P<sub>st</sub> DC3000* und des avirulenten Stamms *P<sub>st</sub> avrRpm1*, eine Expressionssteigerung des *AtPSKR1* zu allen untersuchten Zeitpunkten (2, 6 und 24 h) zur Folge hatten. Dieses Ergebnis deutet daraufhin, dass AtPSKR1 eine Rolle in der Pathogenabwehr spielen könnte.

#### 4.6.2.3 CHARAKTERISIERUNG DER *AtPSKR1* MUTATIONSLINIEN

Um die Auswirkungen eines Gendefekts im *AtPSKR1*-Gen bezüglich des Wachstums, der Abwehr von Pathogenen oder während der Behandlung mit abiotischem Stress zu erforschen, waren vier T-DNA-Insertionslinien verfügbar (Alonso *et al.*, 2003; Samson *et al.*, 2002). Für drei der vier Linien konnte das Vorhandensein der T-DNA-Insertionen im *AtPSKR1*-Gen mit Hilfe von PCRs nachgewiesen werden. Eine Insertion befindet sich im LRR-Bereich (*pskr1-4*), eine in der Kinasedomäne (*pskr1-3*) und eine in der Promotorregion (*pskr1-2*; siehe Kapitel 3.3.2.3).

Untersuchungen auf Transkriptebene deuten darauf hin, dass *pskr1-3* und *pskr1-4* keinen vollständigen Rezeptor mehr kodieren (siehe Kapitel 3.3.2.4) und dass das Protein in seiner Funktion folglich eingeschränkt sein wird. Liegen T-DNA-Insertionen im Promotorbereich, sind alle möglichen Varianten einer Deregulation denkbar. Es kann zu einer verstärkten Expression, zu einem völligen Ausfall, zu einer veränderten Stressresponsivität oder zu einer veränderten Organspezifität der Expression kommen. Analysen der *pskr1-2*-Linie, deren Insertion in der Promotorregion liegt, zeigten keine Expressionsinaktivierung oder Überexprimierung des *AtPSKR1*, da mit allen getesteten Primerkom-

binationen WT-gleiche PCR-Produkte gebildet wurden. Es kann aber trotzdem möglich sein, dass *pskr1-2* anders reagiert als der WT.

#### 4.6.2.4 DIE PHÄNOTYPISCHE BESCHREIBUNG *AtPSKRI*-DEFIZIENTER/VERRINGERTER LINIEN

##### 4.6.2.4.1 Entwicklungsphänotypen

Wie schon erwähnt sind einige Mitglieder der RLK-Familie in Entwicklungsprozesse involviert. CLAVATA 1 reguliert z.B. die Zelldifferenzierung im Apikalmeristem und im Meristem der Blüten (Clark *et al.*, 1997; Stone *et al.*, 1998) oder HAESA ist an der Regulation von Abszissionsprozessen beteiligt (Jinn *et al.*, 2000). Ein Fehlen dieser Gene äußert sich in einem veränderten Phänotyp der Pflanzen (Clark *et al.*, 1997; Jinn *et al.*, 2000; Stone *et al.*, 1998). Die T-DNA-Insertionslinien des *AtPSKRI* wurden deshalb zunächst auf einen makroskopisch veränderten Phänotyp hin untersucht. Matsubayashi *et al.* (2006) haben WT-Pflanzen (*Ler*) mit der *ko*-Linie *pskr1-1* (Insertion liegt im LRR-Bereich; *Ler*) und ihrer überexprimierenden Linie *AtPSKRIox* in ihrem Wachstum und Aussehen unter Dauerlicht verglichen. Während der ersten drei Wochen waren die Keimlinge und kleinen Pflänzchen in ihrem Wachstum und ihrer Entwicklung nicht voneinander zu unterscheiden. Die *pskr1-1*-Pflanzen zeigten aber nach vier Wochen verfrühte Alterungserscheinungen, und alle Blätter waren 6 Wochen nach der Keimung abgestorben. Die überexprimierenden Pflanzen entwickelten dagegen größere Blätter als der WT und wiesen eine verspätete Alterung auf (Matsubayashi *et al.*, 2006).

Die in dieser Arbeit betrachteten *loss-of-function*-Mutanten unterschieden sich in ihrem Wachstumsverhalten. *pskr1-3*-Pflanzen wuchsen vorerst unter Kurztagbedingungen langsamer als der WT, *pskr1-2* und *pskr1-4* dagegen ähnlich wie der WT. Das geringere Wachstum war jedoch nicht auf eine schlechtere Keimungsrate zurückzuführen. Da Matsubayashi *et al.* (2006) mit Dauerlichtbedingungen arbeiteten, wurden die hier verwendeten T-DNA-Insertionslinien zum Vergleich unter verschiedenen Lichtverhältnissen (Kurz-/Langtag und Dauerlicht) angezogen (Matsubayashi *et al.*, 2006). Die *pskr1-3*-Pflanzen zeigten unter den verschiedenen Lichteinflüssen immer ein langsames Wachstum. Die von Matsubayashi *et al.* (2006) beobachteten Alterungserscheinungen waren jedoch nur unter Dauerlichtbedingungen und hauptsächlich für *pskr1-3* (Insertion in der Kinasedomäne) sichtbar. Hier waren nach etwa vier Wochen erste Anzeichen von Alterung zu erkennen, die jedoch nicht so gravierend wie bei Matsubayashi und Mitarbeitern ausfielen. Das könnte an dem verwendeten Ökotyp liegen: Matsubayashi *et al.* (2006) arbeiteten im *Ler*-Hintergrund, *pskr1-3* ist im Col-0-Hintergrund. Da weder in *pskr1-1* noch in *pskr1-3* *PSKRI*-Transkripte vorhanden waren [siehe Abbildung 3.23 und (Matsubayashi *et al.*, 2006)], ist es möglich, dass die frühe Seneszenz auf das Fehlen des Phytosulfokinrezeptors zurückzuführen ist. Die kleinere Wuchsform kann jedoch auch von einer weiteren Insertion in der hier charakterisierten T-DNA-Insertionslinie stammen.

*pskr1-4*, deren Insertion im LRR-Bereich liegt und im *Ws-0*-Hintergrund eingeführt wurde, zeigte im Vergleich von *ko* zu WT keine verfrühte Seneszenz. Das scheint den Beobachtungen von Matsubayashi und Mitarbeitern insofern zu widersprechen, da die Insertion von *pskr1-1* ebenfalls im LRR-Bereich liegt (Matsubayashi *et al.*, 2006). Während sich die *pskr1-1*-Insertion in der Region der 15. LRR befindet, ist sie in *pskr1-4* in der dritten LRR. LRR-Motive spielen in der Ligandenbindung

und -erkennung eine wichtige Rolle (Di Matteo *et al.*, 2003; Gomez-Gomez *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2005; Kobe and Kajava, 2001). Für die Phytosulfokinbindung in Karotte sind die ersten 15 AS der Inseleldomäne des Rezeptors DcPSKR1 notwendig (Shinohara *et al.*, 2007). Dieser Bereich ist auch im *Arabidopsis*-PSK-Rezeptor AtPSK1 sehr konserviert. Das lässt die Annahme zu, dass diese Region ebenfalls die Ligandenbindungsstelle ist. Für *pskr1-4* konnte in diesem Bereich noch ein Resttranskript nachgewiesen werden (Abbildung 3.23, Primer 1). Es ist also möglich, dass der geringe Anteil an AtPSKR1 ausreichend ist, um die verfrühten Alterungserscheinungen zu verhindern. Außerdem stimmen, wie schon erwähnt, die *Arabidopsis*-Ökotypen nicht überein: *Ler* (*pskr1-1*) gegenüber *Ws* (*pskr1-4*).

Das langsamere Wachstum der *pskr1-3*-Linie war auch in Wurzellängenuntersuchungen auf den ½ MS-Kontrollplatten zu sehen (siehe Kapitel 3.3.2.5.2). Allerdings war dieses verringerte Wachstum nicht mehr vorhanden, wenn die Pflänzchen auf ½ MS-Platten mit 100 mM NaCl wuchsen. Das Wurzellängenwachstum der untersuchten Linien unterschied sich nicht signifikant. Das würde bedeuten, dass der Zusatz von Salz das langsamere Wachsen der *pskr1-3* aufheben würde.

#### 4.6.2.4.2 Pathogenphänotypen

Wie auch für das integrale Membranprotein wurde die Reaktion der T-DNA-Insertionslinien des AtPSKR1 auf phytopathogene Bakterien getestet. Erste Versuche deuten daraufhin, dass das Wachstum von virulenten *Pst* DC3000 nach Applikation in die Blätter der *pskr1-3*- und *pskr1-4*-Pflanzen verringert ist (siehe Abbildung 3.25, Patricia Rodriguez). Das würde bedeuten, dass AtPSKR1 als negativer Regulator in der Pathogenabwehr fungieren würde. Wird *Pst* DC3000 in Anwesenheit von AtPSKR1 im Wildtyp erkannt, wird die Aktivierung einer Reihe von Abwehrmechanismen verhindert. *Pst* DC3000 kann sich also uneingeschränkt vermehren und die Pflanze schädigen. In den Mutationslinien wird dagegen die Auslösung von Abwehrreaktionen nicht unterbunden, was sich in einer erhöhten Resistenz gegenüber *Pst* DC3000 manifestiert. Diese Hypothese wurde in einem vorläufigen Experiment durch die Transkription von *DRK4d*, einer abwehrbezogenen Kinase, bestätigt. *DRK4d* wurde im Gegensatz zum WT in *pskr1-3* nach Infiltration der Blätter mit *Pst* DC3000 exprimiert (Daten nicht gezeigt).

Da es sich bei AtPSKR1 um einen potentiellen Phytosulfokinrezeptor handelt, wäre es auch interessant herauszufinden, was passieren würde, wenn Pflanzen zunächst mit Phytosulfokinen behandelt und anschließend auf Bakterienwachstum getestet würden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Ein tieferes Verständnis von Signalvorgängen bei Reaktionen der angeborenen Immunität in Pflanzen erfordert die Identifizierung neuer Komponenten der entsprechenden Signalwege. Da für einige Signalkomponenten wie die PAMP-Rezeptoren FLS2 und EFR gezeigt werden konnte, dass sie durch die Einwirkung von PAMPs transkriptionell aktiviert werden, wurden intensive Expressionsanalysen durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war es, durch PAMP-Behandlung differenziell exprimierte Gene mit Signaltransduktionseigenschaften in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, sie gegenüber zu stellen und miteinander zu vergleichen, um anschließend eine molekulare und funktionelle Charakterisierung ausgewählter Kandidaten im Modellsystem *Arabidopsis thaliana* vorzunehmen.

Die Ergebnisse der vergleichenden Analyse PAMP-induzierbarer Gene in Petersilie und *Arabidopsis* ließen erkennen, dass Pflanzen für bestimmte Mikroorganismen charakteristische PAMPs zu erkennen scheinen, allerdings nicht auf eine PAMP-spezifische Art und Weise reagieren. Das deutet daraufhin, dass PAMPs eine generische Reaktion auf „Nicht-Selbst“ repräsentierende Moleküle auslösen und die Konvergenz der Signalwege sehr zeitig nach Ligandenerkennung erfolgt. Überdies sind die Signalkaskaden, die nach PAMP-Erkennung ausgelöst werden, konserviert. Nach Bindung der Liganden an die entsprechenden Rezeptoren werden die Signale zur Aktivierung verschiedener Abwehrmechanismen in unterschiedlichen Pflanzen auf die gleiche Art und Weise weitergeleitet.

Für die molekulare und funktionelle Beschreibung in *Arabidopsis thaliana* wurden zwei Gene ausgewählt (At2g39530 und At2g02220), deren Expression eine starke Reaktion auf die Behandlung mit PAMPs sowohl in Petersilie als auch in *Arabidopsis* zeigten und die im Fall von At2g02220 als rezeptorähnliche Kinase eine direkte Funktion bei der Erkennung oder Weiterleitung des Signals haben könnten (Gomez-Gomez and Boller, 2002; Zipfel *et al.*, 2006).

Die Expression des integralen Membranproteins IMP (At2g39530) wird durch die Behandlung von PAMPs oder Pathogenen stark induziert. Eine untersuchte T-DNA-Insertionslinie *imp1-1* wies jedoch keine phänotypisch sichtbaren Veränderungen bezüglich ihrer Entwicklung und gegenüber einer PAMP- oder Pathogenbehandlung auf. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass der nichtvorhandene Phänotyp von einem kürzlich annotierten unbekanntem Protein (At2g39518) ausgeglichen und seine Funktion von ihm übernommen wird. Damit das ausgeschlossen werden kann, müssten in Zukunft Doppelmutanten dieser beiden Gene (At2g39530 und At2g39518) hergestellt und analysiert werden.

Der Phytosulfokinrezeptor AtPSKR1 (At2g02220) ist eine der 49 durch Pathogene und/oder PAMPs induzierten LRR-RLKs des Transkriptoms von *Arabidopsis thaliana*. Er scheint wie auch die beiden gut charakterisierten LRR-RLKs ERECTA und BAK1 eine duale Funktion zu haben. AtPSKR1 erkennt einerseits Phytosulfokine, die an verschiedenen Differenzierungs- und Entwicklungsreaktionen in der Zelle beteiligt sind, könnte andererseits aber auch als negativer Regulator in der Abwehr von virulenten *Pst* DC3000 eine Rolle spielen. Die Expression des *AtPSKR1* wird wie auch die des *IMP* stark durch PAMPs oder Pathogene induziert. Von den drei untersuchten T-DNA-

Insertionslinien (*pskr1-2*, *pskr1-3* und *pskr1-4*) scheint nur *pskr1-3* eine vom WT differenzierte Entwicklung aufzuweisen. *pskr1-3*-Pflanzen wachsen langsamer als der WT und zeigen eine verfrühte Seneszenz. Erste Versuche deuten daraufhin, dass *pskr1-3* außerdem resistenter als der WT gegenüber *Pst* DC3000-Behandlung ist.

## 6 LITERATUR

- Abramovitch, R.B., Anderson, J.C. and Martin, G.B.** (2006) Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **7**, 601-611.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J.** (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**, 782-787.
- Agrios, G.N.** (1997) *Plant Pathology*. San Diego: Academic Press.
- Alexander, C. and Rietschel, E.T.** (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res*, **7**, 167-202.
- Alfano, J.R. and Collmer, A.** (2004) Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 385-414.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C.C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D.E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W.L., Berry, C.C. and Ecker, J.R.** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, **301**, 653-657.
- Altschul, S.F. and Lipman, D.J.** (1990) Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 5509-5513.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.
- Anthony, R.G., Khan, S., Costa, J., Pais, M.S. and Bogre, L.** (2006) The *Arabidopsis* protein kinase PTI1-2 is activated by convergent phosphatidic acid and oxidative stress signaling pathways downstream of PDK1 and OX11. *J Biol Chem*, **281**, 37536-37546.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J.** (2002) MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature*, **415**, 977-983.
- Augusto, L.A., Decottignies, P., Synguelakis, M., Nicaise, M., Le Marechal, P. and Chaby, R.** (2003) Histones: a novel class of lipopolysaccharide-binding molecules. *Biochemistry*, **42**, 3929-3938.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D. and Parker, J.E.** (2002) Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science*, **295**, 2077-2080.
- Ausubel, F.M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, **6**, 973-979.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Parker, J. and Shirasu, K.** (2006) Role of SGT1 in resistance protein accumulation in plant immunity. *Embo J*, **25**, 2007-2016.
- Bachem, C.W., van der Hoeven, R.S., de Bruijn, S.M., Vreugdenhil, D., Zabeau, M. and Visser, R.G.** (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, **9**, 745-753.
- Badel, J.L., Charkowski, A.O., Deng, W.L. and Collmer, A.** (2002) A gene in the *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Hrp pathogenicity island conserved effector locus, hopPtoA1, contributes to efficient formation of bacterial colonies in planta and is duplicated elsewhere in the genome. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 1014-1024.
- 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., Bae, H., Strem, M.D., Antunez de Mayolo, G., Gultinan, M.J., Verica, J.A., Maximova, S.N. and Bowers, J.H.** (2005) Developmental expression of stress response genes in *Theobroma cacao* leaves and their response to Nep1 treatment and a compatible infection by *Phytophthora megakarya*. *Plant Physiol Biochem*, **43**, 611-622.

- Baldwin, D., Crane, V. and Rice, D.** (1999) A comparison of gel-based, nylon filter and microarray techniques to detect differential RNA expression in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 96-103.
- Basse, C.W., Fath, A. and 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.
- Batz, O., Logemann, E., Reinold, S. and Hahlbrock, K.** (1998) Extensive reprogramming of primary and secondary metabolism by fungal elicitor or infection in parsley cells. *Biol Chem*, **379**, 1127-1135.
- Baureithel, K., Felix, G. and Boller, T.** (1994) Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitoooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem*, **269**, 17931-17938.
- Ben-Neriah, Y.** (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*, **3**, 20-26.
- Birnboim, H.C. and Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bisgrove, S.R., Simonich, M.T., Smith, N.M., Sattler, A. and Innes, R.W.** (1994) A disease resistance gene in *Arabidopsis* with specificity for two different pathogen avirulence genes. *Plant Cell*, **6**, 927-933.
- Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N. and Scheel, D.** (2000) Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell*, **12**, 1425-1440.
- Bogdanove, A.J., Beer, S.V., Bonas, U., Boucher, C.A., Collmer, A., Coplin, D.L., Cornelis, G.R., Huang, H.-C., Hutcheson, S.W., Panopoulos, N.J. and Van Gijsegem, F.** (1996) Unified nomenclature for broadly conserved hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Mol Microbiol*, **20**, 681-683.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 189-214.
- Bonas, U. and Lahaye, T.** (2002) Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Curr Opin Microbiol*, **5**, 44-50.
- Bowie, J.U.** (2005) Solving the membrane protein folding problem. *Nature*, **438**, 581-589.
- Bracey, M.H., Cravatt, B.F. and Stevens, R.C.** (2004) Structural commonalities among integral membrane enzymes. *FEBS Lett*, **567**, 159-165.
- Bretz, J.R., Mock, N.M., Charity, J.C., Zeyad, S., Baker, C.J. and Hutcheson, S.W.** (2003) A translocated protein tyrosine phosphatase of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 modulates plant defence response to infection. *Mol Microbiol*, **49**, 389-400.
- Breyne, P., Dreesen, R., Cannoot, B., Rombaut, D., Vandepoele, K., Rombauts, S., Vanderhaeghen, R., Inze, D. and Zabeau, M.** (2003) Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Genet Genomics*, **269**, 173-179.
- Brown, K.** (2001) Florida Fights to Stop Citrus Canker. *Science*, **292**, 2275-2276.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D. and Nürnberger, T.** (2002) Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J*, **21**, 6681-6688.
- Büttner, D. and Bonas, U.** (2002) Getting across--bacterial type III effector proteins on their way to the plant cell. *Embo J*, **21**, 5313-5322.
- Cabrillac, L.** (2005) Identifizierung und Charakterisierung von Lipopolysaccharid-induzierbaren Genen in *Arabidopsis thaliana*. Freiburg: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
- Cano-Delgado, A., Yin, Y., Yu, C., Vafeados, D., Mora-Garcia, S., Cheng, J.-C., Nam, K.H., Li, J. and Chory, J.** (2004) BRL1 and BRL3 are novel brassinosteroid receptors that function in vascular differentiation in *Arabidopsis*. *Development*, **131**, 5341-5351.
- Catanzariti, A.-M., Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Ayliffe, M.A. and Ellis, J.G.** (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *Plant Cell*, **18**, 243-256.
- Chang, J.H., Urbach, J.M., Law, T.F., Arnold, L.W., Hu, A., Gombar, S., Grant, S.R., Ausubel, F.M. and Dangl, J.L.** (2005) A high-throughput, near-saturating screen for type III effector genes from *Pseudomonas syringae*. [see comment]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 2549-2554.
- Chen, Y.F., Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y.** (2000) Peptide growth factor phytosulfokine- $\alpha$  contributes to the pollen population effect. *Planta*, **211**, 752-755.

- Cheng, S.H., Willmann, M.R., Chen, H.C. and Sheen, J.** (2002) Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol*, **129**, 469-485.
- Chinchilla, D., Bauer, Z., Regenass, M., Boller, T. and Felix, G.** (2006) The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell*, **18**, 465-476.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nürnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defense. *Nature*, im Druck.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N.** (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, **162**, 156-159.
- Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. and Cascales, E.** (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 451-485.
- Clark, S.E., Williams, R.W. and Meyerowitz, E.M.** (1997) The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, **89**, 575-585.
- Coaker, G., Falick, A. and Staskawicz, B.** (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin.[see comment]. *Science*, **308**, 548-550.
- Cohn, J., Sessa, G. and Martin, G.B.** (2001) Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol*, **13**, 55-62.
- Collmer, A., Lindeberg, M., Petnicki-Ocwieja, T., Schneider, D.J. and Alfano, J.R.** (2002) Genomic mining type III secretion system effectors in *Pseudomonas syringae* yields new picks for all TTSS prospectors. *Trends Microbiol*, **10**, 462-469.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J. and Mauch-Mani, B.** (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, **7**, 210-216.
- da Costa e Silva, O., Klein, L., Schmelzer, E., Trezzini, G.F. and Hahlbrock, K.** (1993) BPF-1, a pathogen-induced DNA-binding protein involved in the plant defense response. *Plant J*, **4**, 125-135.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826-833.
- Day, B., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J.** (2006) NDR1 interaction with RIN4 mediates the differential activation of multiple disease resistance pathways in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **18**, 2782-2791.
- De Paepe, A., Vuylsteke, M., Van Hummelen, P., Zabeau, M. and Van Der Straeten, D.** (2004) Transcriptional profiling by cDNA-AFLP and microarray analysis reveals novel insights into the early response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant J*, **39**, 537-559.
- de Wit, P.J.** (1995) Cf9 and Avr9, two major players in the gene-for-gene game. *Trends Microbiol*, **3**, 251-252.
- Deshais, R.J.** (1999) SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 435-467.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khoumloham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S. and Marco, Y.** (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 8024-8029.
- Dharmasiri, N. and Estelle, M.** (2004) Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends Plant Sci*, **9**, 302-308.
- Dhondt, S., Gouzerh, G., Muller, A., Legrand, M. and Heitz, T.** (2002) Spatio-temporal expression of patatin-like lipid acyl hydrolases and accumulation of jasmonates in elicitor-treated tobacco leaves are not affected by endogenous levels of salicylic acid. *Plant J*, **32**, 749-762.
- Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K.A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D. and Cervone, F.** (2003) The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 10124-10128.
- Dievart, A. and Clark, S.E.** (2003) Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr Opin Plant Biol*, **6**, 507-516.
- Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.M., Teh, T., Wang, C.I., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G.** (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes.[see comment]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 8888-8893.

- Dornelas, M.C., Wittich, P., von Recklinghausen, I., van Lammeren, A. and Kreis, M.** (1999) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis* SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Mol Biol*, **39**, 137-147.
- Dow, M., Newman, M.-A. and von Roepenack, E.** (2000) The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol*, **38**, 241-261.
- Dubos, C. and Plomion, C.** (2003) Identification of water-deficit responsive genes in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) roots. *Plant Mol Biol*, **51**, 249-262.
- Durrant, W.E., Rowland, O., Piedras, P., Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.** (2000) cDNA-AFLP reveals a striking overlap in race-specific resistance and wound response gene expression profiles. *Plant Cell*, **12**, 963-977.
- Ebel, J. and Scheel, D.** (1997) Signals in host-parasite interactions. In *The Mycota. Plant Relationships, Part A* (Carroll, G.C. and Tudzinsky, P., eds). Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 85-105.
- Enkerli, J., Felix, G. and Boller, T.** (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol*, **121**, 391-397.
- Erbs, G. and Newman, M.-A.** (2003) The role of lipopolysaccharides in induction of plant defence responses. *Mol Plant Pathol*, **4**, 421-425.
- Espinosa, A., Guo, M., Tam, V.C., Fu, Z.Q. and Alfano, J.R.** (2003) The *Pseudomonas syringae* type III-secreted protein HopPtoD2 possesses protein tyrosine phosphatase activity and suppresses programmed cell death in plants. *Mol Microbiol*, **49**, 377-387.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *Embo J*, **18**, 4689-4699.
- Felix, G. and Boller, T.** (2003) Molecular sensing of bacteria in plants. The highly conserved RNA-binding motif RNP-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *J Biol Chem*, **278**, 6201-6208.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S. and Boller, T.** (1999) Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, **18**, 265-276.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M. and Nürnberger, T.** (2002) NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defense in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J*, **32**, 375-390.
- Finer, J.J., Vain, P., Jones, M.W. and McMullen, M.D.** (1992) Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. *Plant Cell Rep*, **11**, 323-328.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G. and Ebel, J.** (2004) An ancient enzyme domain hidden in the putative beta-glucan elicitor receptor of soybean may play an active part in the perception of pathogen-associated molecular patterns during broad host resistance. *J Biol Chem*, **279**, 1132-1140.
- Flor, H.H.** (1955) Host-parasite interactions in flax rust - Its genetics and other implications. *Phytopathology*, **45**, 680-685.
- Flor, H.H.** (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu Rev Phytopathol*, **9**, 275-296.
- Fritz-Laylin, L.K., Krishnamurthy, N., Tor, M., Sjolander, K.V. and Jones, J.D.G.** (2005) Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **138**, 611-623.
- Galan, J.E. and Collmer, A.** (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, **284**, 1322-1328.
- Gamas, P., Niebel Fde, C., Lescure, N. and Cullimore, J.** (1996) Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol Plant Microbe Interact*, **9**, 233-242.
- Gamborg, O.L., Miller, R.O. and Ojima, K.** (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, **50**, 151-158.
- Gaulin, E., Drame, N., Lafitte, C., Torto-Alalibo, T., Martinez, Y., Ameline-Torregrosa, C., Khatib, M., Mazarguil, H., Villalba-Mateos, F., Kamoun, S., Mazars, C., Dumas, B., Bottin, A., Esquerre-Tugaye, M.-T. and Rickauer, M.** (2006) Cellulose binding domains of a *Phytophthora* cell wall protein are novel pathogen-associated molecular patterns. *Plant Cell*, **18**, 1766-1777.

- Genin, S. and Boucher, C.** (2004) Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol*, **42**, 107-134.
- Gerber, I.B. and Dubery, I.A.** (2004) Protein phosphorylation in *Nicotiana tabacum* cells in response to perception of lipopolysaccharides from *Burkholderia cepacia*. *Phytochemistry*, **65**, 2957-2966.
- Gijzen, M. and Nürnberger, T.** (2006) Nep1-like proteins from plant pathogens: recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa. *Phytochemistry*, **67**, 1800-1807.
- Godiard, L., Sauviac, L., Torii, K.U., Grenon, O., Mangin, B., Grimsley, N.H. and Marco, Y.** (2003) ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J*, **36**, 353-365.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z. and Boller, T.** (2001) Both the extracellular leucine-rich repeat domain and the kinase activity of FLS2 are required for flagellin binding and signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **13**, 1155-1163.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L. and Boller, T.** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci*, **7**, 251-256.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. and Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, **18**, 277-284.
- Goritschnig, S., Zhang, Y. and Li, X.** (2007) The ubiquitin pathway is required for innate immunity in *Arabidopsis*. *Plant J*, **49**, 540-551.
- Granado, J., Felix, G. and Boller, T.** (1995) Perception of fungal sterols in plants (Subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalinization in tomato cells). *Plant Physiol*, **107**, 485-490.
- Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.-w. and Parker, J.E.** (2003) *Arabidopsis* SGT1b is required for SCFTIR1-mediated auxin response. *Plant Cell*, **15**, 1310-1319.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Götz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. and Nürnberger, T.** (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in *Arabidopsis*. (*Eingereicht*).
- 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., Logemann, E., Nürnberger, T., Parniske, M., Reinold, S., Sacks, W.R. and Schmelzer, E.** (1995) Oligopeptide elicitor-mediated defense gene activation in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 4150-4157.
- Hammond-Kosack, K.E. and Jones, J.D.G.** (2000) Responses to plant pathogens. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W. and Jones, R., eds): American Society of Plant Physiologists, pp. 1102-1156.
- Hauck, P., Thilmony, R. and He, S.Y.** (2003) A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible *Arabidopsis* plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 8577-8582.
- He, P., Shan, L., Lin, N.C., Martin, G.B., Kemmerling, B., Nürnberger, T. and Sheen, J.** (2006) Specific bacterial suppressors of MAMP signaling upstream of MAPKKK in *Arabidopsis* innate immunity. *Cell*, **125**, 563-575.
- Heath, M.C.** (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 315-319.
- Hirt, H.** (2000) MAP kinases in plant signal transduction. *Results Probl Cell Differ*, **27**, 1-9.
- Holt, B.F., Hubert, D.A. and Dangl, J.L.** (2003) Resistance gene signaling in plants -- complex similarities to animal innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **15**, 20-25.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. and Mudgett, M.B.** (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol Microbiol*, **50**, 377-389.
- Igasaki, T., Akashi, N., Ujino-Ihara, T., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. and Shinohara, K.** (2003) Phytosulfokine stimulates somatic embryogenesis in *Cryptomeria japonica*. *Plant Cell Physiol*, **44**, 1412-1416.

- Ihara-Ohori, Y., Nagano, M., Muto, S., Uchimiya, H. and Kawai-Yamada, M. (2007) Cell death suppressor *Arabidopsis* bax inhibitor-1 is associated with calmodulin binding and ion homeostasis. *Plant Physiol*, **143**, 650-660.
- Ito, Y., Kaku, H. and Shibuya, N. (1997) Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *Plant J*, **12**, 347-356.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D. (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O<sub>2</sub>- 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.
- Jahnen, W. and Hahlbrock, K. (1988) Cellular localization of nonhost resistance reactions of parsley (*Petroselinum crispum*) to fungal infection. *Planta*, **173**, 197-204.
- Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, **20**, 197-216.
- Janjusevic, R., Abramovitch, R.B., Martin, G.B. and Stebbins, C.E. (2006) A bacterial inhibitor of host programmed cell death defenses is an E3 ubiquitin ligase. *Science*, **311**, 222-226.
- Jha, G., Rajeshwari, R. and Sonti, R.V. (2005) Bacterial type two secretion system secreted proteins: double-edged swords for plant pathogens. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 891-898.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P. and Valent, B. (2000) Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J*, **19**, 4004-4014.
- Jinn, T.-L., Stone, J.M. and Walker, J.C. (2000) HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev*, **14**, 108-117.
- Jonak, C. and Hirt, H. (2002) Glycogen synthase kinase 3/SHAGGY-like kinases in plants: an emerging family with novel functions. *Trends Plant Sci*, **7**, 457-461.
- Jones, D.A. and Takemoto, D. (2004) Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Curr Opin Immunol*, **16**, 48-62.
- Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J. and Jones, J.D. (1994) Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science*, **266**, 789-793.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Joosten, M.H., Cozijnsen, T.J. and De Wit, P.J. (1994) Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, **367**, 384-386.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiya, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 11086-11091.
- Kanneganti, T.D., Huitema, E., Cakir, C. and Kamoun, S. (2006) Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* Nep1-like protein PiNPP1.1 and INF1 elicitor. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**, 854-863.
- Karin, M. and Ben-Neriah, Y. (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol*, **18**, 621-663.
- Karin, M., Lawrence, T. and Nizet, V. (2006) Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, **124**, 823-835.
- Kawalleck, P., Keller, H., Hahlbrock, K., Scheel, D. and Somssich, I.E. (1993) A pathogen-responsive gene of parsley encodes tyrosine decarboxylase. *J Biol Chem*, **268**, 2189-2194.
- Kawalleck, P., Schmelzer, E., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1995) Two pathogen-responsive genes in parsley encode a tyrosine-rich hydroxyproline-rich glycoprotein (hrgp) and an anionic peroxidase. *Mol Gen Genet*, **247**, 444-452.
- Kawasaki, T., Nam, J., Boyes, D.C., Holt, B.F., Hubert, D.A., Wiig, A. and Dangl, J.L. (2005) A duplicated pair of *Arabidopsis* RING-finger E3 ligases contribute to the RPM1- and RPS2-mediated hypersensitive response. *Plant J*, **44**, 258-270.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. and Leberman, R. (1996) The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature*, **379**, 511-518.

- Keates, S.E., Kostman, T.A., Anderson, J.D. and Bailey, B.A. (2003) Altered gene expression in three plant species in response to treatment with Nep1, a fungal protein that causes necrosis. *Plant Physiol*, **132**, 1610-1622.
- Kemen, E., Kemen, A.C., Rafiqi, M., Hempel, U., Mendgen, K., Hahn, M. and Voegele, R.T. (2005) Identification of a protein from rust fungi transferred from haustoria into infected plant cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 1130-1139.
- Kemmerling, B., Schwedt, A., Rodriguez, P., Mazzotta, S., Frank, M., Synan, A.Q., Mengiste, T., Betsuyaku, S., Parker, J.E., Müssig, C., Thomma, B.P.H.J., Albrecht, C., de Vries, S.C., Hirt, H. and Nürnberger, T. (2007) The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control. *Curr Biol*, doi:10.1016/j.cub.2007.05.046, im Druck.
- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J. and Dangl, J.L. (2005a) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 6496-6501.
- Kim, M.C., Lee, S.H., Kim, J.K., Chun, H.J., Choi, M.S., Chung, W.S., Moon, B.C., Kang, C.H., Park, C.Y., Yoo, J.H., Kang, Y.H., Koo, S.C., Koo, Y.D., Jung, J.C., Kim, S.T., Schulze-Lefert, P., Lee, S.Y. and Cho, M.J. (2002a) Mlo, a modulator of plant defense and cell death, is a novel calmodulin-binding protein. Isolation and characterization of a rice Mlo homologue. *J Biol Chem*, **277**, 19304-19314.
- Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J. and Schulze-Lefert, P. (2002b) Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, **416**, 447-451.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L. and Mackey, D. (2005b) Two *Pseudomonas syringae* type III effectors inhibit RIN4-regulated basal defense in *Arabidopsis*. *Cell*, **121**, 749-759.
- Kinoshita, T., Cano-Delgado, A., Seto, H., Hiranuma, S., Fujioka, S., Yoshida, S. and Chory, J. (2005) Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*, **433**, 167-171.
- Kipreos, E. and Pagano, M. (2000) The F-box protein family. *Genome Biology*, **1**, reviews3002.3001 - reviews3002.3007.
- Kirsch, C., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1997a) Rapid and transient induction of a parsley microsomal delta 12 fatty acid desaturase mRNA by fungal elicitor. *Plant Physiol*, **115**, 283-289.
- Kirsch, C., Logemann, E., Lippok, B., Schmelzer, E. and Hahlbrock, K. (2001) A highly specific pathogen-responsive promoter element from the immediate-early activated CMPG1 gene in *Petroselinum crispum*. *Plant J*, **26**, 217-227.
- Kirsch, C., Takamiya-Wik, M., Reinold, S., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E. (1997b) Rapid, transient, and highly localized induction of plastidial omega-3 fatty acid desaturase mRNA at fungal infection sites in *Petroselinum crispum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 2079-2084.
- Klarzynski, O., Descamps, V., Plesse, B., Yvin, J.C., Kloareg, B. and Fritig, B. (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact*, **16**, 115-122.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.M., Yvin, J.C., Kopp, M., Kloareg, B. and Fritig, B. (2000) Linear beta-1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. *Plant Physiol*, **124**, 1027-1038.
- Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M. and Trethewey, A.J. (1991) Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*, **352**, 524-526.
- Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I. and Kunoh, H. (1997) Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant Cell Physiol*, **38**, 725-733.
- Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol*, **11**, 725-732.
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M. and Ogasawara, N. (1998) Cerebrosides A and C, sphingolipid elicitors of hypersensitive cell death and phytoalexin accumulation in rice plants. *J Biol Chem*, **273**, 31985-31991.
- Krab, I.M. and Parmeggiani, A. (1998) EF-Tu, a GTPase odyssey. *Biochim Biophys Acta*, **1443**, 1-22.
- Kroj, T., Rudd, J.J., Nürnberger, T., Gäbler, Y., Lee, J. and Scheel, D. (2003) Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *J Biol Chem*, **278**, 2256-2264.

- Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T. and Felix, G. (2004) The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants. *Plant Cell*, **16**, 3496-3507.
- Lacombe, B., Becker, D., Hedrich, R., DeSalle, R., Hollman, M., Kwak, J.M., Schroeder, J.I., Le Novere, N., Nam, H.G., Spalding, E.P., Tester, M., Turano, F.J., Chiu, J. and Coruzzi, G. (2001) The Identity of Plant Glutamate Receptors. *Science*, **292**, 1486b-1487.
- Lauge, R. and De Wit, P.J. (1998) Fungal avirulence genes: structure and possible functions. *Fungal Genet Biol*, **24**, 285-297.
- Lease, K.A., Lau, N.Y., Schuster, R.A., Torii, K.U. and Walker, J.C. (2001) Receptor serine/threonine protein kinases in signalling: analysis of the erecta receptor-like kinase of *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol*, **151**, 133-143.
- Lee, J., Klessig, D.F. and Nürnberger, T. (2001a) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene *hin1* independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell*, **13**, 1079-1093.
- Lee, J., Klüsener, B., Tsiamis, G., Stevens, C., Neyt, C., Tampakaki, A.P., Panopoulos, N.J., Noller, J., Weiler, E.W., Cornelis, G.R., Mansfield, J.W. and Nürnberger, T. (2001b) HrpZ(Psph) 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.
- Li, C., Bai, Y., Jacobsen, E., Visser, R., Lindhout, P. and Bonnema, G. (2006) Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. *Plant Mol Biol*, **62**, 127-140.
- Li, C.M., Haapalainen, M., Lee, J., Nurnberger, T., Romantschuk, M. and Taira, S. (2005) Harpin of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* harbors a protein binding site. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 60-66.
- Li, J. and Chory, J. (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*, **90**, 929-938.
- Li, J., Wen, J., Lease, K.A., Doke, J.T., Tax, F.E. and Walker, J.C. (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*, **110**, 213-222.
- Liang, P. and Pardee, A.B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction.[see comment]. *Science*, **257**, 967-971.
- Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K. and O'Neill, L.A.J. (2005) Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*, **5**, 446-458.
- Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H. and Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science*, **276**, 2054-2057.
- Llorente, F., Alonso-Blanco, C., Sanchez-Rodriguez, C., Jorda, L. and Molina, A. (2005) ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J*, **43**, 165-180.
- Logemann, E., Parniske, M. and Hahlbrock, K. (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5905-5909.
- Lois, R., Dietrich, A., Hahlbrock, K. and Schulz, W. (1989) A phenylalanine ammonia-lyase gene from parsley: structure, regulation and identification of elicitor and light responsive cis-acting elements. *Embo J*, **8**, 1641-1648.
- Lopez-Solanilla, E., Bronstein, P.A., Schneider, A.R. and Collmer, A. (2004) HopPtoN is a *Pseudomonas syringae* Hrp (type III secretion system) cysteine protease effector that suppresses pathogen-induced necrosis associated with both compatible and incompatible plant interactions. *Mol Microbiol*, **54**, 353-365.
- Lozoya, E., Hoffmann, H., Douglas, C., Schulz, W., Scheel, D. and Hahlbrock, K. (1988) Primary structures and catalytic properties of isoenzymes encoded by the two 4-coumarate: CoA ligase genes in parsley. *Eur J Biochem*, **176**, 661-667.
- Mackey, D., Holt, B.F., 3rd, Wiig, A. and Dangl, J.L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell*, **108**, 743-754.
- Martin, G.B., Bogdanove, A.J. and Sessa, G. (2003) Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 23-61.

- Matsubayashi, Y., Hanai, H., Hara, O. and Sakagami, Y.** (1996) Active fragments and analogs of the plant growth factor, phyto-sulfokine: structure-activity relationships. *Biochem Biophys Res Commun*, **225**, 209-214.
- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Kihara, H., Niwa, M. and Sakagami, Y.** (2006) Disruption and overexpression of *Arabidopsis* phyto-sulfokine receptor gene affects cellular longevity and potential for growth. *Plant Physiol*, **142**, 45-53.
- Matsubayashi, Y., Ogawa, M., Morita, A. and Sakagami, Y.** (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phyto-sulfokine. *Science*, **296**, 1470-1472.
- Matsubayashi, Y. and Sakagami, Y.** (1996) Phyto-sulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.[see comment]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 7623-7627.
- Mattinen, L., Tshuikina, M., Mae, A. and Pirhonen, M.** (2004) Identification and characterization of Nip, necrosis-inducing virulence protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 1366-1375.
- Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Petrilli, V. and Tschopp, J.** (2007) A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. *Nat Immunol*, **8**, 497-503.
- McGuinness, D.H., Dehal, P.K. and Pleass, R.J.** (2003) Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol*, **19**, 312-319.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A.** (1997) Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell*, **91**, 295-298.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**, 298-300.
- Meindl, T., Boller, T. and Felix, G.** (2000) The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept. *Plant Cell*, **12**, 1783-1794.
- Miyake, K.** (2004) Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4-MD-2. *Trends Microbiol*, **12**, 186-192.
- Moens, S. and Vanderleyden, J.** (1996) Functions of bacterial flagella. *Crit Rev Microbiol*, **22**, 67-100.
- Montesano, M., Brader, G. and Palva, E.T.** (2003) Pathogen derived elicitors: searching for receptors in plants. *Mol Plant Pathol*, **4**, 73-79.
- Morillo, S.A. and Tax, F.E.** (2006) Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 460-469.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiology Plantarum*, **15**, 473-497.
- Mysore, K.S., Crasta, O.R., Tuori, R.P., Folkerts, O., Swirsky, P.B. and Martin, G.B.** (2002) Comprehensive transcript profiling of Pto- and Prf-mediated host defense responses to infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant J*, **32**, 299-315.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T. and Jones, J.D.G.** (2004) The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiol*, **135**, 1113-1128.
- Nennstiel, D., Scheel, D. and Nürnberger, T.** (1998) Characterization and partial purification of an oligopeptide elicitor receptor from parsley (*Petroselinum crispum*). *FEBS Lett*, **431**, 405-410.
- Newman, M.A., von Roepenack-Lahaye, E., Parr, A., Daniels, M.J. and Dow, J.M.** (2002) Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria. *Plant J*, **29**, 487-495.
- Nino-Liu, D.O., Ronald, P.C. and Bogdanove, A.J.** (2006) *Xanthomonas oryzae* pathovars: model pathogens of a model crop. *Mol Plant Pathol*, **7**, 303-324.
- Noel, L., Thieme, F., Nennstiel, D. and Bonas, U.** (2001) cDNA-AFLP analysis unravels a genome-wide hrpG-regulon in the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Mol Microbiol*, **41**, 1271-1281.
- Nühse, T.S., Peck, S.C., Hirt, H. and Boller, T.** (2000) Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6. *J Biol Chem*, **275**, 7521-7526.
- Nürnberger, T.** (1999) Signal perception in plant pathogen defense. *Cell Mol Life Sci*, **V55**, 167-182.

- Nürnberg, T. and Brunner, F.** (2002) Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 318-324.
- Nürnberg, T., Brunner, F., Kemmerling, B. and Piater, L.** (2004) Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev*, **198**, 249-266.
- Nürnberg, T. and Kemmerling, B.** (2006) Receptor protein kinases - pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci*, **11**, 519-522.
- Nürnberg, T. and Lipka, V.** (2005) Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Mol Plant Pathol*, **6**, 335-345.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Hahlbrock, K. and 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.
- Nürnberg, T., Nennstiel, D., Jabs, T., Sacks, W.R., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1994) High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell*, **78**, 449-460.
- Nürnberg, T. and Scheel, D.** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, **6**, 372-379.
- Osbourn, A.E.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.L., Panabieres, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M. and Blein, J.P.** (2001) Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2825-2834.
- Palsson-McDermott, E.M. and O'Neill, L.A.J.** (2004) Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, **113**, 153-162.
- Pan, Q., Wendel, J. and Fluhr, R.** (2000) Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J Mol Evol*, **50**, 203-213.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J. and Osbourn, A.E.** (1999) Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 12923-12928.
- Park, C.J., Kim, K.J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.C. and Paek, K.H.** (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J*, **37**, 186-198.
- Parker, J.E., Schulte, W., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in parsley cultured cells and protoplasts. *Mol Plant Microbe Interact*, **4**, 19-27.
- Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schauser, L., Jaggard, D.A., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D., Shirasu, K. and Baulcombe, D.C.** (2002) Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 10865-10869.
- Peck, S.C., Nühse, T.S., Hess, D., Iglesias, A., Meins, F. and Boller, T.** (2001) Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. *Plant Cell*, **13**, 1467-1475.
- Pemberton, C.L. and Salmond, G.P.C.** (2004) The Nep1-like proteins - a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol Plant Pathol*, **5**, 353-359.
- Pemberton, C.L., Whitehead, N.A., Sebahia, M., Bell, K.S., Hyman, L.J., Harris, S.J., Matlin, A.J., Robson, N.D., Birch, P.R., Carr, J.P., Toth, I.K. and Salmond, G.P.** (2005) Novel quorum-sensing-controlled genes in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: identification of a fungal elicitor homologue in a soft-rotting bacterium. *Mol Plant Microbe Interact*, **18**, 343-353.
- Piater, L.A., Nürnberg, T. and Dubery, I.A.** (2004) Identification of a lipopolysaccharide responsive erk-like MAP kinase in tobacco leaf tissue. *Mol Plant Pathol*, **5**, 331-341.
- Preston, G.M.** (2000) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*: the right pathogen, of the right plant, at the right time. *Mol Plant Pathol*, **1**, 263-275.
- Prime-A-Plant-Group: Conrath, U., Beckers, G.J., Flors, V., Garcia-Agustin, P., Jakab, G., Mauch, F., Newman, M.A., Pieterse, C.M., Poinsot, B., Pozo, M.J., Pugin, A., Schaffrath, U., Ton, J., Wendehenne,**

- D., Zimmerli, L. and Mauch-Mani, B. (2006) Priming: getting ready for battle. *Mol Plant Microbe Interact*, **19**, 1062-1071.
- Qin, L., Overmars, H., Helder, J., Popeijus, H., van der Voort, J.R., Groenink, W., van Koert, P., Schots, A., Bakker, J. and Smant, G. (2000) An efficient cDNA-AFLP-based strategy for the identification of putative pathogenicity factors from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 830-836.
- Quayyum, H.A., Gijzen, M. and Traquair, J.A. (2003) Purification of a necrosis-inducing, host-specific protein toxin from spore germination fluid of *Alternaria panax*. *Phytopathology*, **93**, 323-328.
- Qutob, D., Kamoun, S. and Gijzen, M. (2002) Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant J*, **32**, 361-373.
- Qutob, D., Kemmerling, B., Brunner, F., K ufner, I., Engelhardt, S., Gust, A.A., Luberacki, B., Seitz, H.U., Stahl, D., Rauhut, T., Glawischnig, E., Schween, G., Lacombe, B., Watanabe, N., Lam, E., Schlichting, R., Scheel, D., Nau, K., Dodt, G., Hubert, D., Gijzen, M. and N urnberger, T. (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell*, **18**, 3721-3744.
- Racape, J., Belbahri, L., Engelhardt, S., Lacombe, B., Lee, J., Lochman, J., Marais, A., Nicole, M., N urnberger, T., Parlange, F., Puvarel, S. and Keller, H. (2005) Ca<sup>2+</sup>-dependent lipid binding and membrane integration of PopA, a harpin-like elicitor of the hypersensitive response in tobacco. *Mol Microbiol*, **58**, 1406-1420.
- Ramos, H.C., Rumbo, M. and Sirard, J.-C. (2004) Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol*, **12**, 509-517.
- Read, M.A., Brownell, J.E., Gladysheva, T.B., Hottelet, M., Parent, L.A., Coggins, M.B., Pierce, J.W., Podust, V.N., Luo, R.-S., Chau, V. and Palombella, V.J. (2000) Nedd8 modification of Cul-1 activates SCF $\beta$  TrCP-dependent ubiquitination of I[ $\kappa$ ] B[ $\alpha$ ]. *Mol Cell Biol*, **20**, 2326-2333.
- Reddy, V.S., Ali, G.S. and Reddy, A.S. (2002) Genes encoding calmodulin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome. *J Biol Chem*, **277**, 9840-9852.
- Rehmany, A.P., Gordon, A., Rose, L.E., Allen, R.L., Armstrong, M.R., Whisson, S.C., Kamoun, S., Tyler, B.M., Birch, P.R. and Beynon, J.L. (2005) Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP1 resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *Plant Cell*, **17**, 1839-1850.
- Reijans, M., Lascaris, R., Groeneger, A.O., Wittenberg, A., Wesselink, E., van Oeveren, J., Wit, E.d., Boorsma, A., Voetdijk, B. and van der Spek, H. (2003) Quantitative comparison of cDNA-AFLP, microarrays, and genechip expression data in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genomics*, **82**, 606-618.
- Rentel, M.C., Lecourieux, D., Ouaked, F., Usher, S.L., Petersen, L., Okamoto, H., Knight, H., Peck, S.C., Grierson, C.S., Hirt, H. and Knight, M.R. (2004) OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, **427**, 858-861.
- Ricci, P., Bonnet, P., Huet, J.C., Sallantin, M., Beauvais-Cante, F., Bruneteau, M., Billard, V., Michel, G. and Pernollet, J.C. (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem*, **183**, 555-563.
- Risseuw, E.P., Daskalchuk, T.E., Banks, T.W., Liu, E., Cotelesage, J., Hellmann, H., Estelle, M., Somers, D.E. and Crosby, W.L. (2003) Protein interaction analysis of SCF ubiquitin E3 ligase subunits from *Arabidopsis*. *Plant J*, **34**, 753-767.
- Robatzek, S., Chinchilla, D. and Boller, T. (2006) Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*. *Genes Dev*, **20**, 537-542.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y. and Mudgett, M.B. (2004) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol Plant Microbe Interact*, **17**, 633-643.
- Rodnina, M.V. and Wintermeyer, W. (2001) Fidelity of aminoacyl-tRNA selection on the ribosome: Kinetic and structural mechanisms. *Annu Rev Biochem*, **70**, 415-435.
- Ron, M. and Avni, A. (2004) The receptor for the fungal elicitor ethylene-inducing xylanase is a member of a resistance-like gene family in tomato. *Plant Cell*, **16**, 1604-1615.
- Rooney, H.C.E., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G. and de Wit, P.J.G.M. (2005) *Cladosporium* Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science*, **308**, 1783-1786.

- Rotblat, B., Enshell-Seijffers, D., Gershoni, J.M., Schuster, S. and Avni, A.** (2002) Identification of an essential component of the elicitation active site of the EIX protein elicitor. *Plant J*, **32**, 1049-1055.
- Rushton, P.J. and Somssich, I.E.** (1998) Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 311-315.
- Rushton, P.J., Torres, J.T., Parniske, M., Wernert, P., Hahlbrock, K. and Somssich, I.E.** (1996) Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1 genes. *Embo J*, **15**, 5690-5700.
- Samson, F., Brunaud, V., Balzergue, S., Dubreucq, B., Lepiniec, L., Pelletier, G., Caboche, M. and Lecharny, A.** (2002) FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Res*, **30**, 94-97.
- Sanabria, N.M. and Dubery, I.A.** (2006) Differential display profiling of the *Nicotiana* response to LPS reveals elements of plant basal resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, **344**, 1001-1007.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467.
- Scheel, D., Colling, C., Hedrich, R., Kawalleck, P., Parker, J.E., Sacks, W.R., Somssich, I.E. and Hahlbrock, K.** (1991) Signals in plant defense gene activation. In *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions* (Hennecke, H. and Verma, D.P.S., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, pp. 373-380.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O.** (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Scholkopf, B., Weigel, D. and Lohmann, J.U.** (2005) A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat Genet*, **37**, 501-506.
- Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R.** (2003) Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **41**, 641-667.
- Shan, L., He, P. and Sheen, J.** (2007) Endless hide-and-seek: dynamic co-evolution in plant-bacterium warfare. *J Integr Plant Biol*, **49**, 105-111.
- Shao, F., Merritt, P.M., Bao, Z., Innes, R.W. and Dixon, J.E.** (2002) A *Yersinia* effector and a *Pseudomonas* avirulence protein define a family of cysteine proteases functioning in bacterial pathogenesis. *Cell*, **109**, 575-588.
- Shapiro, A.D. and Zhang, C.** (2001) The role of NDR1 in avirulence gene-directed signaling and control of programmed cell death in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **127**, 1089-1101.
- Sheen, J.** (2001) Signal transduction in maize and *Arabidopsis* mesophyll protoplasts. *Plant Physiol*, **127**, 1466-1475.
- Shen, Y. and Ronald, P.** (2002) Molecular determinants of disease and resistance in interactions of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and rice. *Microbes & Infection*, **4**, 1361-1367.
- Shinohara, H., Ogawa, M., Sakagami, Y. and Matsubayashi, Y.** (2007) Identification of ligand binding site of phytosulfokine receptor by on-column photoaffinity labeling. *J Biol Chem*, **282**, 124-131.
- Shiu, S.H. and Bleecker, A.B.** (2001) Receptor-like kinases from *Arabidopsis* form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 10763-10768.
- Shiu, S.H., Karlowski, W.M., Pan, R., Tzeng, Y.H., Mayer, K.F. and Li, W.H.** (2004) Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell*, **16**, 1220-1234.
- Silipo, A., Molinaro, A., Sturiale, L., Dow, J.M., Erbs, G., Lanzetta, R., Newman, M.-A. and Parrilli, M.** (2005) The elicitation of plant innate immunity by lipooligosaccharide of *Xanthomonas campestris*. *J Biol Chem*, **280**, 33660-33668.
- Silverman, N. and Maniatis, T.** (2001) NF- $\kappa$ B signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev*, **15**, 2321-2342.
- Simoës-Araújo, J.L., Rodrigues, R.L., de A. Gerhardt, L.B., Mondego, J.M.C., Alves-Ferreira, M., Rumjanek, N.G. and Margis-Pinheiro, M.** (2002) Identification of differentially expressed genes by cDNA-AFLP technique during heat stress in cowpea nodules. *FEBS Lett*, **515**, 44-50.
- Somssich, I.E., Bollmann, J., Hahlbrock, K., Kombrink, E. and Schulz, W.** (1989) Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Mol Biol*, **12**, 227-234.

- Somssich, I.E., Schmelzer, E., Bollmann, J. and Hahlbrock, K. (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding "pathogenesis-related" proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**, 2427-2430.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. and Ronald, P. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21.[see comment][comment]. *Science*, **270**, 1804-1806.
- Staats, M., Van Baarlen, P., Schouten, A. and Van Kan, J.A.L. (2007) Functional analysis of NLP genes from *Botrytis elliptica*. *Mol Plant Pathol*, **8**, 209-214.
- Stone, J.M., Trotochaud, A.E., Walker, J.C. and Clark, S.E. (1998) Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiol*, **117**, 1217-1225.
- Strange, R.N. and Scott, P.R. (2005) Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 83-116.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F. and Krysan, P.J. (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiol*, **143**, 661-669.
- Takahashi, Y., Nasir, K.H.B., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kamoun, S. and Terauchi, R. (2007) A high-throughput screen of cell-death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J*, **49**, 1030-1040.
- Takai, R., Matsuda, N., Nakano, A., Hasegawa, K., Akimoto, C., Shibuya, N. and Minami, E. (2002) EL5, a rice N-acetylchitooligosaccharide elicitor-responsive RING-H2 finger protein, is a ubiquitin ligase which functions in vitro in co-operation with an elicitor-responsive ubiquitin-conjugating enzyme, OsUBC5b. *Plant J*, **30**, 447-455.
- Takamiya-Wik, M. (1995) Functional analysis of the parsley (*Petroselinum crispum*) eli7 gene and identification of a cis-regulatory elicitor responsive element within its promoter. Köln, Germany: University of Köln.
- Takeda, K., Kaisho, T. and Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*, **21**, 335-376.
- Takken, F.L., Albrecht, M. and Tameling, W.I. (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 383-390.
- Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J. and Steinbiss, H.-H. (1987) A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res*, **15**, 5890.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R.F. and Komeda, Y. (1996) The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*, **8**, 735-746.
- Toth, I.K. and Birch, P.R.J. (2005) Rotting softly and stealthily. *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 424-429.
- Trotochaud, A.E., Hao, T., Wu, G., Yang, Z. and Clark, S.E. (1999) The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and a Rho-related protein. *Plant Cell*, **11**, 393-406.
- Umemoto, N., Kakitani, M., Iwamatsu, A., Yoshikawa, M., Yamaoka, N. and Ishida, I. (1997) The structure and function of a soybean beta-glucan-elicitor-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 1029-1034.
- Van der Biezen, E.A. and Jones, J.D.G. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci*, **23**, 454-456.
- Van Sluys, M.A., Monteiro-Vitorello, C.B., Camargo, L.E.A., Menck, C.F.M., da Silva, A.C.R., Ferro, J.A., Oliveira, M.C., Setubal, J.C., Kitajima, J.P. and Simpson, A.J. (2002) Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **40**, 169-189.
- Veit, S., Worle, J.M., Nürnberger, T., Koch, W. and Seitz, H.U. (2001) A novel protein elicitor (PaNie) from *Pythium aphanidermatum* induces multiple defense responses in carrot, *Arabidopsis*, and tobacco. *Plant Physiol*, **127**, 832-841.
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) Serial analysis of gene expression.[see comment]. *Science*, **270**, 484-487.

- Vishnyakova, T.G., Bocharov, A.V., Baranova, I.N., Chen, Z., Remaley, A.T., Csako, G., Eggerman, T.L. and Patterson, A.P.** (2003) Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. *J Biol Chem*, **278**, 22771-22780.
- Vorwerk, S., Somerville, S. and Somerville, C.** (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci*, **9**, 203-209.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. and et al.** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, **23**, 4407-4414.
- Wei, Z.M., Laby, R.J., Zumoff, C.H., Bauer, D.W., He, S.Y., Collmer, A. and Beer, S.V.** (1992) Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science*, **257**, 85-88.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T. and Shibuya, N.** (2000) Differences in the recognition of glucan elicitor signals between rice and soybean: beta-glucan fragments from the rice blast disease fungus *Pyricularia oryzae* that elicit phytoalexin biosynthesis in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell*, **12**, 817-826.
- Yamakawa, S., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H. and Satoh, S.** (1999) Promotive effects of the peptidyl plant growth factor, phytosulfokine-alpha, on the growth and chlorophyll content of *Arabidopsis* seedlings under high night-time temperature conditions. *Biosci Biotechnol Biochem*, **63**, 2240-2243.
- Yamakawa, S., Sakuta, C., Matsubayashi, Y., Sakagami, Y., Kamada, H. and Satoh, S.** (1998) The promotive effects of a peptidyl plant growth factor, phytosulfokine- $\alpha$ , on the formation of adventitious roots and expression of a gene for a root-specific cystatin in cucumber hypocotyls. *J Plant Res*, **V111**, 453-458.
- Yonekura, K., Maki-Yonekura, S. and Namba, K.** (2003) Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, **424**, 643-650.
- Yun, B.-W., Atkinson, H.A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N.D., Pallas, J.A. and Loake, G.J.** (2003) Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant J*, **34**, 768-777.
- Zasloff, M.** (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 389-395.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P. and Durner, J.** (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 15811-15816.
- Zhang, B., Ramonell, K., Somerville, S. and Stacey, G.** (2002) Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 963-970.
- Zhou, A., Wang, H., Walker, J.C. and Li, J.** (2004) BRL1, a leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, is functionally redundant with BRI1 in regulating *Arabidopsis* brassinosteroid signaling. *Plant J*, **40**, 399-409.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L. and Gruissem, W.** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol*, **136**, 2621-2632.
- Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. and Scheel, D.** (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca<sup>2+</sup>-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 2751-2755.
- Zinecker, H.** (2001) Reaktive Sauerstoffspezies in der pflanzlichen Pathogenabwehr - Isolierung und Charakterisierung von Genen aus *Petroselinum crispum* L., die für putative NADPH-Oxidasen kodieren. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Zipfel, C.** (2005) Receptor-like kinases and pathogen-associated molecular patterns perception in *Arabidopsis*. Basel: University of Basel.
- Zipfel, C. and Felix, G.** (2005) Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr Opin Plant Biol*, **8**, 353-360.
- Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T. and Felix, G.** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell*, **125**, 749-760.
- Zipfel, C., Robatzek, S., Navarro, L., Oakeley, E.J., Jones, J.D., Felix, G. and Boller, T.** (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature*, **428**, 764-767.

## 7 ANHANG

### ANHANG A: PRIMER FÜR DIE cDNA-AFLP-ANALYSE

Wenn nicht anders angegeben, ist immer die 5'-3'-Leserichtung aufgeführt.

#### ApoI Adapter:

5' - CTC GTA GAC TGC GTA CC  
           CAT CTG ACG CAT GGT TAA-phosph-5'

#### TaqI Adapter:

5' - GAC GAT GAG TCC TGA C  
           TA CTC AGG ACT GGC-phosph-5'

#### ApoI+0 Primer:

CTC GTA GAC TGC GTA CCA ATT

#### TaqI+0 Primer:

GAC GAT GAG TCC TGA CCG A

#### Apo+2 Primer:

1. GAC TGC GTA CCA ATT TAA
2. GAC TGC GTA CCA ATT TAT
3. GAC TGC GTA CCA ATT TAG
4. GAC TGC GTA CCA ATT TAC
5. GAC TGC GTA CCA ATT TTA
6. GAC TGC GTA CCA ATT TTT
7. GAC TGC GTA CCA ATT TTG
8. GAC TGC GTA CCA ATT TTC
9. GAC TGC GTA CCA ATT TGA
10. GAC TGC GTA CCA ATT TGT
11. GAC TGC GTA CCA ATT TGG
12. GAC TGC GTA CCA ATT TGC
13. GAC TGC GTA CCA ATT TCA
14. GAC TGC GTA CCA ATT TCT
15. GAC TGC GTA CCA ATT TCG
16. GAC TGC GTA CCA ATT TCC

#### TaqI+2 Primer:

1. GAT GAG TCC TGA CCG AAA
2. GAT GAG TCC TGA CCG AAT
3. GAT GAG TCC TGA CCG AAG
4. GAT GAG TCC TGA CCG AAC
5. GAT GAG TCC TGA CCG ATA
6. GAT GAG TCC TGA CCG ATT
7. GAT GAG TCC TGA CCG ATG
8. GAT GAG TCC TGA CCG ATC
9. GAT GAG TCC TGA CCG AGA
10. GAT GAG TCC TGA CCG AGT
11. GAT GAG TCC TGA CCG AGG
12. GAT GAG TCC TGA CCG AGC
13. GAT GAG TCC TGA CCG ACA
14. GAT GAG TCC TGA CCG ACT
15. GAT GAG TCC TGA CCG ACG
16. GAT GAG TCC TGA CCG ACC

## ANHANG B: WEITERE VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE

**Tabelle 7-1: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide für die RT-PCRs in Petersilie.**

Primername	Oligosequenz (5'-3'-Richtung)	T <sub>s</sub> /T <sub>A</sub> [°C]	Zyklenzahl
18Sf	GAT GGT AGG ATA GTG GCC TA	57,3/50	18
18Sr	TGG TTC AGA CTA GGA CGG TA	55,3/50	18
pc177-3f	ACT GCC CCG GCT TCT ACA G	61,0/53	28
pc177-3r	GTC GCT GAT CCA CTT CAA AAG A	58,4/53	28
pc196-3f	GCA TAA TTT TGG CAG GAA	49,1/50	25
pc196-3r	GCA ATT GGC TAG CGA GAA G	56,7/50	25
pc417-4f	TAA AGG CGG TGA GTT GTT	51,4/47	25
pc417-4r	GTG GCA TCG ACG GCT AAG	58,2/47	25
pc482-2f	ACG CAG AGC AGA AGG GTT TA	57,3/55	28
pc482-2r	GTC AAG CGC TCT GCA ATA ACA	57,9/55	28
pc510-3f	TTC TTC ACA TAC CGA TCA ATT A	52,8/50	29
pc510-3r	CCT TTT ATG CCA AGA TCA AG	53,2/50	29
pc583-1f	AAA CCC CAT ACA ACA AAA	46,9/50	28
pc583-1r	GCT TAC AAT TCC GGG GCT TAT	57,9/50	28
pc629-1f	GTA CCC GGG GAA CAA ACT	56,0/50	28
pc629-1r	TGG ATA CCT GCA AAC TAC CC	57,3/50	28
pc675-1f	TCC GGC TCC ACA TCT ACA CAT TCT	62,7/55	29
pc675-1r	GCG GTG GAG GCG GTT GA	60,0/55	29
pc781-1f	TAC CAA CAG CAA AGA CGA TGA GA	58,9/50	29
pc781-1r	TTC TTC TTC TTG CTG GGG TCA C	60,3/50	29
pc787-2f	AGT GTT GTA ATG CTA GCT TTT GAG	57,6/55	28
pc787-2r	TTG CCC CAT AAT TCA CTT CC	55,3/55	28
pc804-1f	ACA CTG CAA CAC CAT ACA AA	53,2/53	28
pc804-1r	GCT GGA TCA GTG CGT GAG	58,2/53	28
yg25-1f	GCT TCG GTT CCA GGA TGT TA	57,3/55	27
yg25-1r	AAG GAA GCT ACT GCC ACC AAT	57,9/55	27
yg36-1f	TGA AAA TTA GTT TAC CGT CTC TGA	55,9/52	30
yg36-1r	AAT CCA AAA CTT TCA ACC TAC TTG	55,9/52	30
yg55-1f	AGG GTA ACA TGG ACT GGA	53,7/50	27
yg55-1r	ATC TGG AAT AAA TGT GAG G	50,2/50	27
yg55-2f	CTT CAA GAT AGT CCA GTC AAA TAC	57,6/55	25
yg55-2r	TAC TTC CAC TAC TGT CGC TCA CTG	62,7/55	25
yg57-1f	CTG CGA GTG ATC TTG GGA ATA	57,9/55	27
yg57-1r	TTG ACA GCC TTT ACA GTG AA	53,2/55	27
yg68-2f	CCA TGG AAG TGG CTG AAC A	56,7/55	27
yg68-2r	AAA GGC GGC TTG GAG AAC	56,0/55	27
yg70-2f	GCA TAA TCA GTA CCG AAG TT	53,2/50	25
yg70-2r	GTT TGC ACA CCG AGA ATA	51,4/50	25
yg70-4f	GTG GGG GCA TTG TGT TAG T	56,7/53	30
yg70-4r	TGG AAA CCT CAG CAA ATA CC	55,3/53	30
yg88-1-1f	AGG ACC TGT CTG GAA TCA AA	55,3/55	27
yg88-1-1r	GGC TAG CCG TGT AAC TCT G	58,8/55	27
yg88-1-2f	GCT GTT GTC GTT GCT CTC AC	59,4/55	23
yg88-1-2r	GCA AAA ACC AAA ACA TCA CCA	54,0/55	23

yg142-2f	CAC CGG AAA TCG GGT CAT T	56,7/50	28
yg142-2r	CCG GCA AAC TTC CAC TAA GC	59,4/50	28
yg207-3f	TGT GGG TCA AAA TCA ACT G	52,4/50	28
yg207-3r	TGC TGG CAC ATT AGG ATA	51,4/50	28
yg228-2f	CCA CTC TCA CCA GGA AAT AG	57,3/55	23
yg228-2r	TAA ACC CAC ATA CTC ACC AA	53,2/55	23
yg230-2f	CGT TCT GCA GAG TGT CAC	56,0/55	27-28
yg230-2r	GAA GGG CCT CCG ACC AC	60,0/55	27-28
yg230-4f	TGG ATT TCA CGA TAC TTG	49,1/50	27
yg230-4r	GCT TGC AGG TGT ACT AAA AC	55,3/50	27
yg233-1f	GAT GGG TGG CTG TGG TT	55,2/53	25
yg233-1r	AGG AGC TTC ATT CCA AGT GT	55,3/53	25
yg235-1f	TTA GCG ATG CAG GAG CTG TTA TT	58,9/50	28
yg235-1r	CTT CTT TCG CTA TCC CTA CAA TG	58,9/50	28
yg307-4f	CCT ACC ACT TTT GCT ACA CG	57,3/55	27-28
yg307-4r	GCC GAC ACC CGA ATC AC	57,6/55	27-28
yg313-1f	AAT TAG CTT CCC CGA ACC	53,7/48	25
yg313-1r	ATT TCC ATG TAG CTT GTA TT	49,1/48	25
yg315-1f	ATC AAT GGC AGC AAT CC	50,4/50	25-27
yg315-1r	GGT ACG GGA ATG ATG TTG	53,7/50	25-27
yg322-1f	CCC TCT CAC AAC TTC AAT CT	55,3/52-53	30
yg322-1r	TTG GCA GTG TTG GGA TGG	56,0/52-53	30
yg395-1f	TGA ATC AGC TTT ACG AGA TG	53,2/48-50	30
yg395-1r	AAA TGG GAC GAG GAC AG	52,8/48-50	30
yg400-1-2f	GCT GAG CTT GGC AAC TT	52,8/50	27-28
yg400-1-2r	GTT AAG GCG CAA GAA AAT A	50,2/50	27-28
yg521-2-1f	GAG GTG GCA TTA GAG GCA TCA	59,8/50	32
yg521-2-1r	GAG CTG TGA GCA TCG CAG TTA C	62,1/50	32
yg528-1f	AAC TCG CTC AAC TTT ATT CCT C	56,5/50	28
yg528-1r	CCC AAG GTT GTT ACG GTA GTT	57,9/50	28
yg532-1-4f	GTA CTA AAC TCT CCC TTC C	54,5/50	32
yg532-1-4r	GCA GTG TAG CAT AGT AGT TG	55,3/50	32
yg544-1f	CAG GGT GGT GCA GGA GGA G	63,1/55	27
yg544-1r	CTA TTT TTA TTG GCT TAC AGT CC	55,3/55	27
yg550-1-3f	CAA GAG AAG ATG CAT ATA ATC AGC	57,6/55	25
yg550-1-3r	ATA GCT TTC TCG GAG ACT TGT TCA	59,3/55	25
yg832-4f	AAA AAG CCT TTA CAT TCC AGT C	54,7/50	28
yg832-4r	GGA TCG CTG CAT CTC CA	55,2/50	28

Tabelle 7-2: Zusammenstellung der verwendeten RACE-Oligonukleotide in Petersilie.

Primername	Oligosequenz (5'-3'-Richtung)	T <sub>s</sub> [°C]
GR3'	GCT GTC AAC GAT ACG CTA CGT AAC G	64,6
GR5'	CGA CTG GAG CAC GAG GAC ACT GA	66,0
RACE-pc25f	CCG CAT TGG TGG CAG TAG CTT CCT TC	68,0
RACE-pc25r	GCC ACC AAT GCG GTT TTC TCT AGT TGC T	66,6
RACE-pc36-1f-2	ATA TGT GGA GTT GCA AGT AGG	65,0
RACE-pc36-1r-2	CCT ACT TGC AAC TCC ACA TAT GTC CTC	65,0
RACE-pc36f	CCG TCT CTG AAG TTC CTG AAT CTG TCC	66,5
RACE-pc36r	GGT AGC AAG TTG TGG GAC AGA TTC AGG	66,5
RACE-pc68-2f-2	ACG TAT GCC CCA TGG AAG TGG CTG AAC	68,0
RACE-pc68-2r-2	GGC TTG GAG AAC CAC CTG TTT GGA AGA	66,5
RACE-pc68f	GTT CTC CAA GCC GC	68,0
RACE-pc68-r	GCT CTG CTG TTC AGC CAC TTC CAT GG	68,0
RACE-pc88-1-1f	GCA CAC TCT TCA CTT TGC GTG GGG ACA	68,0
RACE-pc88-1-1r	AGC CAC ATC ACC ATT GCC ATC CTT G	64,6
RACE-pc88-1-1r-2	GTC CCC ACG CAA AGT GAA GAG TGT GCT	68,0
RACE-pc88-1-1r-3	CCA ATT TGA TTC CAG ACA GGT CCT G	63,0
RACE-pc207-3f	GGG TCA AAA TCA ACT GCT GTT CTT CCG C	66,6
RACE-pc207-3f-2	GGT GCA AGA TAT CCT AAT GTG CCA GC	64,8
RACE-pc207-3r	TTC TGG AGA TTG TCA GCG GAA GAA CAG C	66,6
RACE-pc207-3r-2	GCT GGC ACA TTA GGA TAT CTT GCA CC	64,8
RACE-pc228-2f	ACT CTC ACC AGG AAA TAG GGG CTG ACC A	68,0
RACE-pc228-2f-2	GGC TGT AGT GTA CTC TGT CGC ACC AA	66,4
RACE-pc228-2r	CGT CTG CTC TAG ATA CTA TCG TGC ACC	66,5
RACE-pc228-2r-2	TCC TGG TGA GAG TGG AGT GGA CCA GCT	69,5
RACE-pc258-1f	CGG TAC GAC CCC GTT CAA GGG AAT AA	66,4
RACE-pc258-1f-2	CGA GTA CAT GGC GCC CGA AAT GAT AC	66,4
RACE-pc258-1r	GTG ATC TCT GTG TCT GAC TCG GCA ACA	66,5
RACE-pc258-1r-2	TCC ACT GCA TAG TCG TGG CCT TTG CCT	68,0
RACE-pc315-1f	TTC GGG GAT CAA TGG CAG CAA TCC T	64,6
RACE-pc315-1r	GTG ATG CGT TTG CGG AAA TGG AAG C	64,6
RACE-pc315f-2	TCA CTC CTC CGC GCA ACC ATT GCA ACA T	68,0
RACE-pc322-1f-3	AGG AGA CTT CCT AGC AGA GCT TGG GA	66,4
RACE-pc322f	GTT TGC GAG ATG GCC GGT TTG TTG	64,4
RACE-pc322f-2	CCA TGT CAA CCA TCC CAA CAC TGC CAA G	68,0
RACE-pc322r	CAG TGT TGG GAT GGT TGA CAT GGC CC	68,0
RACE-pc544-1f-3	CAC AAC AGC TTG CCC TCT ACT TTG TT	63,2
RACE-pc544-1r-3	TGA TCT TGT TGG CGA GGG AAG AAG CC	66,4
RACE-pc544f	GGT GGT GCA GGA GGA GGT AAA CTG TG	68,0
RACE-pc544f-2	GCA GCA AGG TGA AAT CTG AGG ACT GT	64,8
RACE-pc544r	AAC AAC TGC CAG GCA CTT GCA CCA GAT G	68,0
RACE-pc544r-2	CCT GCA CCA CCC TGC GAA AAA AAG G	66,3
RACE-pc832-4f	CTC TGG CCA GTC ATA GCA TCT TGG AGA T	66,6
RACE-pc832-4f-2	TGG AGA TGC AGC GAT CCA TCC TTC A	64,6
RACE-pc832-4r	GAT GAA GGA TGG ATC GCT GCA TCT CC	66,4
RACE-pc832-4r-2	GAT GCT ATG ACT GGC CAG AGT TAT GCT G	66,6

Tabelle 7-3: Zusammenstellung weiterer verwendeter Oligonukleotide in Petersilie.

Primername	Bemerkung	Oligosequenz (5'-3'-Richtung)	T <sub>s</sub> /T <sub>A</sub> [°C]	Zykluszahl
35S_promoterL_Xho	Transformation	ctc gag ATC TGG GCT GTC CTC TCC AAA T	68,0	
35S_promoterU_Xho	Transformation	ctc gag CCT ACT CCA AAA ATG TCA AAG AT	63,9	
35S_pRT100-F	Transformation	GCA TAT AAG AAA CCC TTA GTA TG	57,5/52	30
35S_pRT100-R	Transformation	TCT CAA TAG CCC TCT GGT C	57,3/52	30
Fl-pc25f_XhoI	Transformation	ctc gag ATG GCA CCA CCA CCA CC	67,8/50	30
Fl-pc25r_XbaI	Transformation	tct aga TTA GGC TCT CTT AGG GAG C	63,0/50	30
Fl-pc315f_XhoI	Transformation	ctc gag ATG TTA AAC CAA AAA CTC CTC CC	65,3/52	30
Fl-pc315r_XbaI	Transformation	tct aga TTC ACC GAA AAG ATG TT	55,3/52	30
Hyg_cds-f	Transformation	CGC AAG GAA TCG GTC AAT ACA CTA	61,0/52	30
Hyg_cds-r	Transformation	ACT TCT ACA CAG CCA TCG GTC CAG	64,4/52	30
HYG-F	Transformation	GAT CAT GAG CGG AGA ATT AAG	57,4/55	30
HYG-R	Transformation	AAT TCC CAT CTT GAA AGA AAT ATA G	57,6/55	30
ko-pc258-f	Transformation	CAA CAA CAA ACT AAC ACA ACC ATC	57,6/50	30
ko-pc258-r	Transformation	TGA CGT CAT CTG AGA ACA TTT T	54,7/50	30
ko-pc322-f	Transformation	GGT AAT AAG CCC ATG CCA GAG AAT	61,0/55	30
ko-pc322-r	Transformation	AGG GGG TTT TGA GGA GTG TTG AT	60,6/55	30
ko-pc36f	Transformation	AAG CTT TTA AGT TTC CAT CCA TAC	55,9/50	30
ko-pc36r	Transformation	CTT ACC TTT CAG CCG TTT AC	55,3/50	30
M13forYG		CGG GCC TCT TCG CTA TTA CG	61,4/60	30
M13revYG		CAC CCC AGG CTT TAC ACT TTA TGC	62,7/60	30
macro_rev	Für <i>Macroarrays</i>	GCC AGT GTG ATG GAT ATC TGC AGA	60,0	30
macro_for	Für <i>Macroarrays</i>	AAC GGC CGC CAG TGT GCT GGA ATT	60,0	30
NOS_promoter	Transformation	GAT ATC AAC ACT GAT AGT TTA AAC TGA AGG	61,3	
NOS_terminator	Transformation	GAT CTA GTA ACA TAG ATG ACA CC	57,1	
Nos_terminator_Kpn	Transformation	GGT ACC GAT CTA GTA ACA TAG ATG ACA CC	65,3	
Nospromoter_Kpn	Transformation	GGT ACC AAC ACT GAT AGT TTA AAC TGA AGG	64,0	
uni	enthält M13 uni (-43) von MWG	GGT TTT CCC AGT CAC GAC GTT GT	57,0/50	30
rev	enthält M13 rev (-29) von MWG	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG AC	53,0/50	30
SpelSmaIT35Sfor	35S terminator	AAT ACT AGT CCC GGG CGG CCA TGC TAG AGT	70,9/55	30
SpelT35Srev	35S terminator	AAT ACT AGT AGG TCA CTG GAT TTT GGT TTT	61,3/55	30

**Tabelle 7-4: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotide für Genotypisierungen oder RT-PCRs in *Arabidopsis thaliana*.**

Primername	Gen	Oligosequenz (5'-3'-Richtung)	T <sub>s</sub> /T <sub>A</sub> [°C]*	Zyklenzahl*
Salk_Lba	Für Salk-Linien	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G	64	
Flag_LB4	Für FLAG-Linien	GTG CCC ACG GAA TAG TTT TGG	59,8	
407D02-RP	At2g02220	TCC TCA GGG CTG TTA CCA G	58,8/50	28-30
407D02-LP	At2g02220	GAC CGG AAT CAC CTG CAA T	56,7/50	28-30
At2g02220F	At2g02220	CGA CCG GCT TTT AAT CTA CTC G	60,3/55	30
At2g02220R	At2g02220	GCA ATC TCG AGA ACC CGA AAC ATC	62,7/55	30
At2g02220R-2	At2g02220	GAC CGC AAT CAC CGG ATA ACT TC	62,4/53-57	30
At4g21390-RP-2	At4g21390	CAA CAA GAC ACC GAA GCT GT	57,3/50-52	28-30
At4g21390-LP	At4g21390	GCT GTG AAG AGA TTG TCT GG	57,3/50-52	28-30
578A06-RP	At5g41990	GCT CAT GAT CCT CAT GGG	56,0/50	28
578A06-LP	At5g41990	AAG GGA TGG AGG CAA GGA	56,7/50	28
At5g41990-RP	At5g41990	TTG CCA AGA GAC TGA GGC	56,0/52	30
At5g41990-LP	At5g41990	GGA GAG GAG CTT TCA AGA C	56,7/52	30
N539779-LP	At4g33920	GAG CTG CTC TGG AAG AAG	56,0	
N539779-RP	At4g33920	GAG TTG TCC TCA ACG GTT TC	57,3	
N635730-LP	At4g33920	CCA CCA ACT CAA CAC ACA C	56,7	
N635730-RP	At4g33920	CTA GAA GCT TCA GGT CCA CC	59,4	
234E06-RP	At1g74360	TGT CAT GTC TGG TTT TCG ACC	57,9/50	28-30
234E06-LP	At1g74360	CAG GTG AGA TTC CTG CAA G	56,7/50	28-30
At5g55090-R2	At5g55090	ATC CAA CAC AGT ACT AGG AG	55,3/56	30
At5g55090F	At5g55090	ATA GGT CGA GGC TCA ACA GC	59,4/56	30
eFla-s	At1g07920/30/40	TCA CAT CAA CAT TGT GGT CAT TGG	59,3/50	25
eFla-as	At1g07920/30/40	TTG ATC TGG TCA AGA GCC TAC AG	60,6/50	25
a-N856397	At5g25930	CCG AAG AAA ATC GGT ACT TGG TC	62,9/62	30
b-N856397	At5g25930	CTC TTC ACT GCC ACA CAT TGT CCC	66,9/62	30
b-N508584/508585	At2g02220	GGT TCG ATC CCG GTT TCT CTG	61,8/53	30
N508584/85	At2g02220	GAA CAA GAT TTG GAT GCT GTG CTC	61/53	30
N506900/533210	At2g02220	AGC TTC TTA TTT CTT CTT CTT C	52,8/50	30
b2-N506900	At2g02220	TGC CTA TCC GTT GAA CGA CAA A	58,4	
At2g39530F	At2g39530	AGT GCT CCT TCT CCT TAG GG	59,4/54	28-30
At2g39530R	At2g39530	GAG ACT GGA ACT GGT CGT TT	57,3/54	28-30
PR-1 s	At2g14610	TCG TCT TTG TAG CTC TTG TAG GTG	61/57	30
PR-1 as	At2g14610	TAG ATT CTC GTA ATC TCA GCT CT	57,1/57	30
At3g45640-R	MPK3	CGA ACT CAA AAG AGA ATG GCT T	56,5/53	30
At3g45640-F	MPK3	TAC GAT ATC TTC GGT AGT TTA TTC G	58,1/53	30
At1g51820-for	At1g51820	CCT GAT CGA AGG TGA AAC TCA TGT A	64,1/63	29
At1g51820-rev	At1g51820	AAG TGC CAA ATG TCG CAT TGG TAG G	65,8/63	29

\* Die in der Tabelle angegebenen T<sub>A</sub> und Zyklenzahlen beziehen sich auf ihre Verwendung in RT-PCR-Analysen. In der Regel wurden die Genotypisierungen bei 50 °C (T<sub>A</sub>) und 40 Zyklen durchgeführt.

## ANHANG C: SEQUENZEN UND SEQUENZVERGLEICHE DES *IMP* UND DES *AtPSKR1*

```

1 gaacatctta gccttaatca ttttcatctt actctttaa gcgtaacgat taattaacgg gaagatttat
71 ATG GCT CCA CCA CCT CCG GCA CCA CCG TCC GTT ACG TTG AGG ACA GTG CTC CTT CTC
1 M A P P P P A P P S V T L R T V L L L
128 CTT AGG GTT TTG ACC GCG GCT TTC CTC CTC ATA ACG GTG GTC CTC ATC AGC ACC AAC
20 L R V L T A A F L L I T V V L I S T N
185 ACC GTC ACT CTC GAA ATT TCA AGC ACG TCT ATC AAA TTG CCT TTC AAC GAT GTC TAT
39 T V T L E I S S T S I K L P F N D V Y
242 GCT TAT AG gtaaataaat tatttacctt ctctgtgaaa attttgtatc caatatttga ctaactattt
58 A Y R
311 ttacctattt tttgcatata tgtttgatt catcattcat gaag A TAC ATG CTG TCC GCT GCC
61 Y M L S A A
374 GTC ATC GGA CTA GTT TAC GCC GTT GTA CAA CTG TTC TTA ACA ATC TCC CAA TTT GCC
67 V I G L V Y A V V Q L F L T I S Q F A
431 ACC GGA AAA ACA CAT CCT CTT ACT TAT CAG TTC GAT TTC TAC GGT GAT AAG
86 T G K T H P L T Y Q F D F Y G D K
482 gtatttata catttttgag gaaatactat ctttaaatac attaaaatta taagtcatac tgtatattga
552 tatataacaa aatctgggtc aaatttgac ag GTA ATA TCA TAT TTA CTT GCA ACG GGT TCG
103 V I S Y L L A T G S
613 GCG GCA GGA TTT GGA GTG AGC AAA GAT TTG AAA GAC ACA TAC ATA GCA TTA ATA GAA
113 A A G F G V S K D L K D T Y I A L I E
670 TTT GAT TCG ACT GAT CCA GTG GAT AAG TTC TTT AGT AAA GGA TAT GCA TCG GCC AGT
132 F D S T D P V D K F F S K G Y A S A S
727 CTT CTT CTC TTC GCA TTC GTC TCT CTT GCC GTT TTA TCC GTT TTC TCA TCC CTT GCT
151 L L L F A F V S L A V L S V F S S L A
784 CTT TCC AAA CGA CCA GTT CCA GTC TCA TAA acacaca tatgatcatt gtaaccctac
170 L S K R P V P V S
841 attatgcttc cttcatttta atccaccaat cgtggaatth aataagatta tacgcttttt aagattcttt
911 gggtcacggt accaaatata tatattactt tgttggctac atatctcgca aggctatggt tgggagtact
981 atttct

```

**Abbildung 7.1: Genomische Sequenz des *IMP* Gens.**

Die kodierende Sequenz steht in Großbuchstaben. Die nichtkodierenden Bereiche stehen in Kleinbuchstaben. Der Ort der T-DNA-Insertion ist mit einem blauen rechteckigen Pfeil markiert. Die Lage und Sequenzen der benutzten Primer sind blau unterlegt. Die Pfeile geben jeweils die 5'-3' Leserichtung an. Die Aminosäuresequenz des Proteins *IMP* ist proportional zur Nukleotidsequenz dargestellt. Gelb unterlegt sind die möglichen Transmembrandomänen, die mit Hilfe des Programms PSORT (Version 6.4) vorausgesagt wurden.

```

At2g39530  MAPPPPAPPSVTLRTVLLLLRVLTAÄFLITVVLISNTVTLEISSTSİKLPFNDVYAYR 60
At2g39518  MAPPPSPPAVSLKVLVLLLLRVLTVGFLVIALIILSTNSVTIVSQGSALKFHFKDVIYAYR 60
*****: **:*:*.:.:*****. **:*:..:***: ** : ..:*.: *:*****

At2g39530  YMLSAAVIGLVYAVVQLFLTISQFATGKTHPLTYQFDYGDKVISYLLATGSAAGFGVSK 120
At2g39518  YMLSAAVIGLVYAVIQLFFTISEFATGVKNPFNYQLDFYGDKLISYLVATGSAAGFGVTK 120
*****:***:***:**** .:*. **:*:***:***:*****:***:*****:***:

At2g39530  DLKDTYIALIEFDSTDPVDKFFSKGYASASLLLFÄFVSLAVLSVFSSLALSİKRPVPS 178
At2g39518  DLKDTFLALVALDSTDPVDKFFSKGYASASLLLFÄFICLAVLSVFSSFAMAKRN---- 174
*****: **: :*****:*****:*****:*****:***:***:

```

**Abbildung 7.2: CLUSTAL-W Sequenzvergleich des IMP und des nächsten Verwandten At2g39518.**

Die Proteinsequenzen des IMP (At2g39530) und seines nächsten Verwandten At2g39518 wurden mit dem Programm CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) gegenübergestellt. Die (:) unter dem Alignment zeigen konservative Aminosäure-Austausche, ein (.) markiert semi-konservative Austausch und ein (\*) zeigt gleiche Aminosäuren in beiden Sequenzen an.

```

PIMP1      MTPPPTSTVPP---YVSLIVRILTLICLLISFIVIATNNQTVSTVAGDVKIKFKDFYAYR 57
Hypothetisches Protein MTEPSSSTPSP---VISLVLRLTLFISILISLIILTNNSATIVVNSTELKLRFKDVHAYR 57
IMP        MAPPPPAPPSVTLRTVLLLLRVLTAÄFLITVVLISNTVTLEISSTSİKLPFNDVYAYR 60
* : * . . . : * : * : * * : * : * : * : * . * : : * : * : * *

PIMP1      YLIATVIIGMAYTLLQIAFSISLLTTGNRIG--GEGFLLFDYGDKFISYFLVTGAAASF 115
Hypothetisches Protein YMLFÄLVVGLPYILLQIVFGIYHVSİGKRİSSSGESLLQFDYADKVMSYILXTGTGAXF 117
IMP        YMLSAAVIGLVYAVVQLFLTISQFATGKTHP----LTYQFDYGDKVISYLLATGSAAGF 116
* : : * : * : * : * : * . : * : * : * : * : * : * : * : * : *

PIMP1      GMTQDLKQL-----EGSDNYSKFLNİTSNÄÄSLCLİGFFFAVASSİFSSYNLPKRI-- 166
Hypothetisches Protein GATLDLKEVFS-----ELGSNYNKFFNKGSAÄÄSFİLFAFLFTAVSSVFSSLALPKKL-- 170
IMP        GVSKDLKDTYIALIEFDSTDPVDKFFSKGYASASLLLFÄFVSLAVLSVFSSLALSİKRPV 176
* : * * : : : . . * : * : * : * : * : * . . * : * * * : * :

PIMP1      --
Hypothetisches Protein --
IMP        VS 178

```

**Abbildung 7.3: Proteinsequenzvergleich möglicher homologer Proteine des IMP.**

Die Proteinsequenz des IMP (At2g39530) wurde mit zwei homologen Proteinen, die ebenfalls eine Domäne unbekannter Funktion (DUF 588) besitzen, mit dem Programm CLUSTAL-W (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) verglichen. PIMP1 = *pathogen-induced plasma membrane protein 1* aus *Capsicum annuum*. Das hypothetische Protein ist aus *Vitis vinifera*. Die (:) unter dem Alignment zeigen konservative Aminosäure-Austausche, ein (.) markiert semi-konservative Austausch und ein (\*) zeigt identische Aminosäuren in allen Sequenzen an.

1 tatttagaga aagactttcc taagtcaatg ttattgatta agacttcata tatgactaaa  
61 cacactcaat tataattgac aaaacacgga aaagatttgt ctataacaaa ttttccaaaa  
121 acacaaatta attcacaaaa tatttgghaaa aataatattt attcaaagct tcttatttct  
181 tcttcttctt tatttaaaga tttttactgt ttgctctgta tcagaaaaaa gaccaaacac  
241 aactcttcca ctttctatct ctctctagaa ttttgcttgc attaaaacaa caccactac  
301 ttgctgttgc gtggtgaagt caaaagtcgc cttttttctc tctcttgctt cttcatcttc  
361 attgatcatc atctaaaatg gcaataatca gaaaaccogt ttcgtatact ctcagatttc  
421 tcaagggttt ttgttgaatc ttaattcttc tctcaaagtt tcttccttta tattcttctt  
481 cttcttcctc tgttcttgaa ATGCGTGTTT ATCGTTTTTTG TGTGATCGTC ATCTTCCTCA  
541 CAGAGTTACT ATGTTTCTTC TATTCCTCGG AATCTCAGAC CACCTCCAGG TGCCATCCAC  
601 ATGACCTCGA AGCCTTACGT GACTTCATAG CACATCTCGA ACCAAAACCA GATGGTTGGA  
661 TCAATTCTTC TTCTTCTACA GACTGCTGCA ACTGGACCGG AATCACCTGC AATTCAAAACA  
721 ACACCGGAAG AGTTATTAGA TTGGAGCTTG GGAACAAAAA GCTGTCGGGG AAGTTGTCTG  
781 AATCTCTCGG GAAGCTAGAT GAGATTAGGG TTCTTAATCT CTCTCGAAAC TTCATCAAAG  
841 ATTTCGATCCC TCTTTCGATT TTCAACTTGA AGAATCTACA AACTCTTGAT TTGAGCTCTA  
901 ATGATCTCTC CGGCGGAATC CCAACAAGTA TAAATCTCCC AGCTCTGCAA AGTTTTGATC  
961 TTTCTTCAA TAAATTCAAT GGGTCGCTTC CGTCTCATAT CTGCCATAAC TCTACTCAAA  
1021 TTAGGGTTGT GAAACTTGCG GTGAACTACT TCGCCGAAA CTTCACTTCC GGGTTTGGGA  
1081 AATGTGTCTT GCTTGAGCAT CTCTGTCTTG GTATGAACGA TCTTA CTGGT AACATCCCTG  
1141 AGGA TTTGTT TCATCTCAA AGATTGAATC TTTTAGGGAT TCAAGAGAAT CGTCTCTCTG  
1201 GTTCGTTGAG TCGTGAGATT AGGAATCTCT CAAGTCTTGT TCGTCTTGAT GTTTCTTGGA  
1261 ATTTGTTTTT CGGTGAAATC CCTGATGTGT TCGACGAATT GCCTCAGTTA AAGTTTTTCT  
1321 TAGGTCAGAC CAATGGATTC ATTTGGAGGAA TACCTAAATC GTTGGCGAAT TCACCGAGTT  
1381 TGAATCTGCT TAACTTGAGG AACAAATCTT TATCGGGTCG TTTGATGTTG AATTGTACGG  
1441 CGATGATTGC TTTGAACTCT CTTGATTTAG GTACCAATAG ATTCAATGGG AGGTTACCTG  
1501 AGAATCTACC GGATTGCAAG CGGTTAAAGA ACGTTAACCT CGCGAGGAAC ACCTTCCATG  
1561 GACAAGTACC AGAGAGTTTC AAGAACTTCG AGAGCTTATC TTAATTCTCG TTATCGAATT  
1621 CGAGTTTGGC TAATATCTCT TCAGCGCTTG GGATACTTCA GCATTGCAAG AACTTGACGA  
1681 CTTTGTTTCT TACATTGAAT TTCCATGGAG AGGCTTTACC CGATGATTCA AGTCTTCATT  
1741 TCGAGAAGCT TAAGGTGCTT GTAGTGGCGA ATTGTAGGCT TACTGGTTCG ATGCCGAGGT  
1801 GGTTAAGCTC GAGTAATGAA CTTCAGTTGT TGGATCTTTC TTGGAACCGT TTAACCGGCG  
1861 CTATCCCGAG CTGGATTGGT GACTTCAAGG CTCTGTTCTA CTTGGATTTA TCTAACAAC  
1921 CGTTTACAGG AGAGATCCCT AAGAGCTTAA CTAAGTTAGA GAGTCTCACT AGCCGTAATA  
1981 TCTCAGTCAA TGAGCCATCT CCTGATTTCC CGTTCTTTAT GAAAAGAAAC GAGAGCGCGA  
2041 GAGCGTTGCA ATACAATCAG ATTTTCGGGT TCCCGCCAAC GATTGAGCTT GGTCATAACA  
2101 ATCTCTCTGG ACCTATTTGG GAGGAGTTTG GTAATCTGAA GAAGCTTCAT GTGTTTGATT  
2161 TGAAATGGAA TGCATTATCT GGATCAATAC CTAGCTCGCT TTCTGGTATG ACGAGCTTGG  
2221 AAGCTCTTGA TCTCTCTAAT AACCGTCTTT CGGGTTCGAT CCCGGTTTCT CTGCAACAGC  
2281 TCTCGTTTCT GTCGAAGTTC AGTGTGCTT ATAACAATCT CTCGGGAGTA ATACCTTCCG  
2341 GTGGTCAGTT TCAGACGTTT CCAAACCTCGA GCTTTGAGAG TAACCATCTC TGCGGGGAAC  
2401 ACAGATTCCC CTGTTCTGAA GGTACTGAGA GTGCATTGAT CAAACGGTCA AGAAGAAGCA

```

2461 GAGGAGGTGA CATTGGAATG GCGATTGGGA TAGCGTTTGG TTCGGTTTTT CTTTTGACTC
2521 TTCTCTCGTT GATTGTGTTG CGTGCTCGTA GACGGTCAGG AGAAGTTGAT CCGGAGATAG
2581 AAGAATCCGA GAGCATGAAT CGTAAAGAAC TCGGAGAGAT TGGATCTAAG CTTGTGGTTTT
2641 TGTTTCAGAG CAATGATAAA GAGCTCTCTT ATGATGACCT TTTGGACTCA ACAAATAGTT
2701 TTGATCAAGC TAACATCATT GGCTGTGGCG GGTTTGGTAT GGTTTACAAA GCAACGTTAC
2761 CAGACGGTAA GAAAGTTGCG ATCAAGAAGT TATCCGGTGA TTGCGTCAA ATCGAAAGAG
2821 AATTCGAAGC AGAAGTTGAA ACACTCTCAA GAGCACAGCA TCCAAATCTT GTTCTTCTCC
2881 GAGGATTCTG TTTCTACAAA AACGACCGGC TTTTAATCTA CTCGTATATG GAAAACGGAA
2941 GCTTAGACTA TTGGCTACAC GAGCGTAAACG ACGGTCCAGC GTTGTGAAG TGGAAAACAC
3001 GTCTTAGAAT CGCTCAAGGT GCTGCAAAAAG GGTTACTTTA CTTGCATGAA GGGTGTGATC
3061 CTCATATCTT ACACCGCGAT ATTAAATCGA GTAATATTCT TCTCGACGAG AATTTCAACT
3121 CTCATTTAGC GGATTTTCGGA CTCGCAAGGC TGATGAGTCC TTACGAGACG CATGTAAGTA
3181 CTGATTTGGT TGGAACCTTTA GGTTACATTC CTCCGGAATA CGGGCAAGCT TCGGTTGCTA
3241 CTTACAAAGG CGATGTGTAT AGTTTCGGAG TTGTGCTTCT CGAGCTTTTA ACCGATAAAA
3301 GACCGGTGGA TATGTGTAAG CCGAAAGGGT GTAGGGATCT GATCTCGTGG GTCGTCAAGA
3361 TGAAGCATGA GAGTCGAGCA AGCGAGGTTT TCGATCCGTT AATATACAGT AAAGAGAATG
3421 ATAAAGAGAT GTTTCGGGTT CTCGAGATTG CTGTGTTATG TTTAAGCGAA AACCCGAAAC
3481 AGAGGCCAAC GACTCAACAG TTAGTCTCTT GGCTTGATGA TGCTAGaag aaagaggaaac
3541 aatatcagag acactatgat acattttgta gggagtgatt ttcatacttt tgagatacaa
3601 tgtaaataagt tttcagataa taatttgttt cttcgttttc ttcttccatt ttttttatct
3661 cagtttatga ttcagattca gacattaaag atactagaca gaacatatac tgtctcagaa
3721 aatgaaaaa tctttttgta gtgtttcaga aataatgagt tcttgaaaaa acatgtctca
3781 agcaatttaa atgagcaaca tagattaata atttgtgta catctttatt ctgtgatttg
3841 ctttgtggat actctgttga ttatgttata ctttttagag atttttggtt taattaaana
3901 atatatatat ttggtagcta aattcctttt ggtcttcaac aaaagaattc cttttggcca
3961 actatagtca attttttggt aagaatccat tacattaact tattttttat ggggtgtgaaa
4021 atattgt

```

Legende:

T-DNA-Insertionen

 N506900 (*pskr1-2*)  N508584  N508585 (*pskr1-3*)  FLAG\_407D02 (*pskr1-4*)

Primer

-  T-DNA-Verifizierungsprimer (N506900/533210 und a-N506900/N53321)
-  T-DNA-Verifizierungs- und RT-PCR-Primer (b-N508584/N50858 und N508584/85, Kombination 1)
-  T-DNA-Verifizierungs- und RT-PCR-Primer (407D02-LP und 407D02-RP, Kombination 4)
-  RT-PCR-Primer (At2g02220F und At2g02220R, Kombination 3)
-  RT-PCR-Primer (b-N508584/N50858 und At2g02220R-2, Kombination 2)

**Abbildung 7.4: Genomische Sequenz des *AtPSKR1* Gens.**

Die kodierende Sequenz steht in Großbuchstaben. Die nichtkodierenden Bereiche stehen in Kleinbuchstaben. Die Orte der T-DNA-Insertionen sind durch farbige rechteckige Pfeile markiert. Die Lage und Sequenzen der benutzten Primer sind den T-DNA-Insertionen entsprechend farbig unterlegt. Die Pfeile geben jeweils die 5'-3' Leserichtung an. Die in der Legende angegebenen Kombinationen entsprechen denen in Abbildung 3.22.

	1
Signalpeptid	MRVHRFCVIVIFLTELLECFYSSSES
	26
N-Terminus	QTTSRCHPHDLEALRDFIAHLEPKP DGWINSSSTD <b>CC</b> NWTGIT <b>C</b> NSNNTGR
	78
LRR-Domäne (1-17)	VIRLELGNKKLSCKLSESLGKIDE IRVNLNLSRNFIKDSTPLSTFNLKN LQTLDLSSNDLSSGGIPTSLNLP LQSFDLSSNKFNGSLPSHICHNSTQ IRVVKLAVNYFAGNFTSGFGKCVL LEHLCLGMNDLTGNIPEDFHLKR LNLLGIQENRLSGLSREIRNLSS LVRLDVSWNLFSGEIPDVFDEL PQ LKFFLGQTNGFIGGIPKSLANSPS LNLLNLRNNSLSGRLMLNCTAMIA LNSLDLGTNRFNRLPENTPDCR LKNVNLARNTFHGQVPESEFKNFES LSYFSLSNSSLANISSALGILQHCKN LTTLVLTNLFHGEALPDDSSLHF EK LKVLVVANCRLTGSMRWLSSSNE LQLLDLSWNRLTGATPSWIGDFKA LFYLDLSNNSFTGEIPKSLTKLESLS 492
Inseldomäne	RNISVNEPSPDFPFFMKRNESARALQYNQIFGFPPPT
	528
LRR-Domäne (18-21)	IELGHNNLSGPTWEEFGNLKK LHVFDLKNALSGSIPSSSGMTS LEALDLSNNRLSGSIPVSLQQLSF LSKFVAYNNLSGVIPSGGQFQT  LxxLxxNxxSxxExxxLxx
	620
Juxtamembran, extrazellulär	FPNSSFESNHL <b>CC</b> GEHRFP <b>C</b> SEGTESALI
	648
Transmembrandomäne	<b>KRSRRSRGGD</b> IGMAIGIAFGSVFLLTLLSLIVLRARRR
	686
Juxtamembran, intrazellulär	SGEVDPEIEESESMNRKELGEIGSKLVVLFQSNDELSYDDL DSTNSF
	734
Ser/Thr Proteinkinase- domäne	DQANIIGCGGFGMVYKATLPDGKKVAIKKLSGDCGQIEREF EAE TLSRAQHPNLVLLRGFCFYKNDRLLIYSYMENGLDYWLHERND GPALLKWKTRLRIAQGAAGLLYLHEGCDPHILHRDIKSSNILL DENFNHLADFGRLARLMSPYETHVSTDVGTGLGYIPPEYQASV ATYKGDVYSFGVLELLTDKRPVDMCKPKGCRDLISWVVKMKH ESRASEVFDPLIYSKENDKEMFRVLEIACLCLSENPKQRPTTQQ LVSWL
	1006
C-Terminus	DDV*

### Abbildung 7.5: *AtPSKR1* kodiert eine LRR-Rezeptorkinase.

Die Primärstruktur des *AtPSKR1* Proteins ist unterteilt in das vorausgesagte Signalpeptid; die N-terminale Domäne, die die gepaarten Cys-Reste (schwarze Rechtecke, die durch eine Linie miteinander verbunden sind) enthält; die LRR-Domäne mit AS, die entsprechend der LRR-Konsensussequenz (eingerahmt) farbig markiert sind; die extrazelluläre Juxtamembran mit gepaarten Cys-Resten (schwarze Rechtecke, die durch eine Linie miteinander verbunden sind); die Transmembrandomäne mit hydrophoben AS (grau unterlegt), die von basischen AS (fett) eingeschlossen sind; die intrazelluläre Juxtamembran mit dem putativen Endozytosemotiv YXXØ (unterstrichen); die Ser/Thr Kinasedomäne und das C-terminale Ende. Die T-DNA-Insertionsstellen sind durch eine gelbe senkrechte Linie in der 3. LRR und eine rotbraune senkrechte Linie in der Kinasedomäne gekennzeichnet.

## ANHANG D: TABELLEN

Tabelle 7-5: Liste aller cDNA-AFLP-Klone.

Nr.	Fragment	Lang Beschreibung [bp]	Organismus	AgI Code/ Accession#	BlastX	GO-Biologischer Prozess
2	PC1-2	260 putative RNA helicase (see 473-2)	Oryza sativa	AAO72375	14/33	-
3	PC1-3	262 ATP binding / ATP-dependent helicase	Arabidopsis thaliana	At3g18600	31/78	-
4	PC2-1	155 polyprotein	Potato virus Y	ABC70481	14/33	-
5	PC2-2	156 polyprotein	Potato virus Y	ABC70481	14/33	-
9	PC3H-2	143 peroxidase precursor (see 113-2)	Petroselinum crispum	AAA98491	19/25	response to oxidative stress
14	PC4-3	116 structural constituent of ribosome (see 182-4)	Arabidopsis thaliana	At1g15250	30/36	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
15	PC5-1	81 putative senescence-associated protein	Pisum sativum	BAB33421	26/26	-
16	PC5-2	81 putative senescence-associated protein	Pisum sativum	BAB33421	26/26	-
19	PC6	394 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g01740	26/70	biological_process unknown
20	PC8	139 unknown protein (see 10)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	16/29	biological_process unknown
21	PC9-1	123 HSP70; ATP binding (see 21-1)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
22	PC9-2	123 HSP70; ATP binding (see 21-1)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
23	PC9-3	123 HSP70; ATP binding (see 21-1)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
24	PC9-4	123 HSP70; ATP binding (see 21-1)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
25	PC10-1	141 integral membrane protein (see 25)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
26	PC10-2	141 integral membrane protein (see 25)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
27	PC10-4	141 integral membrane protein (see 25)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
28	PC10-3	123 HSP70; ATP binding (see 21-1)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
33	PC12	102 transferase, transferring glycosyl groups (see 43-3)	Arabidopsis thaliana	At1g05170	18/20	protein amino acid glycosylation
42	PC15-1	67 ADLID; GTP binding / GTPase	Arabidopsis thaliana	At2g44590	19/21	biological_process unknown
43	PC15-2	76 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g55840	12/22	biological_process unknown
44	PC15-3	76 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g55840	14/21	biological_process unknown
50	PC17-3	118 catalytic/ protein phosphatase type 2C	Arabidopsis thaliana	At1g79630	14/18	N-terminal protein myristoylation
52	PC20-3	141 integral membrane protein (see 10)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
53	PC20-4	177 integral membrane protein (see 8)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	18/32	biological_process unknown
54	PC21-1	123 HSP70; ATP binding (see 9)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
55	PC21-2	123 HSP70; ATP binding (see 9)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
56	PC21-3	123 HSP70; ATP binding (see 9)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
57	PC21-4	123 HSP70; ATP binding (see 34)	Arabidopsis thaliana	At3g12580	39/40	protein folding; response to heat; response to virus
59	PC23-2	253 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g31410	56/79	-
60	PC23-3	253 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g31410	56/79	-
62	PC24-1	156 down syndrome cell adhesion molecule	Aedes aegypti	EAT37388	15/41	-
63	PC24-2	156 down syndrome cell adhesion molecule	Aedes aegypti	EAT37388	15/41	-
65	PC24-4	158 structural constituent of ribosome	Arabidopsis thaliana	At5g20290	44/51	protein biosynthesis ; ribosome biogenesis
66	PC25-1	141 integral membrane protein (see 20)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
67	PC25-2	141 integral membrane protein (see 20)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
68	PC25-3	141 integral membrane protein (see 20)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
69	PC25-4	141 integral membrane protein (see 20)	Arabidopsis thaliana	At2g39530	17/31	biological_process unknown
77	PC27-4	123 transferase, transferring glycosyl groups	Arabidopsis thaliana	At5g41460	32/40	biological_process unknown
78	PC28-1	103 ATMRP5	Arabidopsis thaliana	At1g04120	31/34	transport
82	PC29-2	86 aspartic-type endopeptidase/ pepsin A	Arabidopsis thaliana	At3g51340	15/23	proteolysis
83	PC29-3	85 aspartic-type endopeptidase/ pepsin A	Arabidopsis thaliana	At3g51340	16/28	proteolysis
101	PC34	155 HSP70; ATP binding	Arabidopsis thaliana	At3g12580	18/19	protein folding; response to heat; response to virus
106	PC36-1	114 putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	Arabidopsis thaliana	At1g14390	18/36	protein amino acid phosphorylation
107	PC36-4	114 putative leucine-rich repeat transmembrane protein kinase	Arabidopsis thaliana	At1g14390	18/36	protein amino acid phosphorylation
108	PC36-2	111 phosphoinositide 5-phosphatase	Arabidopsis thaliana	At3g43220	25/36	biological_process unknown
109	PC36-3	111 nucleotide binding	Arabidopsis thaliana	At4g01860	18/35	biological_process unknown
114	PC38-1	59 oxidoreductase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At3g56460	16/19	-
133	PC43-3	101 transferase, transferring glycosyl groups (see 12)	Arabidopsis thaliana	At1g05170	28/31	protein amino acid glycosylation
136	PC44-2	120 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At4g01400	20/36	biological_process unknown
137	PC44-3	111 phosphoinositide 5-phosphatase (see 36-2)	Arabidopsis thaliana	At3g43220	25/36	biological_process unknown
138	PC44-4	111 phosphoinositide 5-phosphatase (see 36-2)	Arabidopsis thaliana	At3g43220	25/36	biological_process unknown
139	PC45-1	104 amino acid permease	Arabidopsis thaliana	At3g03090	26/34	amino acid transport
149	PC48-1	111 catalytic/ epoxide hydrolase/ hydrolase	Arabidopsis thaliana	At4g02340	21/36	aromatic compound metabolism
150	PC48-2	111 catalytic/ epoxide hydrolase/ hydrolase	Arabidopsis thaliana	At4g02340	21/36	aromatic compound metabolism
151	PC48-3	111 catalytic/ epoxide hydrolase/ hydrolase	Arabidopsis thaliana	At4g02340	21/36	aromatic compound metabolism
152	PC48-4	111 catalytic/ epoxide hydrolase/ hydrolase	Arabidopsis thaliana	At4g02340	21/36	aromatic compound metabolism
156	PC49-4	102 unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g54190	31/33	biological_process unknown
177	PC55-1	196 pectinesterase	Arabidopsis thaliana	At2g47550	28/44	cell wall modification
178	PC55-2	155 ATP binding / casein kinase I	Arabidopsis thaliana	At5g44100	50/51	protein amino acid phosphorylation
179	PC55-3	155 ATP binding / casein kinase I	Arabidopsis thaliana	At5g44100	50/51	protein amino acid phosphorylation
180	PC55-4	196 pectinesterase	Arabidopsis thaliana	At2g47550	28/44	cell wall modification
184	PC56-3	179 oxidoreductase	Arabidopsis thaliana	At1g59960	24/51	-
185	PC57-1	137 iron ion binding / lipoxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g72520	24/50	defense response, jasmonic acid biosynthesis
187	PC57-3	137 iron ion binding / lipoxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g72520	24/50	defense response, jasmonic acid biosynthesis
188	PC57-4	137 iron ion binding / lipoxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g72520	24/50	defense response, jasmonic acid biosynthesis
197	PC60-1	51 structural constituent of ribosome (see 95-4)	Arabidopsis thaliana	At1g67430	16/16	protein biosynthesis
198	PC60-2	51 structural constituent of ribosome (see 95-4)	Arabidopsis thaliana	At1g67430	16/16	protein biosynthesis
200	PC60-4	51 structural constituent of ribosome (see 95-4)	Arabidopsis thaliana	At1g67430	16/16	protein biosynthesis
216	PC64-4	250 similar to hydrocephalus-inducing protein	Rattus norvegicus	XP_226468	25/77	-
218	PC65-2	203 GTP cyclohydrolase I	Arabidopsis thaliana	At3g07270	20/23	biosynthesis
220	PC65-4	116 unknown protein O-linked GlcNAc transferase like protein	Arabidopsis thaliana	At3g04830	32/38	biological_process unknown
230	PC68-2	94 protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At2g17220	25/31	protein amino acid phosphorylation
231	PC68-3	94 protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At2g17220	26/31	protein amino acid phosphorylation
232	PC68-4	94 protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At2g17220	26/31	protein amino acid phosphorylation
233	PC69-1	106 similar to UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog	Strongylocentrotus p.	XP_795243	14/25	-
234	PC69-2	179 putative gag-pol polyprotein	Solanum demissum	AA138758	36/57	DNA integration
235	PC69-3	179 putative gag-pol polyprotein	Solanum demissum	AA138758	36/57	DNA integration
237	PC70-1	148 ATP binding / microtubule motor	Arabidopsis thaliana	At3g49650	16/22	microtubule-based movement
238	PC70-2	190 calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At5g28900	42/46	biological_process unknown

239	PC70-3	142	cysteine protease (see 131-4)	Vigna mungo	BAA92495	15/17	proteolysis
240	PC70-4	146	calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At5g61790	30/37	-
242	PC71-2	135	transferase/ transferase, transferring glycosyl groups	Arabidopsis thaliana	At4g02500	22/34	biological process unknown
244	PC71-4	116	transferase, transferring glycosyl groups	Arabidopsis thaliana	At1g53290	29/38	protein amino acid glycosylation
249	PC74-2	79	POP2 (POLLEN-PISTIL INCOMPATIBILITY 2)	Arabidopsis thaliana	At3g22200	19/22	biotin biosynthesis; pollen tube adhesion
255	PC76-1	140	endoxylglucantransferase	Daucus carota	AF349963	23/27	carbohydrate metabolism, glucan metabolism
256	PC76-2	140	endoxylglucantransferase	Daucus carota	AF349963	23/27	carbohydrate metabolism, glucan metabolism
258	PC76-4	140	endoxylglucantransferase	Daucus carota	AF349963	23/27	carbohydrate metabolism, glucan metabolism
271	PC80-1	140	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g61620	15/17	protein ubiquitination
273	PC80-3	140	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g61620	15/17	protein ubiquitination
274	PC80-4	140	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g61620	15/17	protein ubiquitination
291	PC85-1	55	RHM1 (see 86-3)	Arabidopsis thaliana	At1g78570	14/17	nucleotide-sugar metabolism
293	PC85-3	134	antiporter/ drug transporter (see pc87-1)	Arabidopsis thaliana	At5g10420	34/44	multidrug transport, ripening
294	PC85-4	109	serine rich protein	Arachis hypogaea	ABH09320	20/25	-
296	PC86-2	132	ATP binding/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	Arabidopsis thaliana	At1g67120	13/17	-
297	PC86-3	55	RHM1 (see 85-1)	Arabidopsis thaliana	At1g78570	14/17	nucleotide-sugar metabolism
298	PC86-4	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	42/56	-
299	PC87-1	136	antiporter/ drug transporter (see pc85-3)	Arabidopsis thaliana	At5g10420	23/30	multidrug transport, ripening
300	PC87-2	136	CIPK17 (CBL-interacting protein kinase 17)	Arabidopsis thaliana	At1g48260	14/19	protein amino acid phosphorylation; signal transduction
303	PC88-1-1	161	ATGLR2.8 (see 252-1)	Arabidopsis thaliana	At2g29110	25/52	calcium ion homeostasis; response to light stimulus
304	PC88-1-2	275	transferase	Arabidopsis thaliana	At5g07860	48/91	biological process unknown
307	PC88-2-1	343	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At4g24310	38/61	biological process unknown
314	PC89-1-2	299	structural constituent of ribosome (see 100-2-1)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	51/61	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
316	PC89-3-1	178	ATEXPB2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B2)	Arabidopsis thaliana	At1g65680	34/53	cell wall modification during multidimensional cell growth
318	PC90-1	159	ATGLR2.8 (see 88-1-1)	Arabidopsis thaliana	At2g29110	21/47	calcium ion homeostasis; response to light stimulus
319	PC90-2	206	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Arabidopsis thaliana	At2g21130	47/56	protein folding
320	PC90-3	206	hydrolase (see 92-2)	Arabidopsis thaliana	At2g01670	42/68	biological process unknown
323	PC91-3	178	ATEXPB2 (ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN B2)	Arabidopsis thaliana	At1g65680	35/56	cell wall modification during multidimensional cell growth
325	PC92-1	160	ATGLR2.8 (see 88-1-1)	Arabidopsis thaliana	At2g29110	21/47	calcium ion homeostasis; response to light stimulus
326	PC92-2	206	hydrolase (see 90-3)	Arabidopsis thaliana	At2g01670	42/68	biological process unknown
338	PC95-4	51	structural constituent of ribosome (see 60-1)	Arabidopsis thaliana	At1g67430	16/16	protein biosynthesis
339	PC96-1	48	transcription factor (see 545-1-4)	Arabidopsis thaliana	At2g40140	13/15	regulation of transcription
347	PC100-1-1	298	ATGCH	Arabidopsis thaliana	At5g64300	75/87	riboflavin biosynthesis
348	PC100-1-2	299	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g20940	14/17	biological process unknown
349	PC100-1-3	289	structural constituent of ribosome	Arabidopsis thaliana	At2g47610	27/28	protein biosynthesis [pmid 11598216]
351	PC100-2-1	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
352	PC100-2-2	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
354	PC100-2-4	134	hypothetical protein PdenDRAFT_2922 (see 623-4)	Paracoccus denitrificans	ZP_00630617	27/34	-
355	PC102-1	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
356	PC102-2	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
357	PC102-3	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
358	PC102-4	181	structural constituent of ribosome (see 89-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74270	50/60	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
363	PC107-1-1	295	trans-cinnamate 4 monoxygenase (C4H)	Petroselinum crispum	Q43033	95/98	Lignin biosynthesis; Phenylpropanoid metabolism
364	PC107-1-2	165	cyclophilin (see 670-2-3)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
365	PC107-1-3	287	NHL25 (NDR1/HIN1-LIKE 25)	Arabidopsis thaliana	At5g36970	35/62	defense response to pathogen
366	PC107-1-4	292	peroxidase (see 108-1-2)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/62	response to oxidative stress
367	PC107-2-1	165	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
368	PC107-2-2	164	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
369	PC107-2-3	161	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
370	PC107-2-4	165	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
371	PC108-1-1	165	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
372	PC108-1-2	291	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/79	response to oxidative stress
373	PC108-1-4	291	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	48/79	response to oxidative stress
375	PC108-2-1	164	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
376	PC108-2-2	164	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
377	PC108-2-3	135	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
378	PC108-2-4	164	cyclophilin (see 107-1-2)	Euphorbia esula	AAF65770	50/52	protein folding
379	PC110-1	?	polyubiquitin	Zea mays	AA21993	39/48	protein modification
380	PC110-2	297	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	21/56	response to oxidative stress
381	PC110-3	275	conserved hypothetical protein	Medicago truncatula	ABE80754	23/59	-
382	PC110-4	143	cytochrome P450 71D8	Glycine max	CAA71517	22/32	Secondary metabolites biosynthesis, transport & catabolism
383	PC113-1	339	ribose-5-phosphate isomerase	Arabidopsis thaliana	At3g04790	21/25	5-phosphoribose 1-diphosphate biosynthesis
384	PC113-2	381	anionic peroxidase (see 535-1)	Petroselinum crispum	AAA98491	88/89	response to oxidative stress
385	PC113-3	/	anionic peroxidase (see 535-1)	Petroselinum crispum	AAA98491	88/89	response to oxidative stress
386	PC113-4	384	cysteine-type endopeptidase/ cysteine-type peptidase	Arabidopsis thaliana	At1g02305	21/25	proteolysis
387	PC114-1	328	AALP	Arabidopsis thaliana	At5g60360	37/52	proteolysis
388	PC114-2	314	putative Ac transposase	Arabidopsis thaliana	AAF19546	51/103	-
389	PC114-3	180	cytochrome P450 (CYP94A1)	Vicia sativa	AAD10204	43/59	Secondary metabolites biosynthesis, transport & catabolism
390	PC114-4	313	hydrolase/ protein serine/threonine phosphatase	Arabidopsis thaliana	At1g13750	52/66	biological process unknown
391	PC115-1	297	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g35690	34/62	-
392	PC115-2	297	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g35690	34/62	-
394	PC115-3	297	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	34/64	electron transport
395	PC116-1	288	similar to vacuolar ATP-synthase subunit B isoform	Arabidopsis thaliana	At4g38510	42/42	ATP biosynthesis, ATP synthesis coupled proton transport
398	PC116-3	292	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/79	response to oxidative stress
399	PC117-1	223	structural constituent of ribosome	Arabidopsis thaliana	At5g62300	33/34	protein biosynthesis
401	PC117-3	218	Os01g0790200 (ev. see 408-2)	Oryza sativa	BAF06404	16/16	-
402	PC117-4	219	UBP16 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 16)	Arabidopsis thaliana	At4g24560	27/43	ubiquitin-dependent protein catabolism
411	PC120-1	187	60S acidic ribosomal protein PO	Euphorbia esula	AF227622	45/61	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
414	PC120-4	286	RNA binding/ structural constituent of ribosome	Arabidopsis thaliana	At5g20160	60/63	protein biosynthesis; ribosome biogenesis and assembly
415	PC121-1	91	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein ELI7.1 (see 256-4)	Petroselinum crispum	AAG24521	24/24	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
416	PC121-4	91	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein ELI7.1 (see 256-4)	Petroselinum crispum	AAG24521	24/24	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
417	PC121-9	90	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Arabidopsis thaliana	At2g21130	27/29	protein folding
419	PC125-1	281	kinase/ ribokinase	Arabidopsis thaliana	At5g51830	52/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism
420	PC125-2	281	kinase/ ribokinase	Arabidopsis thaliana	At5g51830	52/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism

421	PC125-3	281	kinase/ ribokinase	Arabidopsis thaliana	At5g51830	52/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism
422	PC125-4	281	kinase/ ribokinase	Arabidopsis thaliana	At5g51830	52/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism
423	PC126-1	292	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	47/78	response to oxidative stress
424	PC126-2	281	kinase/ ribokinase (see 125)	Arabidopsis thaliana	At5g51830	51/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism
425	PC126-3	280	kinase/ ribokinase (see 125)	Arabidopsis thaliana	At5g51830	51/72	acetate fermentation; sucrose biosynthesis; sucrose catabolism
426	PC126-4	292	S1 self-incompatibility locus-linked pollen 3.15 protein	Petunia inflata	AAQ09997	15/33	-
427	PC129-1	264	protein AX1108-carrot (embryogenesis-associated protein)	Daucus carota	BAA03455	59/87	electron transport; metabolism
428	PC129-2	289	PREDICTED: similar to CG30266-PA isoform 2	Apis mellifera	XP_623643	21/77	-
431	PC130-1	279	copper ion binding	Arabidopsis thaliana	At2g40370	21/49	-
434	PC131-1	218	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g48110	49/71	biological process unknown
435	PC131-2	175	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g51570	55/58	N-terminal protein myristoylation [pmid 12912986]
436	PC131-3	216	subtilisin-like protease C1 (see 235)	Glycine max	AAD02075	29/50	negative regulation of enzyme activity; proteolysis
437	PC131-4	168	Cysteine protease (see 70-3)	Vigna mungo	BAA92495	15/17	proteolysis
439	PC132-2	97	anionic peroxidase, putative	Arabidopsis thaliana	At1g14540	13/20	response to oxidative stress
442	PC133-1	46	omega-3 fatty acid desaturase (see 764-1)	Petroselinum crispum	AAB72241	15/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
443	PC133-2	46	omega-3 fatty acid desaturase (see 764-1)	Petroselinum crispum	AAB72241	15/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
445	PC133-4	46	omega-3 fatty acid desaturase (see 764-1)	Petroselinum crispum	AAB72241	15/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
447	PC134-2	92	sucrose synthase isoform I	Daucus carota	CAA76056	23/24	-
448	PC134-3	93	ATTIM44-2	Arabidopsis thaliana	At2g36110	16/28	protein targeting to mitochondrion
449	PC134-4	65	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g57420	18/21	-
454	PC137-1	291	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	29/44	response to oxidative stress
455	PC137-3	291	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	32/51	response to oxidative stress
456	PC137-4	292	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/79	response to oxidative stress
457	PC137-2	288	ATBPM1	Arabidopsis thaliana	At5g19000	46/68	biological process unknown
458	PC138-1	283	RSZ33 (see 139-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	65/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
459	PC138-2	97	unknown protein (see 139-2)	Arabidopsis thaliana	At2g27660	16/30	-
460	PC138-3	283	RSZ33 (see 139-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	71/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
461	PC138-4	283	RSZ33 (see 139-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	71/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
462	PC139-1	283	RSZ33 (see 138-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	72/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
463	PC139-2	97	unknown protein (see 138-2)	Arabidopsis thaliana	At2g27660	16/30	-
464	PC139-3	217	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At3g04690	28/65	protein amino acid phosphorylation
466	PC140-1	283	RSZ33 (see 139-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	72/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
467	PC140-2	282	RSZ33 (see 139-1)	Arabidopsis thaliana	At2g37340	72/94	nuclear mRNA splicing, via spliceosome; spliceosome assembly
468	PC140-3	274	pathogenesis-related protein PR1-3 (PR1)	Petroselinum crispum	P19418	63/71	defense response
469	PC140-4	97	unknown protein (see 138-2)	Arabidopsis thaliana	At2g27660	16/30	-
470	PC141-1	168	PREDICTED: similar to otogelin; MLEMP	Danio rerio	XP_688432	14/45	-
471	PC141-2	165	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g11090	38/51	biological process unknown
472	PC141-3	165	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g11090	38/51	biological process unknown
473	PC141-4	165	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g11090	38/51	biological process unknown
474	PC142-1	93	calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g09210	26/30	-
475	PC142-3	93	calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g09210	26/30	-
476	PC142-2	87	LRX2 (LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 2)	Arabidopsis thaliana	At1g62440	20/28	cellular morphogenesis during differentiation
477	PC142-4	87	LRX2 (LEUCINE-RICH REPEAT/EXTENSIN 2)	Arabidopsis thaliana	At1g62440	20/28	cellular morphogenesis during differentiation
480	PC143-3	454	(+)-pulegone reductase	Mentha x piperita	AAQ75423	29/58	-
481	PC144-1	293	oxidoreductase (see 145-3)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	55/82	metabolism
482	PC144-2	293	oxidoreductase (see 145-3)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	55/82	metabolism
483	PC144-3	292	oxidoreductase (see 596-1)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	55/82	metabolism
485	PC145-1	292	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/79	response to oxidative stress
486	PC145-4	292	peroxidase (see 107-1-4)	Arabidopsis thaliana	At5g05340	49/79	response to oxidative stress
487	PC145-2	310	FLA9 (fascilin-like arabinogalactan-protein 9)	Arabidopsis thaliana	At1g03870	59/101	cell adhesion
488	PC145-3	377	oxidoreductase (see 144-1)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	35/50	metabolism
489	PC146-1	293	oxidoreductase (see 144-1)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	55/85	metabolism
490	PC146-2	293	oxidoreductase (see 144-1)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	56/85	metabolism
492	PC146-4	293	oxidoreductase (see 144-1)	Arabidopsis thaliana	At5g06060	56/85	metabolism
493	PC147-1	154	ATP binding	Arabidopsis thaliana	At5g48620	21/42	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
494	PC147-2	153	ATP binding	Arabidopsis thaliana	At5g48620	21/42	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
495	PC147-3	153	ATP binding	Arabidopsis thaliana	At5g48620	21/42	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
496	PC147-4	153	ATP binding	Arabidopsis thaliana	At5g48620	23/43	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
497	PC148-1	153	ATP binding (see 147)	Arabidopsis thaliana	At5g48620	22/43	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
498	PC148-2	153	ATP binding (see 147)	Arabidopsis thaliana	At5g48620	23/43	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
499	PC148-3	153	ATP binding (see 147)	Arabidopsis thaliana	At5g48620	23/43	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
500	PC148-4	153	ATP binding (see 147)	Arabidopsis thaliana	At5g48620	23/43	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
501	PC149-1	417	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At1g56290	69/116	-
502	PC149-3	414	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At1g56290	61/138	-
503	PC149-4	414	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At1g56290	84/134	-
507	PC150-3	259	PHR2 (PHOTOLYASE/BLUE-LIGHT RECEPTOR 2)	Arabidopsis thaliana	At2g47590	36/48	DNA repair
508	PC150-4	400	Glutamine synthetase, chloroplast precursor, GS2	Daucus carota	AAB71693	47/67	-
509	PC152-1	296	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase (isomerizing)	Arabidopsis thaliana	At3g24090	91/98	carbohydrate biosynthesis; carbohydrate metabolism; metabolism
511	PC152-3	296	oxidoreductase	Arabidopsis thaliana	At1g16720	40/52	metabolism
512	PC152-4	87	elongation factor 1-alpha	Schistosoma japonicum	AAQ16109	15/26	-
516	PC154-4	77	mtHSC70-2 (HEAT SHOCK PROTEIN 70)	Arabidopsis thaliana	At5g09590	17/18	protein folding; response to heat; response to virus
517	PC155-1	46	omega-3 fatty acid desaturase (see 764-1)	Petroselinum crispum	AAB72241	15/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
524	PC156-4	46	omega-3 fatty acid desaturase (see 764-1)	Petroselinum crispum	AAB72241	15/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
529	PC158-1	247	ATP binding / protein binding (see 206-3)	Arabidopsis thaliana	At5g26360	44/47	cellular protein metabolism
530	PC158-4	247	ATP binding / protein binding (see 206-3)	Arabidopsis thaliana	At5g26360	44/47	cellular protein metabolism
536	PC159-4	294	zinc finger DNA-binding protein	Catharanthus roseus	CAF74934	53/85	-
538	PC161-2	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	30/39	-
539	PC161-4	223	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	42/61	-
540	PC161-3	224	conserved hypothetical protein	Medicago truncatula	ABE92227	17/29	-
542	PC162-2	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 161-4)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	42/56	-
547	PC163-2	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	30/39	-
548	PC163-4	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	30/39	-
549	PC164-1-1	176	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	42/56	-
550	PC164-1-2	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	42/56	-

551	PC164-1-3	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	42/56	-
552	PC164-1-4	176	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	42/56	-
553	PC164-2-2	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	42/56	-
554	PC164-2-1	118	copper ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g09220	18/39	-
555	PC164-2-4	118	copper ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g09220	24/39	-
557	PC167-1	315	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/80	biological process unknown
558	PC167-2	322	transferase, transferring hexosyl groups	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g28340	68/105	carbohydrate biosynthesis
559	PC167-3	322	transferase, transferring hexosyl groups	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g28340	68/105	carbohydrate biosynthesis
560	PC167-4	322	transferase, transferring hexosyl groups	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g28340	68/105	carbohydrate biosynthesis
561	PC168-1	238	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g49000	37/54	biological process unknown
562	PC168-2	236	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g18470	21/71	protein amino acid phosphorylation
563	PC168-3	238	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	30/58	-
570	PC175-2	191	SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g35770	33/54	aging; response to light stimulus; response to sucrose stimulus
572	PC175-4	219	SEN1 (DARK INDUCIBLE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g35770	38/55	aging; response to light stimulus; response to sucrose stimulus
573	PC177-1	233	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	49/62	defense response to pathogen
574	PC177-2	141	70 kD heatshockprotein (see 182-2)	<i>Medicago sativa</i>	CAA67588	16/21	-
575	PC177-3	209	ubiquitin-protein ligase (see 388-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g35930	42/69	protein ubiquitination
576	PC177-4	216	Phenylalanine ammonia-lyase 1 (see 596-2)	<i>Petroselinum crispum</i>	CAA34715	69/71	Phenylpropanoid biosynthesis; first step
578	PC178-2	229	SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3) (see 280-4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g23570	19/46	virus induced gene silencing
579	PC178-3	237	malate dehydrogenase/ oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g43330	56/70	malate metabolism; tricarboxylic acid cycle intermediate metabolism
580	PC178-4	216	Phenylalanine ammonia-lyase 1 (see 177-4)	<i>Petroselinum crispum</i>	CAA34715	69/71	Phenylpropanoid biosynthesis; first step
581	PC180-1	217	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g26850	55/71	-
582	PC180-2	171	ATPUP3 (see 345-4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g28220	17/39	-
583	PC180-3	133	kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g15150	28/37	protein amino acid phosphorylation
584	PC180-4	171	catalytic/ intramolecular transferase, phosphotransferases	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g22170	13/18	glycolysis; metabolism
586	PC182-2	141	70 kD heatshockprotein (see 727-4)	<i>Medicago sativa</i>	CAA67588	16/21	-
587	PC182-3	142	electron carrier (ev. 543-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g30740	17/27	electron transport
588	PC182-4	135	structural constituent of ribosome (see 4-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g15250	31/39	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
589	PC184-1	235	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/79	biological process unknown
590	PC184-2	235	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/79	biological process unknown
591	PC184-4	235	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/79	biological process unknown
593	PC185-1	174	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	42/56	-
594	PC185-2	169	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
595	PC185-3	170	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
596	PC185-4	169	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
597	PC187-2	235	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/79	biological process unknown
605	PC190-1	169	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
606	PC190-2	203	protein tyrosine/serine/threonine phosphatase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g56610	53/67	protein amino acid dephosphorylation
608	PC190-4	174	hydrogen-exporting ATPase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g08670	57/57	ATP biosynthesis; ATP synthesis coupled proton transport
609	PC191-1	169	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
610	PC191-4	169	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	47/58	defense response to pathogen
611	PC191-2	171	trans-cinnamate 4 monooxygenase (C4H)	<i>Petroselinum crispum</i>	TCMO_PETCF26/26		Lignin biosynthesis; Phenylpropanoid metabolism; second step
612	PC191-3	163	hypothetical protein	<i>Methanococcus j.</i>	NP_247974	17/41	-
613	PC195-1	409	ATGPAT6/GPAT6; acyltransferase (see 797-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g38110	102/133	metabolism
614	PC195-2	406	ATGPAT6/GPAT6; acyltransferase (see 797-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g38110	88/122	metabolism
616	PC195-4	174	S-norcochlorine synthase 2	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56304	17/48	-
618	PC196-2	349	ubiquitin-protein ligase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g52450	52/86	protein ubiquitination
619	PC196-3	350	ubiquitin-protein ligase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g52450	52/86	protein ubiquitination
621	PC197-2	378	HSP81-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g56010	42/60	protein folding; response to heat
623	PC197-4	373	Eli7,7, andere Eli7 (see 287-4)	<i>Petroselinum crispum</i>	AF239832	14/15	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
624	PC197-5	364	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	33/82	biological process unknown
625	PC198-1	238	component of 9-1-1 complex	<i>Dictyostelium d.</i>	XP_644078	15/49	-
626	PC198-2	237	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase (see 228-4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g40540	72/78	protein amino acid phosphorylation
628	PC198-4	245	amino acid permease/ amino acid transporter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g38250	35/86	amino acid transport
636	PC200-4	174	S-norcochlorine synthase 2	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56304	17/48	-
637	PC201-1	178	pathogenesis-related 10 protein PR10-2	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56076	14/43	-
638	PC201-2	174	S-norcochlorine synthase 2	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56304	17/48	-
639	PC201-4	174	S-norcochlorine synthase 2	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56304	17/48	-
641	PC202-1	?	S-norcochlorine synthase 2 (BUT apo at 183)	<i>Papaver somniferum</i>	AAAX56304	17/48	-
642	PC202-2	154	oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g01800	27/45	metabolism
643	PC202-3	156	oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g01800	28/48	metabolism
644	PC202-4	156	oxidoreductase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g01800	28/48	metabolism
654	PC206-3	140	ATP binding / protein binding (see 158-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g26360	43/46	cellular protein metabolism
655	PC206-4	156	RPS15A (RIBOSOMAL PROTEIN S15A)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g07770	34/40	protein biosynthesis
656	PC207-1	143	RNA polymerase II transcription factor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g10330	21/27	regulation of transcription, DNA-dependent; transcription initiation
657	PC207-2	140	ATP binding / protein binding (see 158-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g26360	43/46	cellular protein metabolism
658	PC207-3	140	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g16670	30/38	protein amino acid phosphorylation
668	PC210-1	141	hypothetical protein PTD2_09632	<i>Pseudoalteromonas t.</i>	ZIP_01136035	14/33	-
669	PC210-2	324	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 417-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	27/46	-
670	PC210-3	235	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 417-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	27/46	-
671	PC210-4	225	14 KD proline-rich protein DC2.15 precursor	<i>Daucus carota</i>	CAA33476	37/39	May be connected with the initiation of embryogenesis
673	PC211-2	168	ATPase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g02480	18/24	-
675	PC211-4	160	unknown protein (see 212-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g70505	29/50	biological process unknown
678	PC212-3	160	unknown protein (see 211-4)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g70505	29/50	biological process unknown
680	PC215-1	419	putative beta-amyrin synthase (see 245-3)	<i>Centella asiatica</i>	AAS01523	101/139	metabolism
681	PC215-2	432	hypothetical protein	<i>Magnetospirillum g.</i>	CAJ30048	37/41	-
682	PC215-3	169	unknown protein (see 216-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	45/56	defense response to pathogen
683	PC215-4	189	membrane alanil aminopeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g63770	40/62	proteolysis
684	PC216-1	168	unknown protein (see 177-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	28/36	defense response to pathogen
685	PC216-3	168	unknown protein (see 177-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g15220	28/36	defense response to pathogen
686	PC216-2	277	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g54320	58/83	biological process unknown
687	PC216-4	276	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g54320	58/83	biological process unknown
688	PC217-1	242	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2 & 210-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	42/56	-
689	PC217-2	252	quercetin 3-O-glucoside-6"-O-malonyltransferase	<i>Verbena x hybrida</i>	AAS77403	32/71	-

690	PC217-3	250	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	49/61	defense response to pathogen
691	PC217-4	244	Tyrosin-Decarboxylase (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	40/40	-
692	PC218-1	235	unknown protein (see 470-1)	Arabidopsis thaliana	At2g46150	31/79	biological process unknown
693	PC218-2	235	unknown protein (see 470-1)	Arabidopsis thaliana	At2g46150	31/79	biological process unknown
694	PC218-3	234	unknown protein (see 470-1)	Arabidopsis thaliana	At2g46150	31/79	biological process unknown
696	PC219-1	201	AP51	Arabidopsis thaliana	At3g22890	59/66	dissimilatory sulfate reduction; sulfate assimilation
697	PC219-2	201	AP51	Arabidopsis thaliana	At3g22890	59/66	dissimilatory sulfate reduction; sulfate assimilation
698	PC219-3	212	protein Ser/Thr kinase/ protein Tyr kinase/ sugar binding (see 661-2)	Arabidopsis thaliana	At4g27300	27/69	protein amino acid phosphorylation
699	PC219-4	211	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	Arabidopsis thaliana	At3g08590	50/57	acetate fermentation; aerobic glycerol catabolism
700	PC220-1	168	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	28/36	defense response to pathogen
701	PC220-2	168	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	28/36	defense response to pathogen
702	PC220-3	173	ACS1 (ACC SYNTHASE 1) (see 246-1)	Arabidopsis thaliana	At3g61510	32/39	ethylene biosynthesis
704	PC221-2	171	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	41/50	defense response to pathogen
705	PC221-3	173	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	40/45	defense response to pathogen
706	PC221-4	169	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	26/31	defense response to pathogen
707	PC222-1	170	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	43/57	defense response to pathogen
708	PC222-2	169	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	43/57	defense response to pathogen
709	PC222-3	169	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	43/57	defense response to pathogen
712	PC223-2	169	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	46/58	defense response to pathogen
713	PC223-3	169	unknown protein (see 216-1)	Arabidopsis thaliana	At2g15220	46/57	defense response to pathogen
717	PC224-3	102	PWD (PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE)	Arabidopsis thaliana	At5g26570	16/30	starch metabolism, protein amino acid autophosphorylation
722	PC225-2	81	X-Pro dipeptidase-like protein (see 249-2)	Arabidopsis thaliana	At4g29500	20/26	-
727	PC228-1	72	putative cinnamyl-alcohol dehydrogenase (see 580-1)	Arabidopsis thaliana	At1g72680	16/24	lignin biosynthesis [pmid 8219046]
728	PC228-2	235	ATSK11	Arabidopsis thaliana	At5g26751	75/77	meristem organization; phosphorylation
729	PC228-3	202	hypothetical protein RoseRSDRAFT_4270	Roseiflexus sp. RS-1	ZP_01355879	14/34	-
730	PC228-4	237	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase (see 198-2)	Arabidopsis thaliana	At5g40540	51/54	protein amino acid phosphorylation
731	PC229-1	170	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g44100	13/29	biological process unknown
732	PC229-2	170	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g44100	19/40	biological process unknown
733	PC229-3	169	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g44100	13/29	biological process unknown
736	PC230-2	159	BXL2 (BETA-XYLOSIDASE 2)	Arabidopsis thaliana	At1g02640	37/52	carbohydrate metabolism
738	PC230-4	160	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At3g20860	25/39	protein amino acid phosphorylation
739	PC232-1	145	MUR3 (MURUS 3)	Arabidopsis thaliana	At2g20370	38/47	endomembrane organization; fucose biosynthesis
740	PC232-2	137	alcohol acyltransferase	Fragaria x ananassa	AF193789	13/18	-
743	PC233-1	91	SKIP4 (SKP1 INTERACTING PARTNER 4)	Arabidopsis thaliana	At3g61350	21/25	biological process unknown
744	PC233-2	91	SKIP4 (SKP1 INTERACTING PARTNER 4)	Arabidopsis thaliana	At3g61350	21/25	biological process unknown
747	PC234-1	223	COR413-PM2	Arabidopsis thaliana	At3g50830	20/31	response to stress
748	PC234-2	225	oxidoreductase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At5g24760	60/74	-
749	PC234-3	225	oxidoreductase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At5g24760	60/74	-
751	PC235-1	130	subtilisin-like protease C1 (see 131-3)	Glycine max	AAD02075	21/44	negative regulation of enzyme activity; proteolysis
752	PC235-2	130	subtilisin-like protease C1 (see 131-3)	Glycine max	AAD02075	21/44	negative regulation of enzyme activity; proteolysis
753	PC235-3	130	subtilisin-like protease C1 (see 131-3)	Glycine max	AAD02075	21/44	negative regulation of enzyme activity; proteolysis
754	PC235-4	130	subtilisin-like protease C1 (see 131-3)	Glycine max	AAD02075	21/44	negative regulation of enzyme activity; proteolysis
761	PC237-2	84	CYP86A2, oxygen binding	Arabidopsis thaliana	At4g00360	22/27	fatty acid metabolism
764	PC238-2	70	1-phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At4g33240	19/22	-
765	PC238-3	66	LACS6 (LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 6)	Arabidopsis thaliana	At3g05970	18/22	fatty acid oxidation; metabolism; n-octane oxidation
766	PC238-4	66	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	17/21	electron transport
767	PC239-1	315	transcription factor	Arabidopsis thaliana	At1g50600	15/27	regulation of transcription
768	PC239-2	336	RBOHD (RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN D)	Arabidopsis thaliana	At5g47910	56/68	defense response; oxygen and reactive oxygen species metabolism
769	PC239-3	336	RBOHD (RESPIRATORY BURST OXIDASE PROTEIN D)	Arabidopsis thaliana	At5g47910	56/68	defense response; oxygen and reactive oxygen species metabolism
770	PC239-3	356	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g52370	73/103	cell adhesion
771	PC240-2	281	Phenylalanine ammonia-lyase 1 (see 690-1)	Petroselinum crispum	CAA34715	74/74	Phenylpropanoid biosynthesis; first step
772	PC240-3	280	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	Arabidopsis thaliana	At4g34100	66/92	protein ubiquitination
773	PC240-4	277	L-aspartate oxidase/ disulfide oxidoreductase/ oxidoreductase	Arabidopsis thaliana	At5g14760	49/57	electron transport; NAD biosynthesis
774	PC240-5	277	L-aspartate oxidase/ disulfide oxidoreductase/ oxidoreductase	Arabidopsis thaliana	At5g14760	49/57	electron transport; NAD biosynthesis
775	PC241-1	235	unknown protein (see 470-1)	Arabidopsis thaliana	At2g46150	31/79	biological process unknown
776	PC241-2	279	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2 & 210-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	21/29	-
777	PC241-4	265	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 162-2 & 210-2)	Arabidopsis thaliana	At1g23740	41/56	-
779	PC243-1	164	carboxylic ester hydrolase/ hydrolase, acting on ester bonds	Arabidopsis thaliana	At5g45670	45/54	lipid metabolism
780	PC243-2	160	immediate-early fungal elicitor protein CMPG1, Eil17 (see 334-4)	Petroselinum crispum	AAK69402	14/17	protein ubiquitination
781	PC243-3	235	unknown protein (see 470-1)	Arabidopsis thaliana	At2g46150	30/79	biological process unknown
785	PC245-3	419	putative beta-amyrin synthase (see 215-1)	Centella asiatica	AAS01523	104/139	metabolism
786	PC245-4	419	putative beta-amyrin synthase (see 215-1)	Centella asiatica	AAS01523	104/139	metabolism
787	PC246-1	196	ACS1 (ACC SYNTHASE 1) (see 220-3)	Arabidopsis thaliana	At3g61510	51/60	ethylene biosynthesis
788	PC246-2	174	ACS1 (ACC SYNTHASE 1) (see 220-3)	Arabidopsis thaliana	At3g61510	50/58	ethylene biosynthesis
789	PC246-3	230	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g53990	17/31	response to stress
790	PC246-4	155	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 247-3)	Arabidopsis thaliana	At1g65430	48/51	protein ubiquitination
792	PC247-2	174	ACS1 (ACC SYNTHASE 1) (see 220-3)	Arabidopsis thaliana	At3g61510	50/58	ethylene biosynthesis
793	PC247-4	175	ACS1 (ACC SYNTHASE 1) (see 220-3)	Arabidopsis thaliana	At3g61510	50/58	ethylene biosynthesis
794	PC247-3	156	ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 246-4)	Arabidopsis thaliana	At1g65430	49/51	protein ubiquitination
799	PC249-1	81	protein binding	Arabidopsis thaliana	At1g03440	19/25	signal transduction
800	PC249-3	81	protein binding	Arabidopsis thaliana	At1g03440	19/25	signal transduction
801	PC249-2	81	X-Pro dipeptidase-like protein (see 225-2)	Arabidopsis thaliana	At4g29500	21/26	-
802	PC249-4	81	X-Pro dipeptidase-like protein (see 225-2)	Arabidopsis thaliana	At4g29500	21/26	-
803	PC250-1	72	cinnamyl-alcohol dehydrogenase (CAD) (see 580-1)	Arabidopsis thaliana	At1g72860	16/24	lignin biosynthesis [pmid 8219046]
804	PC250-2	189	omega-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.99.-) (see 355-1)	Petroselinum crispum	AAB80696	29/35	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
806	PC250-4	189	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At1g27760	31/43	biological process unknown
807	PC251-1	281	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	48/94	electron transport
808	PC251-2	281	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	48/94	electron transport
809	PC251-4	289	electron carrier (see 397-1)	Arabidopsis thaliana	At1g26420	18/47	electron transport
811	PC252-1	98	ATGLR2.8	Arabidopsis thaliana	At2g29110	20/32	calcium ion homeostasis; response to light stimulus
812	PC252-2	98	ATGLR2.8	Arabidopsis thaliana	At2g29110	20/32	calcium ion homeostasis; response to light stimulus
815	PC253-1	277	conserved hypothetical protein (see 664-2-3)	Paracoccus denitrificans	ZP_00630616	46/65	-
816	PC253-2	283	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g47570	18/21	biological process unknown
817	PC253-3	283	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g47570	18/21	biological process unknown

818	PC253-4	283	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g47570	18/21	biological process unknown
819	PC254-1	270	anionic peroxidase (see 113-2)	Petroselinum crispum	AAA98491	41/46	response to oxidative stress
820	PC254-4	ca 201	anionic peroxidase (see 113-2)	Petroselinum crispum	AAA98491	39/40	response to oxidative stress
821	PC254-2	270	APX1	Arabidopsis thaliana	At1g07890	57/65	response to reactive oxygen species
822	PC254-3	265	similar to zinc finger protein 91 (HPF7, HTF10)	Danio rerio	XP_694208	31/96	-
823	PC255-1-1	468	BPF-1a protein	Petroselinum crispum	CAA48413	85/116	protein modification; regulation of transcription
824	PC255-1-2	469	BPF-1a protein	Petroselinum crispum	CAA48413	103/158	protein modification; regulation of transcription
825	PC255-1-3	472	BPF-1a protein	Petroselinum crispum	CAA48413	71/95	protein modification; regulation of transcription
826	PC255-1-4	466	BPF-1a protein	Petroselinum crispum	CAA48413	103/151	protein modification; regulation of transcription
828	PC255-2-2	260	electron carrier (see pc300-3)	Arabidopsis thaliana	At1g30760	43/72	electron transport
829	PC255-2-3	258	WNK8	Arabidopsis thaliana	At5g41990	14/24	protein amino acid phosphorylation
830	PC255-2-4	287	tyrosin/dopa decarboxylase	Papaver somniferum	AAC61842	33/81	amino acid and derivative metabolism; carboxylic acid metabolism
831	PC256-1	171	protein transporter (see 289-1)	Arabidopsis thaliana	At5g16880	30/56	intra-Golgi transport; intracellular protein transport
832	PC256-2	172	protein transporter (see 289-1)	Arabidopsis thaliana	At5g16880	30/56	intra-Golgi transport; intracellular protein transport
833	PC256-3	166	GAD2 (GLUTAMATE DECARBOXYLASE 2) (see 445-4)	Arabidopsis thaliana	At1g65960	43/55	glutamate metabolism; nitrogen compound metabolism
834	PC256-4	171	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein Eli7.1 (see 289-3)	Petroselinum crispum	AAG24521	49/50	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
839	PC258-1	281	AGC2-1 (OXIDATIVE SIGNAL-INDUCIBLE1)	Arabidopsis thaliana	At3g25250	39/59	protein amino acid phosphorylation
840	PC258-2	212	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	70/70	-
843	PC259-1	272	SQD2 (SULFOQUINOVOSYLDIACYLGLYCEROL 2)	Arabidopsis thaliana	At5g01220	49/55	cellular response to phosphate starvation; glycolipid biosynthesis
845	PC259-3	272	protein transporter	Arabidopsis thaliana	At4g16143	44/50	intracellular protein transport; protein import into nucleus
846	PC259-4	265	UBP6 (UBIQUITIN-SPECIFIC PROTEASE 6)	Arabidopsis thaliana	At1g51710	74/86	protein deubiquitination
847	PC261-1	269	anionic peroxidase (see 113-2)	Petroselinum crispum	AAA98491	43/43	response to oxidative stress
848	PC261-2	272	pectate lyase	Arabidopsis thaliana	At1g67750	46/52	biological process unknown
850	PC261-4	269	calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At1g53210	29/81	-
851	PC262-1	212	SHD (SHEPHERD)	Arabidopsis thaliana	At4g24190	29/34	protein folding; regulation of meristem organization
853	PC262-3	203	nicotinate-nucleotide diphosphorylase (carboxylating)	Arabidopsis thaliana	At2g01350	48/52	NAD biosynthesis; pyridine nucleotide biosynthesis
854	PC262-4	206	Putative NADPH HC toxin reductase	Oryza sativa	BAC79712	34/68	cellular metabolism
855	PC263-1	98	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At1g06840	26/32	protein amino acid phosphorylation
856	PC263-2	89	TIM50	Arabidopsis thaliana	At1g55900	21/29	biological process unknown
857	PC263-3	98	NRPD2a	Arabidopsis thaliana	At3g23780	15/21	DNA methylation; RNA interference, production of siRNA; transcription
858	PC263-4	98	NRPD2a	Arabidopsis thaliana	At3g23780	15/21	DNA methylation; RNA interference, production of siRNA; transcription
859	PC264-1	70	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	16/22	electron transport
860	PC264-2	70	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	16/22	electron transport
863	PC265-1	287	copper ion binding	Arabidopsis thaliana	At4g39830	20/39	-
864	PC265-2	277	ARA7	Arabidopsis thaliana	At4g19640	19/22	intracellular protein transport; small GTPase mediated signal transduction
865	PC265-3	290	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g18740	32/33	mRNA processing
866	PC265-4	273	F-box protein family (see 347-2)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	13/26	biological process unknown
868	PC266-2	233	structural constituent of ribosome	Arabidopsis thaliana	At5g35530	43/60	protein biosynthesis
869	PC266-3	166	serine-type endopeptidase inhibitor (see 301-2)	Arabidopsis thaliana	At5g43580	14/21	response to wounding
870	PC266-4	165	serine-type endopeptidase inhibitor (see 301-2)	Arabidopsis thaliana	At5g43580	12/21	response to wounding
876	PC268-2	165	electron carrier (see 718-4) (BUT no taq)	Arabidopsis thaliana	At5g44400	16/27	electron transport
877	PC268-3	140	ALDH3H1; aldehyde dehydrogenase	Arabidopsis thaliana	At1g44170	21/36	metabolism
883	PC271-1	274	nucleotide binding signal recognition particle 54KD protein 2 (SRP54)	Arabidopsis thaliana	At1g48900	79/90	protein targeting
889	PC273-3	182	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	Arabidopsis thaliana	At4g03230	27/36	protein amino acid phosphorylation
895	PC275-1	281	hypothetical protein	Plasmodium chabaudi c.	XP_745411	18/65	-
896	PC275-2	276	DC2.15 like protein	Daucus carota	BAA99575	38/44	lipid transport
897	PC275-3	276	DC2.15 like protein	Daucus carota	BAA99575	38/44	lipid transport
899	PC276-1	271	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase (see 564-1)	Arabidopsis thaliana	At2g28590	30/43	protein amino acid phosphorylation
900	PC276-2	271	hypothetical protein CYB_0720	Synechococcus sp.	YP_476967	13/35	-
901	PC276-3	271	ATGPX6 (GLUTATHIONE PEROXIDASE 6)	Arabidopsis thaliana	At4g11600	48/66	response to oxidative stress
902	PC276-4	275	ubiquitin-protein ligase (see 564-4)	Arabidopsis thaliana	At2g44900	23/30	ubiquitin-dependent protein catabolism
903	PC277-1	207	putative chromosome partition protein SmC	Treponema denticola	NP_972102	16/50	-
904	PC277-2	221	EDGP precursor (see 566-2)	Daucus carota	BAA03413	41/51	proteolysis
907	PC278-1	95	calmodulin binding (see 787-2)	Arabidopsis thaliana	At2g26190	25/28	N-terminal protein myristoylation
908	PC278-2	95	calmodulin binding (see 787-2)	Arabidopsis thaliana	At2g26190	25/28	N-terminal protein myristoylation
909	PC278-4	95	calmodulin binding (see 787-2)	Arabidopsis thaliana	At2g26190	25/28	N-terminal protein myristoylation
910	PC278-3	96	GTP binding / translation initiation factor	Arabidopsis thaliana	At2g05830	27/31	cellular biosynthesis; translational initiation
911	PC279-1	54	spermidine synthase (see 446-4)	Malus x domestica	BAC20170	14/17	-
915	PC280-1	281	ATP-dependent helicase/ nucleic acid binding / transcription regulator	Arabidopsis thaliana	At2g46020	86/93	biological process unknown
916	PC280-2	280	ATP-dependent helicase/ nucleic acid binding / transcription regulator	Arabidopsis thaliana	At2g46020	87/93	biological process unknown
917	PC280-3	212	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	70/70	-
918	PC280-4	282	SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3) (see 178-2)	Arabidopsis thaliana	At5g23570	18/51	virus induced gene silencing
923	PC282-1	71	secreted glycoprotein EP4, 47K, precursor	Daucus carota	AAA98926	21/23	lipid metabolism
924	PC282-4	71	secreted glycoprotein EP4, 47K, precursor	Daucus carota	AAA98926	21/23	lipid metabolism
926	PC282-3	69	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At4g11860	21/22	biological process unknown
928	PC283-2	350	acyltransferase-like protein (see 774-3)	Arabidopsis thaliana	At3g26040	38/79	biological process unknown
929	PC283-3	340	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g07090	73/107	biological process unknown
936	PC285-2	128	CNBT1 (CYCLIC NUCLEOTIDE-BINDING TRANSPORTER 1) (see 290-2)	Arabidopsis thaliana	At3g17700	30/40	ion transport
941	PC287-3	211	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	Daucus carota	BAB68539	29/59	electron transport
942	PC287-4	303	Eli7.7 (see 197-4)	Petroselinum crispum	AF239832	65/87	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
945	PC288-2	272	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g28310	47/61	biological process unknown
946	PC288-4	271	putative ammonium transporter	Oryza sativa	NP_915679	79/89	transport
947	PC289-1	172	protein transporter (see 256-1)	Arabidopsis thaliana	At5g16880	25/45	intra-Golgi transport; intracellular protein transport
948	PC289-4	171	protein transporter (see 256-1)	Arabidopsis thaliana	At5g16880	30/56	intra-Golgi transport; intracellular protein transport
949	PC289-2	171	hypothetical protein Bado1_01000417	Bifidobacterium a.	ZP_01029720	15/40	-
950	PC289-3	172	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein Eli7.1 (see 256-4)	Petroselinum crispum	AAG24521	49/50	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
952	PC290-2	128	CNBT1 (CYCLIC NUCLEOTIDE-BINDING TRANSPORTER 1) (see 285-2)	Arabidopsis thaliana	At3g17700	30/40	ion transport
953	PC290-3	128	CNBT1 (CYCLIC NUCLEOTIDE-BINDING TRANSPORTER 1) (see 285-2)	Arabidopsis thaliana	At3g17700	30/40	ion transport
954	PC290-4	124	unknown	Petroselinum crispum	AAG09294	14/14	-
963	PC293-1	255	PP2A-1	Arabidopsis thaliana	At1g59830	59/72	biological process unknown
966	PC293-4	212	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	69/70	-
967	PC294-1	254	putative 3-ketoacyl-acyl carrier protein reductase	Oryza sativa	BAC57400	25/47	metabolism
968	PC294-2	212	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	69/70	-
969	PC294-3	212	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	68/70	-

970	PC294-4	211	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAA33861	63/64	-
971	PC295-1	213	Tyr-DC (Eli 5) (see 312-1)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAA33861	68/71	-
982	PC297-4	/	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g61820	68/132	biological process unknown
985	PC298-3	270	hydroxymethylbilane synthase (HMBS)	<i>Pisum sativum</i>	CAA51820	46/66	Porphyrin biosynthesis by the C5 pathway
987	PC299-1	289	bergapto1 O-methyltransferase	<i>Ammi majus</i>	AAR24096	58/62	lignin biosynthesis; regulation of transcription, DNA-dependent
988	PC299-2	283	ACT7	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g09810	70/71	cytoskeleton organization and biogenesis; response to auxin stimulus
991	PC300-1	210	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 569-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g02960	40/61	protein ubiquitination
992	PC300-2	153	catalytic/ protein phosphatase type 2C (see 569-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g62260	30/47	-
993	PC300-3	211	electron carrier (see364-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g30760	29/59	electron transport
994	PC300-4	269	CYP72A11; monoxygenase/ oxygen binding (BUT no apo)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g14650	38/73	electron transport
995	PC301-1	210	extra-large guanine nucleotide binding protein, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g31930	52/57	-
996	PC301-2	213	serine-type endopeptidase inhibitor (see 266-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g43580	14/21	response to wounding
998	PC301-4	213	cell attachment protein in somatic embryogenesis (see 372-3)	<i>Daucus carota</i>	BAD24818	51/26	-
999	PC303-1	147	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 (see 315)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19300	36/47	carbohydrate biosynthesis
1000	PC303-2	144	cytochrome P450	<i>Petunia x hybrida</i>	BAC53892	26/46	Anthocyanin biosynthesis
1001	PC303-4	144	cytochrome P450	<i>Petunia x hybrida</i>	BAC53892	26/46	Anthocyanin biosynthesis
1002	PC303-3	134	probable 60S ribosomal protein L27a	<i>Picea mariana</i>	AAC32151	32/43	protein biosynthesis
1010	PC307-4	161	GTP binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g18800	22/25	intracellular protein transport; mall GTPase mediated signal transduction
1011	PC308-1	166	serine-type endopeptidase inhibitor (see 266-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g43580	14/21	response to wounding
1012	PC308-2	171	hAT family dimerisation domain, putative	<i>Medicago truncatula</i>	ABE88160	29/55	-
1013	PC308-3	172	hAT family dimerisation domain, putative	<i>Medicago truncatula</i>	ABE88160	32/59	-
1014	PC308-4	172	hAT family dimerisation domain, putative	<i>Medicago truncatula</i>	ABE88160	32/59	-
1019	PC310-1	301	ATL3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g72310	43/85	protein ubiquitination
1020	PC310-2	271	Tyrosin-Decarboxylase (see 312-1)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAA33861	68/69	-
1021	PC310-3	280	electron carrier (see 432-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g26420	49/88	electron transport
1022	PC310-4	299	electron carrier (see 432-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g26420	53/98	electron transport
1025	PC311-3	122	oxidoreductase/ sphingolipid delta-4 desaturase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g61580	28/40	lipid metabolism
1026	PC311-4	212	Tyr-DC (Eli5) (see 312-1)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAA33861	70/70	-
1027	PC312-1	246	Tyr-DC (Eli5) (see 311-4)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAA33861	72/72	-
1028	PC312-2	269	fructose-bisphosphate aldolase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g01140	79/89	pentose-phosphate shunt
1030	PC312-4	248	isoflavone reductase related protein	<i>Pyrus communis</i>	AAC24001	23/26	regulation of nitrogen utilization
1031	PC313-1	213	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g42350	24/31	protein ubiquitination
1032	PC313-2	212	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g42350	29/61	protein ubiquitination
1033	PC313-3	212	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g42350	29/61	protein ubiquitination
1034	PC313-4	213	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g42350	24/31	protein ubiquitination
1036	PC314-2	179	Eli 7.5 (see 352-3)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAAG2926	59/59	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
1039	PC315-1	147	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 (glycosyltransferase) (303-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19300	37/47	carbohydrate biosynthesis
1040	PC315-2	147	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 (glycosyltransferase) (303-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19300	37/47	carbohydrate biosynthesis
1041	PC315-4	147	Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein 231 (glycosyltransferase) (303-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19300	37/47	carbohydrate biosynthesis
1042	PC315-2	144	calmodulin binding (see 787-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g26190	21/22	N-terminal protein myristoylation
1051	PC318-1	105	serine-type endopeptidase inhibitor (see 360-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g61980	16/22	biological process unknown
1053	PC318-3	70	(S)-reticuline oxidase-like protein (see 397-1)	<i>Daucus carota</i>	BAB68539	16/22	electron transport
1062	PC320-3	135	SGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3) (see 178-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g23570	17/43	virus induced gene silencing
1063	PC321-2	205	expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g31940	19/24	-
1065	PC321-4	257	probable urea transport protein	<i>Bacteroides fragilis</i>	BAD48607	17/33	-
1066	PC321-6	262	hypothetical protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g36430	61/86	biological process unknown
1067	PC322-1	226	serine/threonine protein kinase-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g35960	51/73	protein amino acid phosphorylation
1068	PC322-2	226	serine/threonine protein kinase-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g35960	51/73	protein amino acid phosphorylation
1069	PC322-3	226	serine/threonine protein kinase-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g35960	51/73	protein amino acid phosphorylation
1070	PC322-4	226	serine/threonine protein kinase-like	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g35960	51/73	protein amino acid phosphorylation
1071	PC323-1	152	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g57400	37/49	N-terminal protein myristoylation
1072	PC323-4	152	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g57400	37/49	N-terminal protein myristoylation
1073	PC323-2	154	RNA binding / aconitate hydratase/ hydro-lyase/ iron ion binding / lyase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g05710	19/21	metabolism
1075	PC324-1	95	calmodulin binding (see 787-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g26190	24/28	N-terminal protein myristoylation
1079	PC325-1	57	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g42700	15/19	biological process unknown
1084	PC326-2	196	PHS1 (PROPYLAMIDE-HYPERSENSITIVE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g23720	52/65	protein amino acid dephosphorylation
1085	PC326-3	199	cytochrome P450 (see 454-3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD47832	41/64	electron transport
1091	PC328-1	250	PAD2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g66140	58/73	ubiquitin-dependent protein catabolism
1092	PC328-2	257	PAD2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g66140	39/74	ubiquitin-dependent protein catabolism
1093	PC328-3	250	PAD2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g66140	39/52	ubiquitin-dependent protein catabolism
1095	PC329-1	239	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g15030	45/71	biological process unknown
1096	PC329-2	239	putative protein kinase	<i>Oryza sativa</i>	AAK27806	22/72	protein amino acid phosphorylation
1097	PC329-4	238	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g15030	47/79	biological process unknown
1098	PC329-3	240	ADA2A	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g07740	29/53	biological process unknown
1099	PC330-1	205	SMP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g37120	48/68	positive regulation of cell proliferation; RNA splicing
1100	PC330-2	205	SMP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g37120	48/68	positive regulation of cell proliferation; RNA splicing
1101	PC330-3	205	SMP2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g37120	48/68	positive regulation of cell proliferation; RNA splicing
1109	PC332-3	103	binding / transporter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g37890	26/34	mitochondrial transport; transport
1115	PC334-1	328	conserved hypothetical protein (see 664-2-3 )	<i>Paracoccus denitrificans</i>	ZP_00630616	42/61	-
1116	PC334-2	327	conserved hypothetical protein (see 664-2-3 )	<i>Paracoccus denitrificans</i>	ZP_00630616	42/56	-
1118	PC334-4	328	immediate-early fungal elicitor protein CMPG1, Eli7 (see 243-2)	<i>Petroselinum crispum</i>	AAK69402	46/50	protein ubiquitination
1119	PC335-1	140	ubiquitin	<i>Glomus mosseae</i>	CAB96869	20/21	-
1122	PC335-3	139	putative ACC-synthase 1	<i>Lactuca sativa</i>	AAP14019	42/46	biosynthesis; ethylene biosynthesis; ripening
1123	PC336-1-1	340	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 628-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g01960	100/113	protein ubiquitination
1124	PC336-1-4	340	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 628-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g01960	101/113	protein ubiquitination
1125	PC336-1-2	140	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g31880	17/35	-
1127	PC336-2-1	241	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g62650	22/61	biological process unknown
1128	PC336-2-2	241	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g62650	23/61	biological process unknown
1129	PC336-2-4	241	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g62650	23/61	biological process unknown
1130	PC336-2-3	236	putative hydroxyproline-rich glycoprotein	<i>Oryza sativa</i>	AAN04190	23/72	-
1132	PC340-3	640	? unknown protein (see 630-1-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g06370	15/28	biological process unknown
1137	PC345-1	141	carnitine racemase/ catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At4g14440	15/21	metabolism
1139	PC345-4	108	ATPUP3 (see 180-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g28220	12/22	-
1140	PC346-1	83	transposase	<i>Pisum sativum</i>	AAX51974	23/27	-

1141	PC346-2	83	transposase	Pisum sativum	AAX51974	23/27	-
1144	PC347-1	376	ATTPS8	Arabidopsis thaliana	At1g70290	107/123	metabolism; trehalose biosynthesis
1145	PC347-3	376	EDGP precursor (see 763-4)	Daucus carota	BAA03413	89/113	proteolysis
1146	PC347-2	380	F-box protein family (see 796-4)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	51/113	biological process unknown
1147	PC347-4	376	trehalose-phosphate synthase [UDP-forming]	Arabidopsis thaliana	At1g70290	110/123	metabolism; trehalose biosynthesis
1148	PC348-1	325	F-box protein family (see 796-4)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	50/111	biological process unknown
1149	PC348-2	325	F-box protein family (see 796-4)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	52/111	biological process unknown
1150	PC348-3	326	F-box protein family (see 796-4)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	35/71	biological process unknown
1151	PC348-4	326	F-box protein family (see 796-4)	Arabidopsis thaliana	At4g22030	44/103	biological process unknown
1152	PC349-1	208	protein ser/thr kinase/ protein-tyr kinase/ sugar binding (see 654)	Arabidopsis thaliana	At4g27290	19/59	protein amino acid phosphorylation
1153	PC349-2	210	protein ser/thr kinase/ protein-tyr kinase/ sugar binding (see 654)	Arabidopsis thaliana	At4g27290	17/35	protein amino acid phosphorylation
1154	PC349-3	211	protein ser/thr kinase/ protein-tyr kinase/ sugar binding (see 654)	Arabidopsis thaliana	At4g27290	31/63	protein amino acid phosphorylation
1155	PC349-4	210	protein ser/thr kinase/ protein-tyr kinase/ sugar binding (see 654)	Arabidopsis thaliana	At4g27290	23/59	protein amino acid phosphorylation
1156	PC350-1	131	retrotransposon protein, putative, unclassified	Oryza sativa	ABF97084	24/32	-
1158	PC350-3	146	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase catalytic	Arabidopsis thaliana	At3g09830	21/44	protein amino acid phosphorylation
1159	PC350-4	139	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase catalytic	Arabidopsis thaliana	At5g61840	39/45	biological process unknown
1160	PC351-1	239	PHT5	Arabidopsis thaliana	At2g32830	40/60	phosphate transport; transport
1161	PC351-2	78	kinase	Arabidopsis thaliana	At4g08850	17/25	protein amino acid phosphorylation
1162	PC351-3	237	AHA4	Arabidopsis thaliana	At3g47950	39/41	cation transport, metabolism; proton transport
1163	PC351-4	236	PHT5	Arabidopsis thaliana	At2g32830	30/49	phosphate transport; transport
1166	PC352-3	181	Eli 7.5 (see 314-2)	Petroselinum crispum	AAG23926	36/36	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
1167	PC352-4	182	calcium ion binding	Arabidopsis thaliana	At5g61790	24/29	-
1168	PC353-1	102	Esterase/lipase/thioesterase (see 358-3)	Medicago truncatula	ABE88701	22/33	-
1169	PC353-2	102	Esterase/lipase/thioesterase (see 358-3)	Medicago truncatula	ABE88701	22/33	-
1170	PC353-3	102	Esterase/lipase/thioesterase (see 358-3)	Medicago truncatula	ABE88701	22/33	-
1171	PC353-4	102	Esterase/lipase/thioesterase (see 358-3)	Medicago truncatula	ABE88701	22/33	-
1176	PC355-1	324	omega-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.99.-) (see 355-3)	Petroselinum crispum	AAB80696	61/63	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
1177	PC355-3	324	omega-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.99.-) (see 355-1)	Petroselinum crispum	AAB80696	63/75	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
1178	PC355-2	320	TUB6 (BETA-6 TUBULIN)	Arabidopsis thaliana	At5g12250	56/56	microtubule-based process; response to cold
1179	PC355-4	320	TUB6 (BETA-6 TUBULIN)	Arabidopsis thaliana	At5g12250	56/56	microtubule-based process; response to cold
1180	PC356-1	305	ARP2/RPL3B	Arabidopsis thaliana	At1g61580	50/61	protein biosynthesis
1181	PC356-2	324	CIP1 (COPI-INTERACTIVE PROTEIN 1)	Arabidopsis thaliana	At5g41790	32/57	regulation of protein import into nucleus
1182	PC356-3	113	UBQ3 (POLYUBIQUITIN 3)	Arabidopsis thaliana	At5g03240	37/37	response to light stimulus; ubiquitin-dependent protein catabolism
1183	PC356-4	113	UBQ3 (POLYUBIQUITIN 3)	Arabidopsis thaliana	At5g03240	37/37	response to light stimulus; ubiquitin-dependent protein catabolism
1184	PC357-1	262	peroxidase	Populus alba	BAE16616	40/66	response to oxidative stress
1186	PC357-3	262	peroxidase	Populus alba	BAE16616	41/62	response to oxidative stress
1187	PC357-4	263	peroxidase	Populus alba	BAE16616	59/79	response to oxidative stress
1190	PC358-3	118	Esterase/lipase/thioesterase (see 353-1)	Medicago truncatula	ABE88701	18/30	-
1192	PC359-1	71	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase/ sugar binding	Arabidopsis thaliana	At4g27290	20/23	protein amino acid phosphorylation
1193	PC359-2	213	senescence-associated cysteine protease	Brassica oleracea	AAL60580	54/71	proteolysis
1194	PC359-3	213	senescence-associated cysteine protease	Brassica oleracea	AAL60580	56/71	proteolysis
1195	PC359-4	214	MLO8	Arabidopsis thaliana	At2g17480	53/70	cell death; defense response
1198	PC360-3	106	serine-type endopeptidase inhibitor (see 318-1)	Arabidopsis thaliana	At3g61980	16/22	biological process unknown
1200	PC361-1	408	ATP binding / glycine-tRNA ligase/ tRNA ligase	Arabidopsis thaliana	At1g29880	119/135	glycyl-tRNA aminoacylation; protein biosynthesis
1201	PC361-2	408	ATP binding / glycine-tRNA ligase/ tRNA ligase	Arabidopsis thaliana	At1g29880	87/138	glycyl-tRNA aminoacylation; protein biosynthesis
1202	PC361-3	407	ATP binding / glycine-tRNA ligase/ tRNA ligase	Arabidopsis thaliana	At1g29880	118/135	glycyl-tRNA aminoacylation; protein biosynthesis
1204	PC362-1	358	AT2 (see 489-1)	Arabidopsis thaliana	At1g22360	28/39	metabolism
1205	PC362-2	177	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At4g15610	23/47	biological process unknown
1206	PC362-3	90	SKIP2 (SKP1 INTERACTING PARTNER 2)	Arabidopsis thaliana	At5g67250	22/29	N-terminal protein myristoylation
1209	PC363-2	227	similar to SCO-spondin	Rattus norvegicus	CAF33425	14/36	-
1210	PC363-3	227	similar to SCO-spondin	Rattus norvegicus	CAF33425	14/36	-
1213	PC364-2	209	pathogenesis-related protein-like protein 2	Daucus carota	BAD04048	34/39	defense response
1214	PC364-3	158	electron carrier (see255-2-2)	Arabidopsis thaliana	At1g30760	26/52	electron transport
1216	PC365-1	256	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g32980	74/85	-
1220	PC366-1	158	electron carrier	Arabidopsis thaliana	At2g34790	30/52	electron transport
1221	PC366-2	158	electron carrier	Arabidopsis thaliana	At2g34790	26/47	electron transport
1222	PC366-3	158	electron carrier (beste Sequenz)	Arabidopsis thaliana	At2g34790	31/52	electron transport
1223	PC366-4	159	electron carrier	Arabidopsis thaliana	At2g34790	32/53	electron transport
1226	PC367-3	435	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	Arabidopsis thaliana	At2g35980	67/132	response to pathogen
1227	PC367-4	436	YLS9 (YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE 9)	Arabidopsis thaliana	At2g35980	67/132	response to pathogen
1232	PC368-2-1	243	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 369-2)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	64/67	protein biosynthesis
1233	PC368-2-2	243	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 369-2)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	63/67	protein biosynthesis
1234	PC368-2-3	243	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 369-2)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	61/67	protein biosynthesis
1235	PC368-2-4	244	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 369-2)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	71/80	protein biosynthesis
1236	PC369-1	209	DNA-binding response regulator, LuxR family	Caulobacter crescentus	NP_419575	14/44	-
1237	PC369-2	244	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 368-2-1)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	67/80	protein biosynthesis
1238	PC369-3	244	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 380-2)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	67/80	protein biosynthesis
1239	PC369-4	244	putative ribosomal protein	Brassica rapa	BAA11393	34/41	protein biosynthesis
1244	PC371-1	199	unknown protein (see 411-1-2)	Arabidopsis thaliana	At1g32690	28/81	biological process unknown
1249	PC372-2	295	hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	Arabidopsis thaliana	At2g26600	32/39	carbohydrate metabolism
1250	PC372-3	243	cell attachment protein in somatic embryogenesis (see 375-1)	Daucus carota	BAD24818	26/67	-
1251	PC372-4	292	peroxidase (see 107-1-4)	Nicotiana tabacum	NP_196153	49/79	response to oxidative stress
1253	PC373-2	256	acyltransferase	Arabidopsis thaliana	At4g00400	38/66	metabolism
1254	PC373-3	278	ALATS (ALANYL-TRNA SYNTHETASE)	Arabidopsis thaliana	At1g50200	53/92	alanyl-tRNA aminoacylation
1255	PC373-4	279	ALATS (ALANYL-TRNA SYNTHETASE)	Arabidopsis thaliana	At1g50200	52/83	alanyl-tRNA aminoacylation
1260	PC375-1	244	cell attachment protein in somatic embryogenesis (see 638-3)	Daucus carota	BAD24818	71/80	-
1261	PC375-2	244	cell attachment protein in somatic embryogenesis (see 638-3)	Daucus carota	BAD24818	71/80	-
1262	PC375-4	244	cell attachment protein in somatic embryogenesis (see 638-3)	Daucus carota	BAD24818	71/80	-
1266	PC376-3	130	1-aminoocyclopropane-1-carboxylate oxidase	Artemisia annua	CAA04872	28/33	Ethylene biosynthesis; last step
1268	PC377-1	69	dihydroorotase (see 602-3)	Beta vulgaris	CAC08990	16/21	pyrimidine nucleotide biosynthesis
1279	PC380-2	147	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6) (see 368-2-1)	Arabidopsis thaliana	At4g31700	33/35	protein biosynthesis
1281	PC381-2	194	conserved hypothetical protein	Shewannella oneidensis	NP_717426	21/69	-
1283	PC381-4	194	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At2g46900	39/69	biological process unknown
1285	PC382-2	235	electron carrier	Arabidopsis thaliana	At4g20840	28/31	electron transport



1427	PC414-1-4	269	ANAC092; transcription factor	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g39610	74/89	development
1428	PC414-2-1	265	putative helicase (see 414-1-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g05080	34/70	biological process unknown
1429	PC414-2-2	139	ribonuclease/ transcriptional repressor (see 416-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g10960	35/44	negative regulation of transcription; RNA modification
1430	PC414-2-3	139	ribonuclease/ transcriptional repressor (see 416-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g10960	35/44	negative regulation of transcription; RNA modification
1431	PC414-2-4	70	putative 5-receptor kinase (see 412-3)	<i>Oryza sativa</i>	BAD82381	18/22	protein amino acid phosphorylation
1432	PC416-1	139	ribonuclease/ transcriptional repressor (see 414-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g10960	35/44	negative regulation of transcription; RNA modification
1433	PC416-2	139	ribonuclease/ transcriptional repressor (see 414-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g10960	35/44	negative regulation of transcription; RNA modification
1434	PC416-3	139	ribonuclease/ transcriptional repressor (see 414-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g10960	35/44	negative regulation of transcription; RNA modification
1436	PC417-1	107	oxidoreductase/ zinc ion binding (see 210-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g23740	15/20	-
1438	PC417-3	142	putative phosphate transporter OsPTS	<i>Oryza sativa</i>	AAN39049	28/46	phosphate transport; transport
1439	PC417-4	109	ATSR1 (SERINE/THREONINE PROTEIN KINASE 1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g01820	22/41	protein amino acid phosphorylation; signal transduction
1448	PC422-1	54	unknown protein (see 512-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g01750	14/17	biological process unknown
1484	PC431-1	290	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19180	33/118	biological process unknown
1485	PC431-2	290	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19180	35/118	biological process unknown
1486	PC431-3	290	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19180	35/118	biological process unknown
1487	PC431-4	292	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g19180	33/118	biological process unknown
1489	PC432-2	83	ATP binding / ATPase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g40010	24/27	-
1490	PC432-3	119	electron carrier (see 310-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g26420	20/39	electron transport
1491	PC432-4	225	nuclease/ nucleic acid binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g61780	57/74	biological process unknown
1492	PC433-1	187	PREDICTED: similar to dysfusion CG32474-PA	<i>Apis mellifera</i>	XP_624744	13/37	-
1493	PC433-2	187	PREDICTED: similar to dysfusion CG32474-PA	<i>Apis mellifera</i>	XP_624744	13/37	-
1494	PC433-3	187	PREDICTED: similar to dysfusion CG32474-PA	<i>Apis mellifera</i>	XP_624744	13/37	-
1497	PC434-2	80	ATP binding / ATPase/ nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g28580	16/27	-
1499	PC434-4	107	ATP-dependent helicase/chromatin binding/protein binding/zinc ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g44800	17/33	chromatin assembly or disassembly; regulation of transcription
1500	PC435-1	76	lactoylglutathione lyase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g15380	15/18	carbohydrate metabolism
1503	PC435-4	76	lactoylglutathione lyase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g15380	15/18	carbohydrate metabolism
1507	PC436-4	311	ribosomal protein L15	<i>Oryza sativa</i>	AAN08216	72/82	protein biosynthesis
1516	PC439-1	81	pre-mRNA splicing factor, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g49430	24/26	biological process unknown
1517	PC439-2	81	pre-mRNA splicing factor, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g49430	24/26	biological process unknown
1518	PC439-4	81	pre-mRNA splicing factor, putative	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g49430	24/26	biological process unknown
1532	PC445-1	46	germin (oxalate oxidase)-like protein	<i>Oryza sativa</i>	NP_914653	12/14	-
1533	PC445-2	103	CDC25	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g03455	25/33	protein amino acid phosphorylation
1535	PC445-4	166	GAD2 (GLUTAMATE DECARBOXYLASE 2) (see 256-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g65960	43/55	glutamate metabolism; nitrogen compound metabolism
1537	PC446-2	46	germin-like protein 3 (see 448-2)	<i>Oryza sativa</i>	AAC04834	12/14	-
1538	PC446-3	44	germin-like protein 3 (see 448-2)	<i>Oryza sativa</i>	AAC04834	12/14	-
1539	PC446-4	67	spermidine synthase (see 279-1)	<i>Malus x domestica</i>	BAC20170	15/18	-
1540	PC448-1	44	germin-like protein 3 (see 446-2)	<i>Oryza sativa</i>	AAC04834	12/14	-
1541	PC448-2	44	germin-like protein 3 (see 446-2)	<i>Oryza sativa</i>	AAC04834	12/14	-
1542	PC448-4	46	germin-like protein 3 (see 446-2)	<i>Oryza sativa</i>	AAC04834	12/14	-
1549	PC450-2	115	DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g12610	25/37	signal transduction
1550	PC450-3	115	DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g12610	25/37	signal transduction
1551	PC450-4	115	DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g12610	25/37	signal transduction
1552	PC451-1	358	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g32850	43/77	protein amino acid phosphorylation
1554	PC451-3	130	cytochrome P450 (see 326-3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD47832	19/42	electron transport
1556	PC452-1	217	catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g34340	47/66	biological process unknown
1557	PC452-2	219	catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g34340	47/66	biological process unknown
1558	PC452-4	218	catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g34340	47/66	biological process unknown
1559	PC452-3	216	catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g34340	27/46	biological process unknown
1560	PC453-1	154	calcium ion binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g24620	31/50	biological process unknown
1561	PC453-2	158	protein binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g28650	25/44	exocytosis; vesicle docking during exocytosis
1562	PC453-3	158	protein binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g28650	25/44	exocytosis; vesicle docking during exocytosis
1564	PC454-1	75	structural constituent of ribosome	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g47610	18/21	protein biosynthesis
1565	PC454-2	107	TOM20-3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g27080	13/19	protein targeting to mitochondrion
1566	PC454-3	129	cytochrome P450 (see 326-3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD47832	18/40	electron transport
1569	PC455-2	254	unknown protein (see 456-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g40720	24/58	biological process unknown
1572	PC456-1	255	unknown protein (see 455-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g40720	28/82	biological process unknown
1573	PC456-4	255	unknown protein (see 455-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g40720	30/82	biological process unknown
1575	PC456-3	257	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At5g01710	18/31	-
1578	PC457-3	199	ATP binding / nucleoside-triphosphatase/ nucleotide binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g27600	52/68	-
1581	PC458-2	137	calmodulin binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g58480	24/38	biological process unknown
1582	PC458-3	134	calmodulin binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g58480	24/38	biological process unknown
1583	PC458-4	137	calmodulin binding	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g58480	24/38	biological process unknown
1584	PC459-1	188	Hypothetical protein CBG02772	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAE59408	16/47	-
1585	PC459-2	188	Hypothetical protein CBG02772	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAE59408	16/47	-
1586	PC459-3	188	Hypothetical protein CBG02772	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAE59408	16/47	-
1587	PC459-4	187	Hypothetical protein CBG02772	<i>Caenorhabditis briggsae</i>	CAE59408	16/47	-
1588	PC460-1	162	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	18/24	biological process unknown
1589	PC460-2	166	catalytic	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g23540	34/39	-
1590	PC460-3	<193	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g14990	11/17	biological process unknown
1591	PC460-4	166	cytochrome P450 (see 326-3)	<i>Nicotiana tabacum</i>	AAD47832	20/45	electron transport
1592	PC461-1	147	protein binding/ ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding (see 569-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g02960	22/28	protein ubiquitination
1593	PC461-2	139	unknown protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At3g06250	24/37	response to red or far red light
1594	PC461-3	120	protein transporter/ transporter	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At1g62020	29/33	ER to Golgi transport; intracellular protein transport
1595	PC461-4	131	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	20/35	biological process unknown
1596	PC462-1	119	putative glutamyl-tRNA reductase	<i>Oryza sativa</i>	AAG13620	26/38	porphyrin biosynthesis by the C5 pathway
1602	PC463-3	94	unknown protein (see 470-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	18/24	biological process unknown
1604	PC464-1	67	cytochrome P450	<i>Panax ginseng</i>	BAD15331	17/21	electron transport
1605	PC464-2	67	cytochrome P450	<i>Panax ginseng</i>	BAD15331	17/21	electron transport
1606	PC464-3	67	cytochrome P450	<i>Panax ginseng</i>	BAD15331	17/21	electron transport
1607	PC464-4	67	cytochrome P450	<i>Panax ginseng</i>	BAD15331	17/21	electron transport
1609	PC465-2	71	cytochrome P450	<i>Panax ginseng</i>	BAD15331	19/23	electron transport
1624	PC470-1	191	unknown protein (see 471-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/61	biological process unknown
1625	PC470-2	191	unknown protein (see 471-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/61	biological process unknown
1626	PC470-3	191	unknown protein (see 471-3)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	At2g46150	31/61	biological process unknown



















2825	PC810-3	72	CYP76C1; heme binding / iron ion binding / monooxygenase	Arabidopsis thaliana	At2g45560	16/23	electron transport
2826	PC810-4	90	carbohydrate oxidase (see 784)	Lactuca sativa	AAL77102	22/28	electron transport
2827	PC811-1	468	unknown protein	Oryza sativa	NP_914373	88/139	-
2828	PC811-2	468	unknown protein	Oryza sativa	NP_914373	89/139	-
2829	PC811-3	140	expressed protein (see 758-1)	Arabidopsis thaliana	At2g01600	34/39	N-terminal protein myristoylation
2830	PC811-4	443	transporter	Arabidopsis thaliana	At4g12650	64/104	transport
2831	PC812-1	358	PD1-like protein	Quercus suber	CAC87937	27/75	electron transport
2832	PC812-2	346	pleiotropic drug resistance (PDR) like protein (see 523-3)	Nicotiana tabacum	BAB92011	29/38	general defense
2833	PC812-3	350	putative xyloglucanase inhibitor (see 786-1)	Solanum tuberosum	AAP84703	47/69	proteolysis
2834	PC812-4	356	putative xyloglucanase inhibitor (see 786-1)	Solanum tuberosum	AAP84703	84/118	proteolysis
2835	PC813-1	316	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g15395	29/45	biological process unknown
2836	PC813-2	317	ALATS (ALANYL-TRNA SYNTHETASE)	Arabidopsis thaliana	At1g50200	28/35	alanyl-tRNA aminoacylation
2840	PC814-2	232	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At5g14310	17/18	biological process unknown
2841	PC814-3	230	RNA binding / nucleic acid binding	Arabidopsis thaliana	At3g52120	51/94	RNA processing
2842	PC814-4	233	RNA binding / nucleic acid binding	Arabidopsis thaliana	At3g52120	44/63	RNA processing
2843	PC815-1	204	putative 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g06650	25/51	-
2844	PC815-2	205	putative 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g06650	30/65	-
2845	PC815-3	205	putative 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g06650	30/65	-
2846	PC815-4	205	putative 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase	Arabidopsis thaliana	At1g06650	25/51	-
2847	PC816-1	193	nectarin 5	Nicotiana langsdorffii x Nicotiana glauca	AAP30840	35/63	electron transport
2848	PC816-2	193	nectarin 5	Nicotiana langsdorffii x Nicotiana glauca	AAP30840	35/63	electron transport
2849	PC816-3	188	expressed protein	Arabidopsis thaliana	At1g13360	20/28	-
2850	PC816-4	193	nectarin 5	Nicotiana langsdorffii x Nicotiana glauca	AAP30840	35/63	electron transport
2851	PC817-1	170	unknown protein	Arabidopsis thaliana	At3g14870	16/25	biological process unknown
2852	PC817-2	173	EMB2386 (see 396-2)	Arabidopsis thaliana	At1g02780	24/25	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
2853	PC817-3	171	EMB2386 (see 396-2)	Arabidopsis thaliana	At1g02780	24/25	protein biosynthesis, ribosome biogenesis
2855	PC818-1	122	unknown protein (see 820-4)	Arabidopsis thaliana	At1g18740	19/37	biological process unknown
2856	PC818-2	122	unknown protein (see 820-4)	Arabidopsis thaliana	At1g18740	20/37	biological process unknown
2857	PC818-3	124	unknown protein (see 820-1)	Arabidopsis thaliana	At1g74450	21/39	biological process unknown
2858	PC818-4	113	acidic cellulase (EC 3.2.1.4) (see 819-1)	Citrus sinensis	AAB65155	25/36	carbohydrate metabolism
2859	PC819-1	114	acidic cellulase (EC 3.2.1.4) (see 820-2)	Citrus sinensis	AAB65155	26/36	carbohydrate metabolism
2860	PC819-2	117	stress enhanced protein 2 (SEP2)	Arabidopsis thaliana	At2g21970	25/38	photosynthesis light harvesting
2861	PC819-3	119	stress enhanced protein 2 (SEP2)	Arabidopsis thaliana	At2g21970	26/31	photosynthesis light harvesting
2862	PC819-4	119	stress enhanced protein 2 (SEP2)	Arabidopsis thaliana	At2g21970	26/31	photosynthesis light harvesting
2863	PC820-1	120	unknown protein (see 818-3)	Arabidopsis thaliana	At1g74450	18/34	biological process unknown
2864	PC820-2	114	acidic cellulase (EC 3.2.1.4) (see 818-4)	Citrus sinensis	AAB65155	25/36	carbohydrate metabolism
2865	PC820-3	123	unknown protein (see 818-3)	Arabidopsis thaliana	At1g74450	18/40	biological process unknown
2866	PC820-4	124	unknown protein (see 818-1)	Arabidopsis thaliana	At1g18740	16/28	biological process unknown
2871	PC822-1	555	AGO4-1 (see 823-4)	Nicotiana benthamiana	ABC61504	87/187	-
2872	PC822-2	555	AGO4-1 (see 823-4)	Nicotiana benthamiana	ABC61504	85/125	-
2873	PC822-3	566	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At5g01850	133/145	protein amino acid phosphorylation
2874	PC822-4	564	protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase	Arabidopsis thaliana	At5g01850	126/136	protein amino acid phosphorylation
2877	PC823-3	555	AGO4-2 or AGO4-1	Nicotiana benthamiana	ABC61505	126/180	-
2878	PC823-4	554	AGO4-1	Nicotiana benthamiana	ABC61504	76/115	-
2880	PC824-2	222	DNA-binding protein WRKY 3	Petroselinum crispum	S72445	34/38	regulation of transcription
2882	PC824-4	342	Trypsin family protein, expressed	Oryza sativa	ABA92346	31/85	proteolysis
2883	PC825-1	243	S. cerevisiae SEC31-like 2 isoform a	Homo sapiens	NP_056305	17/38	-
2885	PC825-3	248	ATP-sulfurylase	Allium cepa	AAF18998	27/35	sulfate assimilation
2886	PC825-4	243	nucleotide binding / transmembrane receptor	Arabidopsis thaliana	At5g17970	17/36	apoptosis; defense response; defense response to pathogen
2887	PC826-1	235	Tyr-DC (see 312-1)	Petroselinum crispum	AAA33861	39/65	-
2888	PC826-2	224	putative oxysterol binding protein	Oryza sativa	AAM97165	54/74	steroid metabolism
2890	PC826-4	236	polygalacturonase inhibiting protein	Prunus persica	AAQ56728	37/69	-
2891	PC827-1	224	putative oxysterol binding protein	Oryza sativa	AAM97165	56/74	steroid metabolism
2893	PC827-3	234	GDP dissociation inhibitor	Medicago truncatula	CAF02075	31/50	protein transport; regulation of GTPase activity
2898	PC828-4	224	putative oxysterol binding protein	Oryza sativa	AAM97165	49/74	steroid metabolism
2902	PC829-4	176	patatin-like protein 3 (see 521-1-1)	Nicotiana tabacum	AAF98369	26/57	lipid metabolism
2903	PC830-1	139	no apical meristem (NAM)-like protein (see 808-2)	Glycine max	AAN03466	30/45	regulation of transcription
2904	PC830-2	139	no apical meristem (NAM)-like protein (see 808-2)	Glycine max	AAN03466	29/44	regulation of transcription
2911	PC832-1	276	ATCDPK1; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase	Arabidopsis thaliana	At1g18890	19/26	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2912	PC832-2	277	CPK30; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (see 701-2-1)	Arabidopsis thaliana	At1g74740	19/27	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2913	PC832-3	278	CPK30; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (see 701-2-1)	Arabidopsis thaliana	At1g74740	23/32	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2914	PC832-4	276	CPK30; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (see 701-2-1)	Arabidopsis thaliana	At1g74740	23/40	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2915	PC833-1	207	epoxide hydrolase	Nicotiana tabacum	AAB02006	23/40	aromatic compound metabolism
2916	PC833-2	276	CPK30; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (see 832-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74740	19/30	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2917	PC833-3	214	putative transmembrane transport protein	Streptomyces avermitilis	NP_824731	17/46	-
2918	PC833-4	276	CPK30; calcium- and calmodulin-dependent protein kinase (see 832-2)	Arabidopsis thaliana	At1g74740	23/32	abscisic acid mediated signaling; N-terminal protein myristoylation
2919	PC835-1	230	inner mitochondrial membrane protein	Arabidopsis thaliana	At1g72750	45/90	-
2921	PC835-3	230	inner mitochondrial membrane protein	Arabidopsis thaliana	At1g72750	49/90	-
2923	PC836-1	243	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein El17.1 (see 256-4)	Petroselinum crispum	AAG24521	48/61	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
2924	PC836-4	240	fatty acid desaturase/hydroxylase-like protein El17.1 (see 256-4)	Petroselinum crispum	AAG24521	22/26	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
2926	PC836-3	298	GTP binding	Arabidopsis thaliana	At1g08410	24/45	biological process unknown
2927	PC837-1	226	omega-6 fatty acid desaturase (EC 1.14.99.-) (see 355-1)	Petroselinum crispum	AAB80696	24/35	fatty acid biosynthesis; fatty acid desaturation
2929	PC837-3	230	GTP binding (see 735-1, protein level)	Arabidopsis thaliana	At3g62290	63/70	N-terminal protein myristoylation
2930	PC837-4	237	Epidermis-specific secreted glycoprotein EP1 precursor	Daucus carota	Q39688	41/48	water transport

Weitere Tabellen sind auf der beigefügten CD zu finden.

Dateinamen:

- Pc-Fragmentliste
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.3
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.4-A
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.4-B
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.5-A
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.5-B
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.8-A
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.8-B
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.9
- Tabellen als Ergänzung für Abb.3.10

Zu Abbildung 3.3: Induktion der cDNA-AFLP-Fragmente pc1 bis pc250 durch Pep13 und HrpZ<sub>PspH</sub>.

- Tabelle 7-6: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 1 h induziert wird.  
Tabelle 7-7: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.  
Tabelle 7-8: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.  
Tabelle 7-9: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 4 h induziert wird.  
Tabelle 7-10: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.  
Tabelle 7-11: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.

## Zu Abbildung 3.4: Induktion der cDNA-ALFP-Fragmente pc251 bis pc837.

- Tabelle 7-12: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-13: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-14: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-15: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-16: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-17: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-18: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-19: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-20: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-21: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-22: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-23: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-24: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-25: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-26: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-27: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-28: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-29: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-30: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13 und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-31: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13 und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-32: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13 und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-33: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>pp</sub> und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-34: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub> und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-35: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-36: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-37: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-38: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-39: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 und 4 h induziert wird.

Zu Abbildung 3.5: Verifikation der in cDNA-AFLP-Analysen beobachteten Induktion der Genexpression durch *Macroarray-Analysen*.

- Tabelle 7-40: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-41: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-42: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-43: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-44: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-45: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- Tabelle 7-46: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>PspH</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h induziert wird.
- 
- Tabelle 7-47: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-48: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-49: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-50: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-50: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>PspH</sub>-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-51: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-52: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>PspH</sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.
- Tabelle 7-53: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>PspH</sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h induziert wird.

Zu Abbildung 3.8: PAMP-induzierte Genexpression in *A. thaliana*-Pflanzen.

- Tabelle 7-54: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-55: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-56: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-57: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-58: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-59: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-60: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-61: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-62: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-63: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-64: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-65: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-66: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-67: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-68: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-69: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-70: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-71: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-72: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-73: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-74: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-75: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-76: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-77: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-78: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.

Zu Abbildung 3.9: PAMP-induzierte Genexpression in *Arabidopsis*-Protoplasten.

- Tabelle 7-79: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-80: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-81: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-82: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-83: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-84: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-85: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-86: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-87: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-88: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>pp</sub>-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-89: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-90: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.
- Tabelle 7-91: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>pp</sub>- und LPS-Behandlung nach 1 h in *A. thaliana*-Protoplasten induziert wird.

Zu Abbildung 3.10: Vergleich der durch Pep13 und weiterer PAMPs hervorgerufenen Induktion der Genexpression in *Arabidopsis*.

- Tabelle 7-92: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-93: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-94: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-95: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-96: Liste von Genen, deren Expression durch LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-97: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und flg22-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-98: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-99: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-100: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-101: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-102: Liste von Genen, deren Expression durch flg22- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-103: Liste von Genen, deren Expression durch HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-104: Liste von Genen, deren Expression durch NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-105: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, flg22- und HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-106: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-107: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-108: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-109: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-110: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-111: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-112: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-113: Liste von Genen, deren Expression durch flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.
- Tabelle 7-114: Liste von Genen, deren Expression durch Pep13-, flg22-, HrpZ<sub>P<sub>sph</sub></sub>-, NLP<sub>P<sub>p</sub></sub>- und LPS-Behandlung nach 4 h in *A. thaliana*-Pflanzen induziert wird.

## Vielen Dank!

Diese Arbeit wurde zunächst in der Zeit von November 2001 bis Dezember 2003 in der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale unter wissenschaftlicher Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel und anschließend in der Zeit von Januar 2004 bis Juni 2007 in der Abteilung Pflanzenbiochemie des Zentrums für Molekularbiologie der Pflanzen der Eberhard-Karls-Universität Tübingen unter wissenschaftlicher Anleitung von Prof. Dr. Thorsten Nürnberger angefertigt.

Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel und Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger danke ich für die Bereitstellung des jeweiligen Arbeitsplatzes, die guten Arbeitsmöglichkeiten am IPB und am ZMBP sowie ihre freundliche und fördernde Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Überlassung des spannenden Themas, für die vielen Ideen und Denkanstöße, seine für das Vorankommen dieser Arbeit nützlichen, fachlichen Ratschläge und seine zahlreichen Anregungen, die mir bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen haben.

Vielen Dank an Frau Prof. Jen Sheen (Massachusetts General Hospital, Boston, USA) für die Überlassung ihrer *Microarray*-Daten, an Herrn Dr. Markus Schmid (MPI für Entwicklungsbiologie, Tübingen) für die tatkräftige Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der *Pep13-Microarrays*, an Herrn Dr. Jörg Ziegler (IPB, Halle) für die Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung der *Macroarrays* und an Frau Regina Weiß (IPB, Halle) für ihren unermüdlichen Einsatz beim Sequenzieren der zahlreichen cDNA-AFLP-Fragmente.

Ein herzlicher Dank geht zum einen an die Mitglieder der Abteilung Stress- und Entwicklungsbiologie des IPB Halle für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre, insbesondere an Dr. Justin Lee, Dr. Michael Weber und Rita Schlichting, und zum anderen an die Arbeitsgruppe Pflanzenbiochemie des ZMBP in Tübingen, wobei mein besonderer Dank dem Labor N1 gilt: Dr. Andrea Gust, Stefan Engelhardt, Anita Brock, Heike Lenz, Laure Cabrillac und Roland Willmann - mit ihnen zusammen hat die Arbeit viel Freude gemacht. Mein spezieller Dank geht an Dr. Frédéric Brunner für die stete Motivierung und Diskussionsbereitschaft in Halle als auch in Tübingen. Last but not least herzlichen Dank an Sandra Postel – mit ihr wurde das Laufen am Donnerstagmorgen zum Abenteuer!

Und natürlich möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie für all ihre Unterstützung und Liebe bedanken. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Meine akademischen Lehrer waren:

Andreesen, Baier, Beyer, Böhm, Bonas, Breunig, Doege, Faust, Ferenz, Fischer B, Fischer G, Friedemann, Gattermann, Hübner, Humbeck, Ihl, König, Krauß, Kutchan-Zenk, Langner, Lenart, Lilie, Lindau, Mahn, Martinssen, Mathiszik, Miersch, Neef, Neubert, Nies, Nürnberger, Ohmann, Pohl, Raspert, Reuter, Rudolph, Scheel, Schmidt, Schmidt H, Schwartz, Ulbrich-Hofmann, Wahle, Wasternack, Weißflog.

# Lebenslauf

## Yvonne Gäbler

---

Geburtstagdatum/-ort: 24.07.1975 in Forst/Lausitz  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

## Schulbildung

---

1982-1990 6. Polytechnische Oberschule Forst  
1990-1992 Erweiterte Oberschule Forst  
1992-1993 Gymnasiale Oberstufe des Kreises Forst  
1993-1994 American Fork Highschool, Utah, USA  
1994-1996 Gymnasiale Oberstufe Forst mit Abschluss Allgemeine Hochschulreife

## Hochschulbildung

---

10/1996-10/2001 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
Abschlüsse: Vordiplom Biochemie 1998  
Diplomprüfung Biochemie 2000  
11/2000-09/2001 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie im Labor von Prof. Dr. Dierk Scheel  
Titel der Arbeit: „Anlage von cDNA-Microarrays der Petersilie (*Petroselinum crispum*)“  
11/2001-12/2003 Promotion am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle/Saale, im Labor von Herrn Prof. Dr. Dierk Scheel, unter Betreuung von Dr. Thorsten Nürnberger  
01/2004-10/2007 Fortsetzung der Promotion am Zentrum für Molekularbiologie der Pflanzen, Abteilung Pflanzenbiochemie, Universität Tübingen, unter Anleitung von Prof. Dr. Thorsten Nürnberger  
Titel der Arbeit: „Identifizierung und Charakterisierung von PAMP-induzierbaren Genen in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana*“