

**Physiologische und molekulare
Charakterisierung der Wirkung von
NEP1-ähnlichen Proteinen (NLPs) auf Pflanzen**

der Fakultät für Biologie
der EBERHARD KARLS UNIVERSITÄT TÜBINGEN

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

von

Isabell Küfner

aus Kronach

vorgelegte
Dissertation

2009

Tag der mündlichen Prüfung:

27.01.09

Dekan:

Prof. Dr. Hanspeter A. Mallot

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Claudia Oecking

3. Berichterstatter:

Prof. Dr. Dierk Scheel

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Immunität als übergeordnetes Prinzip in Eukaryoten.....	2
1.2	Pflanzliche Immunität.....	5
1.3	Auslöser pflanzlicher Immunität und zugehörige Rezeptoren	10
1.3.1	PAMPs	10
1.3.2	Effektoren	11
1.3.3	DAMPs	12
1.4	Phytotoxine als Virulenzfaktoren in Bakterien und Pilzen	13
1.5	NEP1-ähnliche Proteine.....	14
1.6	Ziele der Arbeit.....	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Material	18
2.1.1	Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen	18
2.1.2	Vektoren, Bakterien- und Hefestämme mit Anzuchtbedingungen	18
2.2	Molekularbiologische Methoden	19
2.2.1	Transformation von Bakterien	19
2.2.2	Transformation von <i>Pichia pastoris</i>	20
2.2.3	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	20
2.2.4	PCR.....	21
2.2.5	Gelelektrophorese	21
2.2.6	Aufreinigung von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.7	Gerichtete Mutagenese	22
2.2.8	Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen	22
2.2.9	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial.....	22
2.2.10	RT-PCR.....	23
2.2.11	Quantitative PCR-Analyse.....	23
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	24
2.3.1	Proteinextraktion aus Pflanzen.....	24
2.3.2	Heterologe Proteinexpression in <i>Pichia pastoris</i>	24
2.3.3	Heterologe Proteinexpression in <i>Pectobacterium carotovorum</i>	24
2.3.4	Proteinreinigung	25
2.3.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.3.6	Coomassie-Färbung von Proteingelen	27

2.3.7	Western Blotting	27
2.3.8	Isolierung von Plasmamembranen	28
2.3.9	Untersuchungen zur Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln	29
2.4	Zellbiologische Methoden	31
2.4.1	Präparation von Protoplasten aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.4.2	Proteinmarkierung mit Cy3 und Lokalisierung des markierten Proteins in Protoplasten	32
2.5	Biologische Studien	32
2.5.1	Virulenzexperimente auf Kartoffel	32
2.5.2	Suche nach NLP-insensitiven Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.5.3	Zelltodanalysen in Pflanzen.....	34
2.5.4	Ionenfreisetzung in <i>Nicotiana tabacum</i>	34
3	Ergebnisse	35
3.1	NLPs sind Virulenzfaktoren.....	35
3.2	Interaktion von NLPs mit Membranen.....	37
3.2.1	Suche nach NLP-insensitiven Mutanten in <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
3.2.2	Lokalisation des NLP-Wirkortes	40
3.2.3	Analyse der Plasmamembranintegrität nach NLP-Behandlung.....	43
3.2.4	Ansätze zur Identifizierung von NLP-Zielmolekülen	46
3.3	Mutagenese von NLP _{Pp} und NLP _{Pcc} zur Untersuchung konservierter Aminosäuren.....	50
3.3.1	Vergleich der Sequenzen aktiver NLPs und Auswahl putativ wichtiger Aminosäuren	50
3.3.2	Expression der mutierten Varianten von NLP _{Pp} und NLP _{Pcc}	52
3.3.3	Zelltodanalysen nach Infiltration der mutierten NLP _{Pp} -Proteine.....	52
3.3.4	Zelltodanalysen nach Infiltration der mutierten NLP _{Pcc} -Proteine.....	53
3.3.5	Ionenfreisetzung nach Infiltration der mutierten NLP _{Pcc} -Proteine	54
3.3.6	Strukturelle Eigenschaften von NLPs	56
3.3.7	Lage der konservierten Aminosäuren in der 3D-Struktur von NLP _{Pya} ..	57
3.3.8	Membranpermeabilisierung durch NLP _{Pcc} -Proteinvarianten	60
3.3.9	Rolle des Kations für die NLP-Aktivität.....	62
3.3.9.1	Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität von NLPs.....	62
3.3.9.2	Die Koordinierung des Ca ²⁺ -Ions durch D104	63
3.3.10	Die nekrotisierende Aktivität der NLPs bestimmt die Virulenz	65
3.3.11	Induktion abwehrspezifischer pflanzlicher Gene	67

4	Diskussion	70
4.1	NLPs – ein Beispiel für toxininduzierte Immunität in Pflanzen	70
4.1.1	Die nekrotisierende Aktivität von NLPs vermittelt Virulenz	70
4.1.2	NLPs sind membrandestabilisierende mikrobielle Toxine	72
4.1.3	Mechanismus zur Stimulation der pflanzlichen Immunität durch NLPs 73	
4.2	Molekularer Mechanismus der Toxinwirkung von NLPs	79
4.2.1	Strukturelle Ähnlichkeit von NLPs zu anderen Proteinen	79
4.2.2	Wirkort und molekularer Mechanismus der Toxinwirkung von NLPs...	81
4.2.3	NLP-Zielmoleküle sind nichtproteinöse Bestandteile der Plasmamembran	85
4.2.4	Mögliche Ursachen für die NLP-Spezifität für Dikotyledonen	90
4.3	Biologische Funktion von NLPs in biotrophen und Monokotyledonen befallenden Pathogenen	91
5	Zusammenfassung.....	94
6	Summary	95
7	Literatur.....	96
8	Anhang.....	116
8.1	Abkürzungen.....	116
8.2	Aminosäuren.....	118
8.3	Oligonukleotide	118
8.3.1	Klonierung in pPIC9K	118
8.3.2	Klonierung in pBluescript KS(-)	118
8.3.3	Echtzeit-PCR-Analyse	118
8.3.4	Zielgerichtete Mutagenese auf NLP _{Pp}	119
8.3.5	Zielgerichtete Mutagenese auf NLP _{Pcc}	120

1 Einleitung

In der Natur stellen Pflanzen nicht nur für Menschen und Tiere eine existenzielle Lebensgrundlage dar, auch verschiedenste Pathogene haben ihre Lebensweise an die Nutzung von Pflanzen angepasst.

Dazu haben Pathogene verschiedene Strategien entwickelt. Biotrophe Pathogene leben auf ihrem Wirt, ohne dabei seine Vitalität zu beeinträchtigen. Nekrotrophe Pathogene hingegen töten ihren Wirt, um sich von dem toten Pflanzengewebe zu ernähren. Hemibiotrophe Pathogene haben sich beide Strategien zu Nutze gemacht. In einer primären biotrophen Phase infizieren sie den Wirt und breiten sich auf ihm aus, später erfolgt ein Übergang zu nekrotrophem Wachstum. Treten Infektionen solcher Pathogene bei Nutzpflanzen auf, können die damit verbundenen Ernteeinbußen zu erheblichen wirtschaftlichen Schäden führen. Mitte des 19. Jahrhunderts kam es in Irland sogar zu einer Hungersnot, der „Great Famine“ (1845-1849). Hauptverursacher war *Phytophthora infestans*, ein hemibiotropher Oomyzeten der Kraut- und Knollenfäule bei Kartoffeln hervorruft.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden NEP1-ähnliche Proteine aus vier pflanzlichen Pathogenen untersucht, welche eine nekrotrophe Wachstumsphase bevorzugen. Dabei handelt es sich um das nekrotrophe Bakterium *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (früher *Erwinia carotovora* subsp. *carotovorum*) sowie die hemibiotrophen Oomyzeten *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora sojae* und *Pythium aphanidermatum*. Wie auch *Phytophthora infestans* verursachen diese Organismen in ihren Wirtspflanzen mit Fäulnis verbundene Krankheiten.

Komplexe Vorgänge bestimmen, ob Pflanzen einen potentiellen Wirt oder Nicht-Wirt für Pathogene darstellen. Einerseits versuchen Pflanzen sich gegen angreifende Pathogene zu wehren, andererseits entwickeln Pathogene Strategien, um diese Abwehrreaktionen der Pflanzen zu umgehen und Nährstoffe und Biosynthesewege der Pflanze zu nutzen.

1.1 Immunität als übergeordnetes Prinzip in Eukaryoten

Von höheren Eukaryoten entwickelte Mechanismen zum Schutz gegen mikrobielle Infektionen werden allgemein als Immunität bezeichnet. Die Immunität beinhaltet die Erkennung von Pathogenen bzw. von pathogenspezifischen Molekülen sowie die anschließende Signaltransduktion, um erfolgreiche Abwehrreaktionen gegen die Krankheitserreger einzuleiten. Man unterscheidet dabei zwei Arten: 1. die angeborene Immunität, welche evolutionär älter ist und in allen eukaryotischen Organismen auftritt; 2. die evolutionär weitaus jüngere adaptive Immunität, die ausschließlich in kiefertragenden Wirbeltieren zu finden ist (Medzhitov und Janeway, 2000a; Medzhitov und Janeway, 2000b; Janeway und Medzhitov, 2002; Medzhitov und Janeway, 2002; Borghesi und Milcarek, 2007). Letztere erfordert ein komplexes Zusammenspiel spezialisierter Zellen, wie beispielsweise B-Lymphozyten und T-Lymphozyten, um hochspezifische Rezeptoren wie Immunglobuline oder T-Zellrezeptoren zu produzieren. Dafür ist aber die Produktion einer nichtlimitierten Anzahl hochvariabler Rezeptoren möglich. Dies geschieht hauptsächlich durch die Umstrukturierung von Rezeptorgensegmenten in somatischen Zellen, was auch als klonale Selektion bezeichnet wird. Die so entstehenden Rezeptoren können detaillierte Epitope fremder Antigene perzipieren. Ein weiterer Vorteil ist, dass durch das adaptive Immunsystem auch eine Art immunologisches Gedächtnis garantiert wird und somit eine zweite Infektion schneller bekämpft werden kann. Nachteile dieser Art der Immunität sind jedoch, dass Effektormoleküle bei einer Erstinfektion nur verzögert aktiviert werden und während der individuellen somatischen Selektion Fehler auftreten können. Solche Fehler können zu Allergien und Autoimmunkrankheiten führen.

Die angeborene Immunität wurde erstmals in den späten 80er Jahren für Tiere beschrieben (Janeway, 1989). Sie stellt eine universelle Basisresistenz dar, die auch notwendig ist, um die adaptive Immunabwehr zu stimulieren. Denn letztere findet nur statt, wenn ein Pathogen vorher durch das angeborene Immunsystem detektiert wurde (Medzhitov und Janeway, 1998b; Medzhitov und Janeway, 2000a). Im Gegenteil zur adaptiven Immunität kann die angeborene Immunität von jeder Zelle autonom angewendet werden. Dabei werden sowohl von Tieren als auch von Pflanzen ähnliche Module verwendet. (Medzhitov und Janeway, 1998a; Hoffmann *et al.*, 1999; Nürnberger *et al.*, 2004; Staal und Dixelius, 2007; Rosenstiel *et al.*, 2008). Die Rezeptoren durchlaufen hier keine somatische

Rekombination, sondern sind im Genom fixiert. Das ermöglicht eine schnellere Aktivierung von Abwehrreaktionen als bei der adaptiven Immunität. Außerdem unterliegen die Rezeptoren einem evolutionären Selektionsdruck, weshalb Fehler bei dieser Art der Immunität höchst selten sind. Durch die fehlende spezifische Adaption ist erstens die Anzahl der Rezeptoren wesentlich geringer als bei der adaptiven Immunität, zweitens werden keine Details von molekularen Strukturen erkannt, sondern unter Pathogenen verbreitete, molekulare Muster. Demnach werden die Rezeptoren auch als Mustererkennungsrezeptoren bezeichnet (**p**attern **r**ecognition **r**eceptors, PRRs). Die Muster, auch pathogenassoziierte molekulare Muster (**p**athogen-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns, PAMPs) oder mikrobeassoziierte molekulare Muster (**m**icrobe-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns, MAMPs) genannt, sind konstitutive Epitope, die oft innerhalb einer ganzen Klasse von Pathogenen hochkonserviert sind. Sie sind von essentieller physiologischer oder struktureller Bedeutung für den mikrobiellen Organismus und kommen in dieser Form nicht im Wirtsorganismus vor (Janeway, 1989; Medzhitov, 2001; Janeway und Medzhitov, 2002; Medzhitov, 2007). Dadurch ist es dem Wirt möglich, zwischen nichtinfektiösen eigenen Bestandteilen (non-infectious self) und infektiösen fremden Bestandteilen (infectious non-self) zu unterscheiden (Janeway, 1992; Medzhitov und Janeway, 2002). Ubiquitär erkannte PAMPs sind beispielsweise eubakterielles Flagellin, Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien, Peptidoglykan grampositiver Bakterien, Chitin oder Mannan der pilzlichen Zellwand und unmethylierte CpG-DNA (Aderem und Hume, 2000; Aderem und Ulevitch, 2000; Girardin *et al.*, 2002). Bei den PRRs unterscheidet man zwischen membrangebundenen Rezeptoren zur extrazellulären Wahrnehmung von PAMPs und intrazellulären Rezeptoren (Akira und Takeda, 2004; Akira, 2006; Meylan *et al.*, 2006). Die membrangebundenen Rezeptoren, auch Toll ähnliche Rezeptoren (**T**oll-**l**ike **r**eceptors, TLRs) genannt, waren die ersten identifizierten PRRs und wurden nach dem ersten charakterisierten Rezeptor dieser Art benannt, dem Toll-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* (Lemaitre *et al.*, 1996; Medzhitov *et al.*, 1997; Medzhitov, 2001). In Tieren bestehen sie aus einer leucinreichen extrazellulären Domäne (**l**eucin **r**ich **r**epeat **d**omain, LRR) zur Bindung des PAMPs, einer Transmembrandomäne sowie einer zytoplasmatischen Signaltransduktionsdomäne (**T**oll/**I**nterleukin **1** **R**ezeptordomäne (TIR)) (Underhill und Ozinsky, 2002; Akira und Takeda, 2004; Cook *et al.*, 2004; Akira, 2006). Bei Bindung eines Ligan-

den erfolgt eine Dimerisierung der Rezeptoren sowie eine Signalweiterleitung über TIR-Domänen-enthaltende Adaptorproteine wie MyD88 (**Myeloid differentiation primary response gene 88**) und Kinasen wie IRAK (**I**nterleukin-**r**eceptor-**a**ssociated **k**inase). Schließlich kommt es zur Aktivierung des Inflammasoms, zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und damit zur Einleitung von Entzündungsreaktionen. Pflanzliche membrangebundene PRRs unterscheiden sich leicht von den tierischen, da sie anstatt einer TIR-Domäne z. T. eine Kinasedomäne der IRAK-Familie enthalten. Außerdem kommt es vor, dass trotz Perzeption identischer PAMPs in Tieren und Pflanzen unterschiedliche Minimalmotive gebunden werden, wie beispielsweise bei der Perzeption von Flagellin (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Donnelly und Steiner, 2002; Smith *et al.*, 2003).

Die zytosolischen Rezeptoren werden unterteilt in NOD (**n**ucleotide **b**inding and **o**ligomerisation **d**omain)-ähnliche Rezeptoren (**N**OD-like **r**eceptors, NLRs) und RIG (**r**etinoic acid **i**nducible **g**ene **I**)-ähnlichen Rezeptoren (**R**IG-like **r**eceptors, RLRs) (Fritz und Girardin, 2005; Inohara *et al.*, 2005; Akira *et al.*, 2006; Meylan *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007; Dostert *et al.*, 2008a). NLRs bestehen aus einer N-terminalen effektorbindenden Domäne (**c**aspase **r**ecruitment **d**omain (CARD), **p**yrin **d**omain (PYD) oder **b**aculovirus **i**nhibitor **r**epeat (BIR)), einer Nukleotidbinde- und Oligomerisierungsdomäne und einer variablen Anzahl von C-terminalen leucinreichen Wiederholungen. Auch hier wird die Einleitung der Entzündungsreaktion vermittelt, und zwar über die Aktivierung von Caspasen (cysteine-aspartic acid proteases). NLR-enthaltende Komplexe, welche die Aktivierung von Caspasen auslösen, werden allgemein auch als Inflammasome bezeichnet (Martinon *et al.*, 2002; Petrilli *et al.*, 2005; Ogura *et al.*, 2006; Mariathasan und Monack, 2007; Sutterwala *et al.*, 2007). RLRs dienen als Sensoren für virale RNA und bestehen aus einer N-terminalen CARD-Domäne und einer C-terminalen RNA-Helikase-Domäne (Meylan und Tschopp, 2006; Meylan *et al.*, 2006). In der pflanzlichen Immunität treten ebenfalls Rezeptoren auf, die den NLRs ähnlich sind. Hierbei handelt es sich um die zytosolischen NBS (**n**uclear **b**inding **s**ite)-LRR-Proteine der effektorvermittelten Immunität, denen jedoch die N-terminale Binde-domäne der tierischen NLRs fehlt (Jones und Dangl, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007; Rosenstiel *et al.*, 2008).

In Tieren wurde in den letzten Jahren beobachtet, dass das angeborene Immunsystem nicht nur nach dem „infectious non-self“-Modell unter Beteiligung von

Pathogenen aktiviert werden kann, sondern auch durch Zellschäden, wie sie bei Verletzungen, Tumorerkrankungen oder auch bei Gewebetransplantationen auftreten. Hierbei kommt es zur Freisetzung endogener Gefahrensignale aus infizierten oder nekrotischen Zellen, die genau wie PAMPs von PRRs perzipiert werden können (Matzinger, 1994; Gallucci und Matzinger, 2001; Karin, 2006; Petrilli *et al.*, 2007). Sie werden entsprechend der PAMP-Nomenklatur als schadensassoziierte molekulare Muster (**damage-associated molecular patterns**, DAMPs) oder auch als Alarmine bezeichnet (Seong und Matzinger, 2004; Oppenheim und Yang, 2005; Bianchi, 2007). Tierische DAMPs sind z. B. Hitzeschockproteine, HMGB1 (**high-mobility group box 1 protein**) oder auch nicht-proteinöse Substanzen wie DNA oder ATP und membranreizende Substanzen wie kristalline Harnsäure oder Asbest (Bianchi, 2007; Dostert *et al.*, 2008b; Kono und Rock, 2008).

Aufgrund der Verwendung ähnlicher Module in Pflanzen und Tieren wurde zuerst eine divergente Entwicklung der Immunsysteme postuliert. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass sich die beiden Perzeptionsmechanismen eher konvergent, d. h. unabhängig voneinander, entwickelt haben. (Nürnberg *et al.*, 2004; Ausubel, 2005; Zipfel und Felix, 2005). So wurden bis heute keine homologen Proteine zu pflanzlichen LRR-Rezeptoren in einzelligen eukaryotischen Organismen identifiziert. Des Weiteren wird Flagellin zwar von Tieren und Pflanzen als PAMP erkannt, jedoch werden unterschiedliche Domänen des Proteins vom jeweiligen Rezeptor gebunden (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Donnelly und Steiner, 2002). Außerdem treten trotz ähnlicher Gesamtstruktur tierischer und pflanzlicher PRRs Unterschiede bezüglich der zytoplasmatischen Domänen auf (Ausubel, 2005).

1.2 Pflanzliche Immunität

Als sessile Organismen sind Pflanzen Umweltbedingungen besonders ausgesetzt, so auch den Angriffen von phytopathogenen Mikroorganismen. Erste Mechanismen, um das Anlagern und Eindringen solcher Angreifer abzuwehren sind mechanischer Schutz, wie z. B. durch die Cuticula und die Zellwand oder chemische Barrieren wie antibiotische Lipidtransferproteine und Sekundärmetabolite (van Etten *et al.*, 1994; Heath, 2000b; Dixon, 2001). Nach Überwindung

dieser primären Hindernisse steht Pflanzen, im Gegenteil zu Tieren, lediglich das angeborene Immunsystem zur Abwehr zur Verfügung. Das heißt, jede einzelne Zelle muss in der Lage sein, Pathogene eigenständig zu erkennen und abzuwehren.

Nach den heutigen Kenntnissen wird beim pflanzlichen Immunsystem zwischen zwei Arten der Abwehr unterschieden: der PAMP-vermittelten Immunität (**PAMP-triggered immunity**, PTI) und der effektorvermittelten Immunität (**effector-triggered immunity**, ETI). Jones und Dangl (2006) haben diese Unterteilung mit Hilfe eines Zickzackmodells umfassend umschrieben (Abb. 1-1). PTI stellt die primäre Immunreaktion und somit eine Basisresistenz der Pflanze gegen Pathogene dar. Früher wurde sie auch als Nicht-Wirts-Resistenz resistenter Pflanzenspezies bzw. Basisresistenz susceptibler Kultivare von Wirtspflanzen bezeichnet. Ausgelöst wird sie durch die Erkennung von PAMPs mittels PRRs an der Zelloberfläche, welche Ähnlichkeit zu den tierischen TLRs zeigen. Zum heutigen Zeitpunkt sind zwei Arten von membrangebundenen Rezeptoren bekannt: rezeptorähnliche Kinasen (**receptor-like kinases**, RLKs) und rezeptorähnliche Proteine (**receptor-like proteins**, RLPs), denen die Kinasedomäne fehlt (Bittel und Robatzek, 2007; Zipfel, 2008). Innerhalb dieser Klassen unterscheidet sich, ob zur Ligandenbindung eine leucinreiche Wiederholungsdomäne oder eine LysM-Domäne verwendet wird.

Nach der Perzeption von PAMPs wird ein komplexes Abwehrverhalten eingeleitet (Asai *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004; Altenbach und Robatzek, 2007; Schwessinger und Zipfel, 2008). Dieses Abwehrverhalten beginnt innerhalb von Sekunden bis Minuten mit Ionenströmen über die Plasmamembran. Das heißt, es findet ein verstärkter Einstrom von Ca^{2+} und H^+ sowie Ausstrom von K^+ und Cl^- statt, was zu einer extrazellulären Alkalisierung sowie zur Aktivierung kalziumabhängiger Proteinkinasen (**calcium-dependent protein kinases**, CDPKs) führt (Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 2000). Ebenfalls kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies im Apoplasten, dem sogenannten „oxidative burst“ (Blume *et al.*, 2000). Diese haben zum einen antimikrobielle Wirkung und dienen zum anderen als Signal zur Aktivierung von Abwehrgenen in angrenzenden Zellen und vermitteln durch die Quervernetzung der Zellwand einen verstärkten mechanischen Schutz (Bradley *et al.*, 1992; Brisson *et al.*, 1994; Lamb und Dixon, 1997). Das Anschalten von mitogenaktivierten Proteinkinase-Kaskaden (**mitogen activated protein kinase**, MAPK) führt zur Regulation von Transkrip-

tionsfaktoren, wodurch es etwa ab 30 Minuten nach der PAMP-Erkennung zu ersten transkriptionellen Veränderungen abwehrassoziierter Gene kommt (Nürnberg und Scheel, 2001; Zhang und Klessig, 2001; Jonak *et al.*, 2002). Die in den folgenden Stunden daraus resultierenden Reaktionen sind unter anderem die Regulation des Phytohormonspiegels, das Schließen der Stomata sowie die Produktion antimikrobieller Substanzen, welche größtenteils aus dem Sekundärstoffwechsel stammen und als Phytoalexine bezeichnet werden (Feys und Parker, 2000; Kunkel und Brooks, 2002). Des Weiteren kann es zur Verstärkung von Zellwänden durch Lignifizierung, Suberinisierung und Kalloseablagerungen kommen. Zur Zerstörung der Zellwandstruktur pilzlicher Pathogene werden außerdem Enzyme wie Chitinasen oder Glukanasen produziert.

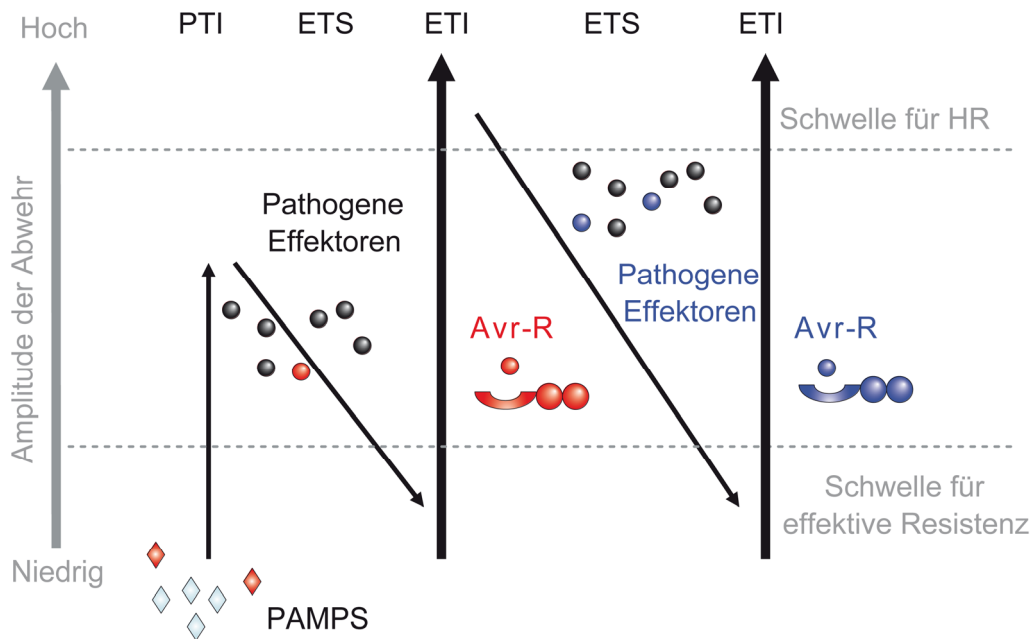


Abb. 1-1: Zickzackmodell des pflanzlichen Immunsystems.

Das Erkennen von PAMPs (rote Rauten) durch PRRs führt zum Auslösen der PAMP-vermittelten Immunität (PTI). Haben Pathogene Effektoren (graue Kreise) entwickelt, welche die PTI unterdrücken, kommt es zur effektorvermittelten Anfälligkeit (ETS). Wird ein Effektor (Avr-Protein, roter Kreis) wiederum von pflanzlichen Rezeptoren (R-Protein, rot) erkannt, spricht man von effektorvermittelter Immunität (ETI), welche eine stärkere Version der PTI darstellt und oft mit dem hypersensitiven Zelltod (HR) endet. Der Evolutionsdruck kann dann zu gegenseitiger Anpassung führen, welche sich in neuen Effektoren und Rezeptoren (blau) äußert, sodass ein ständiges Wechselspiel von ETS und ETI stattfindet. Aus Jones und Dangl, 2006.

Einige Pathogene haben erfolgreiche Strategien entwickelt, um pflanzliche Abwehrmechanismen zu umgehen. Die Unterdrückung der PTI durch Effektoren stellt eine solche Möglichkeit für Pathogene dar. Man spricht somit von der sogenannten effektorvermittelten Suszeptibilität (**effector-triggered susceptibility, ETS**). Solche Effektoren tragen wesentlich zur Virulenz des zugehörigen Pathogens bei und werden deshalb auch als Virulenz- oder Pathogenizitätsfaktoren bezeichnet. Sie erreichen die Hemmung der PTI in der Regel durch das Nachahmen pflanzlicher Komponenten oder auch durch eine Hemmung zentraler, zellulärer Funktionen des Wirts (Abramovitch und Martin, 2004; Mudgett, 2005; Abramovitch *et al.*, 2006; Grant *et al.*, 2006). Zu den PTI-unterdrückenden Substanzen werden zwar auch nichtproteinöse Toxine gezählt, wie beispielsweise pflanzenhormonimitierende Substanzen (siehe 1.4), größtenteils handelt es sich aber um proteinöse Effektoren. Solche werden z. B. von phytopathogenen Bakterien mittels eines speziellen Sekretionsapparates, dem Typ III-Sekretionssystem, in die Pflanzenzelle geschleust. Dabei kann ein Bakterium bis zu 30 solcher Effektoren transduzieren (Chang *et al.*, 2005; Grant *et al.*, 2006; Block *et al.*, 2008). In eukaryotischen phytopathogenen Organismen hingegen existiert kein vergleichbares Sekretionssystem. Neben extrazellulär wirkenden Effektoren existieren aber auch hier Effektoren mit Zielmolekülen innerhalb der Zelle. Bei Oomyzeten wird die Aufnahme solcher Effektoren in die pflanzliche Wirtszelle durch ein spezielles Transduktionssignal vermittelt, das RxLR-dEER-Motiv. Der Mechanismus hierfür ist jedoch noch unbekannt (Morgan und Kamoun, 2007; Birch *et al.*, 2008; Govers und Bouwmeester, 2008).

Durch den evolutionären Selektionsdruck haben Pflanzen wiederum Strategien entwickelt, um solche Effektoren auszuschalten. Diese Abwehr stellt die zweite Stufe der pflanzlichen Immunabwehr dar, die effektorvermittelte Immunität (**effector-triggered immunity, ETI**). Die ETI verläuft ökotypen- oder kultivarspezifisch und ist daher auch unter der Bezeichnung Rassen-Kultivar-spezifische Resistenz bekannt. Hierbei erfolgt eine Perzeption von Effektoren durch intrazelluläre oder extrazelluläre Resistenz-Proteine (R-Proteine). Da dies die Avirulenz des Pathogens zur Folge hat, werden die Effektoren auch als Avirulenzproteine (Avr-Proteine) bezeichnet. Die Perzeption kann entweder direkt durch Interaktion der Avr-Proteine mit R-Proteinen oder indirekt durch die Erkennung der Wirkung von Avr-Proteinen auf pflanzliche Zielproteine erfolgen. Letzterer

Erkennungsmechanismus wird durch die „guard“-Hypothese beschrieben (Dangl und Jones, 2001; Jones und Dangl, 2006). Diese besagt, dass Avr-Proteine Ziel-moleküle des Wirts so verändern, dass dies in anfälligen Genotypen die Virulenz steigert. In resistenten Kultivaren einer ansonsten suszeptiblen Spezies wird ein so entstandenes pathogeninduziertes Muster modifizierter eigener Strukturen jedoch erkannt, aktiviert das zugehörige R-Protein und führt somit zur ETI. Unterschiedliche Effektoren können auch ein und dasselbe Zielmolekül auf unterschiedliche Weise modifizieren. So entstehen verschiedene Muster von modifizierten eigenen Strukturen, wodurch wiederum mehrere R-Proteine aktiviert werden können. In den meisten Fällen handelt es sich bei den R-Proteinen um Rezeptoren der NBS-LRR-Klasse, also um Proteine mit einer Nukleotidbindestelle und einer leucinreichen Wiederholungsdomäne. Interessanterweise zeigen diese NBS-LRR-Rezeptoren Ähnlichkeit zu intrazellulären PRRs aus Tieren, den NLRs (Rosenstiel *et al.*, 2008; Ting *et al.*, 2008; Ye und Ting, 2008).

Über die Signalübertragung zur Einleitung der ETI ist bisher wenig bekannt. Vermutlich werden NBS-LRRs durch Chaperone in perzeptionsbereitem Stadium im Zytosol gehalten, wobei die LRR-Domäne in Abwesenheit eines Liganden als negativer Regulator der NBS-Domäne dient (Schulze-Lefert, 2004; Holt *et al.*, 2005; Takken *et al.*, 2006). Die Abwehrreaktionen selbst verlaufen ähnlich wie die der PTI, jedoch schneller und stärker und lösen in der Regel den hypersensitiven Zelltod (**hypersensitive response**, HR) aus (Heath, 2000a; Greenberg und Yao, 2004; Jones und Dangl, 2006). Dieser ist auf die Infektionsstelle begrenzt und kann in manchen Fällen das Wachstum des Pathogens unterbinden. Zur spezifischen Einstellung der Abwehr gegen biotrophe oder nekrotrophe Pathogene muss außerdem auch der Phytohormonspiegel angepasst werden. Hierbei dienen Salicylsäure (SA) als lokales sowie systemisches Signal gegen biotrophe Erreger, Jasmonsäure (JA) und Ethylen als Wirkstoffe gegen nekrotrophe Erreger (Glazebrook, 2005).

Durch den Selektionsdruck gibt es in Populationen von Pflanzen und Pathogenen eine ständige Koevolution von ETS und ETI. Haben Pflanzen durch die Entwicklung von R-Proteinen Resistenzen gegenüber einem Pathogen erworben, so fördert dies wiederum die Selektion einer Pathogenpopulation, welche eine Mutation im Avr-Gen trägt oder neue Effektoren entwickelt hat. Im Gegensatz dazu werden im Laufe der Zeit diejenigen Pflanzen selektiert, welche durch

Anpassung an neue oder veränderte Effektoren im Vorteil sind. So existiert ein ständiges Wechselspiel der Anpassung, was auch die Varianz von Effektoren und R-Proteinen steigen lässt (Chisholm *et al.*, 2006; Jones und Dangl, 2006).

1.3 Auslöser pflanzlicher Immunität und zugehörige Rezeptoren

In Pflanzen ist ein breites Spektrum an Immunantwort auslösenden Faktoren aus phytopathogenen Organismen wie Bakterien, Oomyzeten und Pilzen bekannt. Viele von ihnen waren bereits als allgemeine Elicitoren pflanzlicher Abwehrreaktionen beschrieben, bevor man die Unterscheidung zwischen PAMPs und Effektoren eingeführt hat.

1.3.1 PAMPs

Das erste Molekül, welches eindeutig als PAMP definiert werden konnte, war Pep-13, eine 13-Aminosäuren-lange Sequenz einer kalziumabhängigen Zellwandtransglutaminase aus dem Oomyzeten *Phytophthora sojae* (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Nürnberger *et al.*, 2004). Es führt zur Einleitung von Abwehrmechanismen in Petersilie und Kartoffel. Für dieses PAMP wurde ein Bindeprotein in Petersiliezellen gefunden (Nennstiel *et al.*, 1998), die Isolierung des Rezeptors steht jedoch noch aus.

Das bekannteste und am besten untersuchte PAMP ist das eubakterielle Flagellin, welches von nahezu allen Pflanzen wahrgenommen wird (Felix *et al.*, 1999). Das erkannte Minimalmotiv, flg22, ist ein 22-Aminosäuren-langes Fragment des Proteins und unterscheidet sich deutlich vom Minimalmotiv das durch tierische Rezeptoren erkannt wird (Zipfel und Felix, 2005). Der Rezeptor dieses PAMPs wurde bereits identifiziert. Dabei handelt es sich um die LRR-Rezeptorkinase FLS2 (**f**lagellin **s**ensing 2) (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Chinchilla *et al.*, 2006). Die Signalweiterleitung zur Induktion der Abwehrreaktionen findet in *Arabidopsis thaliana* erst nach einer Interaktion von FLS2 mit einem Korezeptor statt, der LRR-Rezeptor-ähnlichen Kinase BAK1 (**B**RI1-**a**ssociated receptor **k**inase 1) (Chinchilla *et al.*, 2007). Ein weiterer PAMP-Rezeptor des LRR-Rezeptorkinasentyps wurde bisher nur in *A. thaliana* für den bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu identifiziert: EFR (**E**F-Tu-**R**eceptor). Das Minimalmotiv dieses PAMPs, elf18, wird

ausschließlich von einigen Brassicaceae erkannt (Kunze *et al.*, 2004; Zipfel *et al.*, 2006).

Ein anderer Rezeptortyp dient der Erkennung von Chitinfragmenten. Hierbei handelt es sich in Arabidopsis um CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1), einer Rezeptorkinase mit extrazellulärer LysM-Domäne zur Chitinbindung. In Reis wurde das LysM-Rezeptorprotein CEBiP (chitin elicitor-binding protein) als chitinbindendes Protein identifiziert, wobei die Mechanismen der Signaltransduktion noch ungeklärt sind (Kaku *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind auch für die Perzeption der pilzlichen Xylanase EIX (ethylene biosynthesis-inducing xylanase) in Tomate zwei LRR-Proteine identifiziert worden, die keine Kinasedomäne aufweisen (Ron und Avni, 2004).

Weitere bekannte PAMPs mit noch ungeklärtem Perzeptionsmechanismus sind unter anderem Lipopolysaccharide (LPS) als Membranbestandteile gramnegativer Bakterien, Peptidoglukane aus grampositiven Bakterien (Dow *et al.*, 2000; Zeidler *et al.*, 2004; Gust *et al.*, 2007) sowie bakterielle „cold-shock“-Proteine (Felix und Boller, 2003; Zipfel und Felix, 2005).

1.3.2 Effektoren

Pathogene Effektoren können entweder zur Anfälligkeit eines Wirts führen (ETS) oder zur Resistenz bestimmter Kultivare einer ansonsten suszeptiblen Spezies (ETI) (siehe 1.2).

Die am besten untersuchten Effektoren der ETS sind bakterielle Effektoren, wie beispielsweise AvrPto und AvrPtoB aus dem phytopathogenen Bakterium *Pseudomonas syringae* (Abramovitch *et al.*, 2003). Nach dem Einschleusen in die pflanzliche Zelle über das Typ III-Sekretionssystem interagieren diese Effektoren mit der Kinasedomäne pflanzlicher PRRs und mit BAK1, einer LRR-RLK, welche für zahlreiche PRRs als Korezeptor dient. Die Bildung von PRR/BAK1-Komplexen wird dadurch verhindert, so dass die Einleitung der PTI blockiert wird (He *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2008). Eine Besonderheit von AvrPtoB ist eine weitere Domäne, welche E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt und vermutlich an der Degradierung von Wirtsproteinen beteiligt ist. Dadurch kommt es zur Unterdrückung der HR (Abramovitch *et al.*, 2003; de Torres *et al.*, 2006; Janjusevic *et al.*, 2006). Solche Strategien zur Unterdrückung der pflanzlichen

Immunabwehr können zur Suszeptibilität der Pflanze führen. Die Effektoren dienen in diesem Fall als Virulenzfaktoren.

Effektoren können die Virulenz von Pathogenen jedoch auch entgegengesetzt beeinflussen und stellen folglich Avirulenzfaktoren dar. Dies tritt dann ein, wenn sie durch pflanzliche Rezeptoren direkt oder indirekt erkannt werden. Hierbei existieren R-Proteine zur extrazellulären Perzeption von Avr-Proteinen, wie die Cf-RLPs, welche Resistenz gegenüber den zugehörigen Avr-Proteinen aus dem Pilz *Cladosporium fulvum* vermitteln (Rivas und Thomas, 2005). Beim Großteil der R-Proteine handelt es sich allerdings um intrazelluläre NBS-LRR-Proteine. Zur direkten Interaktion zwischen Effektor und NBS-LRR-Protein kommt es z. B. bei AvrPto und dem R-Protein Pto in Tomate (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996) oder zwischen AvrL aus dem Lein-Rostpilz und dem entsprechenden R-Protein L in Lein (Dodds *et al.*, 2006). Ein typisches Beispiel für die „guard“-Hypothese, also die indirekte Perzeption eines Effektors durch „Überwachung“ von Veränderungen seines Zielmoleküls, ist die Interaktion von Effektoren bzw. von NBS-LRRs mit dem plasmamembranassoziierten Protein RIN4 (**RPM1-interacting protein 4**). Die bakteriellen Effektoren AvrRpm1 und AvrB verursachen beide eine Phosphorylierung von RIN4, was zur Aktivierung des NBS-LRR-Proteins RPM1 führt (Mackey *et al.*, 2002). Ein weiterer Effektor, die Cysteinprotease AvrRpt2, spaltet RIN4, wodurch das NBS-LRR-Protein RPS2 aktiviert wird (Axtell *et al.*, 2003; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey *et al.*, 2003; Chisholm *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Dies zeigt, dass verschiedene Effektoren gleiche Zielmoleküle durch unterschiedliche Mechanismen beeinflussen können. Diese verschiedenen Modifikationen ein und desselben Zielmoleküls können wiederum durch unterschiedliche Resistenzproteine wahrgenommen werden.

1.3.3 DAMPs

In Tieren wird die Stimulation der angeborenen Immunität auch durch endogene Gefahrensignale, die DAMPs erreicht (Matzinger, 2002; Matzinger, 2007). In Pflanzen gibt es gegenwärtig erst wenig Berichte über die Perzeption von DAMPs. Es wurde gezeigt, dass Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand, mögliche Produkte pathogener Enzyme, Immunreaktionen in Pflanzen aktivieren. Z. B. kommt es durch pilzliche hydrolytische Enzyme zur Freisetzung von Oligogalakturoniden

aus Pektin, welche in demethyliertem Zustand pflanzliche Abwehrreaktionen hervorrufen (Reymond *et al.*, 1995; Moscatiello *et al.*, 2006; Osorio *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden abwehrinduzierende Wirkungen durch Zellodextrine beobachtet, Abbauprodukte der Zellulose in Wein (Aziz *et al.*, 2007). Weiterhin existieren auch Hinweise, dass extrazelluläres ATP (Jeter *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006; Foresi *et al.*, 2007) sowie Veränderungen der Ionenhomöostase (Stäb und Ebel, 1987; Suzuki *et al.*, 1995; Jabs *et al.*, 1997; Takezawa, 1999) immunstimulierend wirken. Dies sind Verhältnisse, welche beispielsweise bei Membranschäden auftreten können. Über die Perzeption dieser Signale ist noch nichts bekannt.

1.4 Phytotoxine als Virulenzfaktoren in Bakterien und Pilzen

Neben PTI-unterdrückenden Effektoren produzieren Pathogene auch Toxine, um Pflanzen effektiver zu infizieren. Toxine verletzen Pflanzenzellen direkt und beeinflussen damit in der Regel den Verlauf der Krankheitsentwicklung oder der Symptome, die durch Pathogene hervorgerufen werden (Bender *et al.*, 1999). Kriterien, welche die Einordnung von Faktoren pflanzlicher Pathogene als Toxine bestimmen, wurden von Bender *et al.* (1999) zusammengefasst. Dabei gilt: 1. die Symptome müssen auch durch das gereinigte Toxin auslösbar sein; 2. es muss eine Korrelation zwischen der Toxinproduktion und der Pathogenität auftreten; 3. das Toxin muss während des aktiven Wachstums in Pflanzen produziert werden und 4. die Virulenz von Stämmen mit reduzierter oder fehlender Toxinproduktion muss vermindert sein.

Toxine pflanzlicher Pathogene sind weniger erforscht als im tierischen System und Übersichten in der Literatur sind rar (Daly und Deverall, 1983; Walton, 1996; Kimura *et al.*, 2001). Die molekularen Wirkmechanismen sind oft nicht bis ins Detail geklärt. Auswirkungen von Phytotoxinen können Nekrosen sein, manche verursachen aber auch nur Chlorosen oder beeinflussen metabolische Prozesse (Bender *et al.*, 1999). Generell lassen sich zwei Typen von Toxinen unterscheiden: niedermolekulare Toxine wie Polyketide, Terpenoide und Peptide oder höhermolekulare proteinöse Toxine. Ein bekanntes niedermolekulares Toxin in Pflanzen ist Coronatin, welches chlorotisierende Wirkung hat. Es wird von einigen phytopathogenen Stämmen der Gattung *Pseudomonas syringae* produziert (Bender *et al.*, 1999). Coronatin zeigt strukturelle Ähnlichkeiten zu Jasmonyl-I-Isoleucin und

aktiviert als dessen Agonist den Jasmonatsignalweg durch Bindung an den COI1-JAZ-Komplex (Katsir *et al.*, 2008). Eine Folge davon ist beispielsweise das Öffnen der Stomata, wodurch den Bakterien Zugang zum Pflanzengewebe gewährt wird (Brooks *et al.*, 2005; Melotto *et al.*, 2006).

Proteinöse Toxine in Pflanzen sind oft wirtsselektive Toxine, das heißt sie sind nur in pathogenspezifischen Wirtspflanzen aktiv (Agrios, 1997). Das am besten charakterisierte proteinöse Toxin ist Ptr ToxA aus *Pyrenophora tritici-repentis*. Nach Abspaltung einer zur korrekten Faltung notwendigen Prodomäne löst das reife Protein in sensitivem Weizen Nekrosen aus (Ballance *et al.*, 1989; Tomas *et al.*, 1990; Tuori *et al.*, 1995; Tuori *et al.*, 2000). Hierfür erfolgt zuerst die Internalisierung in Mesophyllzellen sensitiver Kultivare und anschließend eine Lokalisierung an Chloroplasten (Manning und Ciuffetti, 2005). Kürzlich wurde hier ein putativer Rezeptor, das ToxA-Bindeprotein ToxABP1 identifiziert (Manning *et al.*, 2007).

1.5 NEP1-ähnliche Proteine

NEP1-ähnliche Proteine oder NLPs (**NEP1-like Proteins**) wurden nach dem ersten identifizierten Protein dieser Art benannt, NEP1 (**N**ecrosis- and **e**thylene-inducing **p**eptide 1) aus *Fusarium oxysporum* (Bailey, 1995). Erstmals beschrieben wurden diese Proteine aufgrund ihrer Eigenschaft, in zweikeimblättrigen Pflanzen Reaktionen der pflanzlichen Immunabwehr auszulösen.

Die Proteinfamilie der NLPs umfasst Mitglieder aus Oomyzeten, Pilzen und Bakterien (Abb. 1-2 A). In Tieren, Pflanzen oder anderen Organismen sind NLPs hingegen nicht vorhanden. Neben NEP1 aus *Fusarium oxysporum* wurden weitere aktive NLPs identifiziert: NLP_{Pp} (NPP1 aus *Phytophthora parasitica*) (Fellbrich *et al.*, 2002), NLP_{Pi} (NPP1 aus *Phytophthora infestans*) (Fellbrich *et al.*, 2002), NLP_{Ps} (NIP aus *Phytophthora sojae*) (Qutob *et al.*, 2002), NLP_{Py} (PaNIE aus *Pythium aphanidermatum*) (Veit *et al.*, 2001), NLP_{Pcc} (NIP aus *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) (Mattinen *et al.*, 2004). All diese NLPs werden von Organismen produziert, deren Lebensweise ausschließlich nekrotroph oder hemibiotroph verläuft.

Die auffälligste Reaktion dikotyler Pflanzen auf NLP-Behandlung ist die Ausbildung von Nekrosen (Abb. 1-2 B und C). Solche Reaktionen wurden in mono-

kotylen Pflanzen sowie jeglichen anderen Organismen bislang nicht beobachtet. Weiterhin kommt es zur Auslösung einer komplexen Immunreaktion. Diese umfasst die Aktivierung von MAP-Kinasen, die Akkumulation von abwehrassozierten Transkripten sowie die Produktion von Phytoalexinen, Ethylen, reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und Kallose (Abb. 1-2 D) (Bailey, 1995; Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002; Keates *et al.*, 2003; Mattinen *et al.*, 2004).

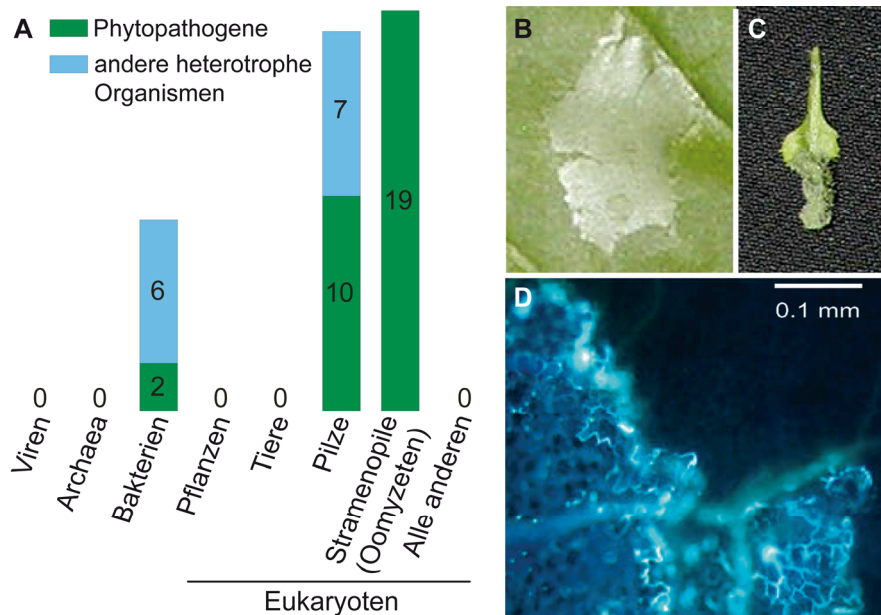


Abb. 1-2: NLP-enthaltende Organismen und pflanzliche Reaktionen auf NLPs.

Bisher wurden 44 NLP Sequenzen in 22 Spezies gefunden, davon 8 in Bakterien, 17 in Pilzen und 19 in Oomyzeten (A). Die meisten der Organismen sind Pflanzenpathogene (grün), die restlichen stellen andere heterotrophe Organismen dar (blau). Funktionelle NLPs vermitteln Zelltod in dikotylen Pflanzen wie *N. tabacum* (B) und *A. thaliana* (C). Darüber hinaus reagieren Dikotyledonen mit Abwehrreaktionen wie Kalloseablagerung (D). Aus Fellbrich *et al.* (2002) und Qutob *et al.* (2006).

Für pilzliche und bakterielle NLPs konnten außerdem virulenzfördernde Eigenschaften gezeigt werden. Der Pilz *Colletotrichum coccodes* zeigt normalerweise nur sehr schwache Virulenz auf *Abutilon theophrasti*. Durch heterologe Expression von NEP1 aus *Fusarium oxysporum* in *Colletotrichum coccodes* wird die Aggressivität des Pilzes jedoch enorm gesteigert, so dass die transgenen Pflanzen bereits nach zwei Tagen anstatt einer Woche heftige Fäulnis- und Zelltodsymptome zeigen (Amsellem *et al.*, 2002). Ebenso führt das Ausschalten von NLP_{Pcc} in *Pectobacterium carotovorum* zu reduzierter Virulenz auf Kartoffel (Mattinen *et al.*, 2004). Durch Überexpression von NLP_{Pcc} in der KO-Mutante kann der Phänotyp komplementiert und die Virulenz sogar noch leicht gesteigert

werden. Auch für aus Oomyzeten stammende NLPs gibt es Hinweise, dass sie zur Virulenz beitragen könnten. So scheint NLP_{Ps} ein wichtiger Anteil an der Infektion der Sojabohne durch *Phytophthora sojae* zuzukommen. Es wird von dem Pathogen hauptsächlich während des Übergangs von der biotrophen zur nekrotrophen Phase produziert, also genau während des Infektionszeitpunktes der Pflanzen (Qutob *et al.*, 2002). Beweise für einen direkten Beitrag von NLPs zur Virulenz von Oomyzeten und damit einer Funktion als Virulenzfaktor stehen allerdings noch aus.

Mikrobielle NLPs sind sekretierte Proteine mit einer Größe von ungefähr 24 kDa. Sie weisen eine hohe Sequenzhomologie untereinander auf und werden deshalb als funktionell homolog eingestuft. Es tritt jedoch weder Ähnlichkeit zu Proteinen mit bekannter Funktion auf noch beinhalten NLPs funktionell bekannte Domänen. Über strukturelle Eigenschaften und essentielle Motive der NLPs ist soweit wenig bekannt. Funktionell untersucht wurden zwei hochkonservierte Cysteine. Mutationen dieser Cysteine, welche vermutlich für die Ausbildung einer intramolekularen Disulfidbrücke wichtig sind, führen in NLP_{Pp} zum Funktionsverlust des Proteins (Fellbrich *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde die Anwesenheit eines hochkonservierten Motivs aus den Aminosäuren GHRHDWE beschrieben (Pemberton und Salmond, 2004). Die funktionelle Relevanz dieses Heptapeptides wurde bisher allerdings nicht charakterisiert.

1.6 Ziele der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Relevanz von NLPs für Pathogene untersucht werden. Dazu sollte zunächst geklärt werden, ob neben NLPs aus Pilzen und Bakterien auch NLPs aus Oomyceten Virulenz vermitteln.

Des Weiteren sollten Wirkort und Wirkmechanismus von NLPs näher untersucht werden. Zur Identifizierung von Zielmolekülen der NLPs sollte einerseits mit Hilfe reverser Genetik nach NLP-insensitiven Pflanzen gesucht werden. Andererseits sollte durch Lokalisationsstudien herausgefunden werden, ob NLPs extrazellulär, intrazellulär oder abhängig von pflanzlichen Membranen agieren. Nach Bestimmung des Zielkompartiments sollten durch zellbiologische und biochemische Methoden die Auswirkungen von NLPs auf zellulärer Ebene analysiert werden sowie die molekularen Eigenschaften von NLP-Interaktoren eingegrenzt werden.

Um Kenntnisse über funktionell wichtige Bereiche der NLPs zu erlangen, sollten hochkonservierte Aminosäuren aktiver NLPs mutiert werden. Diese mutierten Proteine sollten bezüglich zelltodauslösender Eigenschaft analysiert werden. Außerdem sollte durch Nutzung dieser Mutanten herausgefunden werden, ob die nekrotisierende Wirkung der NLPs für die mikrobielle Virulenz wichtig ist und somit NLPs als Phytotoxine bezeichnet werden können.

Schließlich sollte mit Hilfe der mutierten Versionen der NLPs untersucht werden, ob die zelltodverursachende Eigenschaft der NLPs die Auslösung von Immunreaktionen erklären kann, wie dies beispielsweise durch die toxinvermittelte Generierung endogener Schadenssignale in der tierischen angeborenen Immunität der Fall ist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Pflanzenmaterial und Anzuchtbedingungen

Verwendet wurde *Arabidopsis thaliana* Col-3 für den Screen nach NLP-insensitiven Pflanzen, *Arabidopsis thaliana* Col-0 und *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN für Infiltrationsexperimente, *Commelina communis* und *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN für die Gewinnung von Plasmamembranen sowie *Solanum tuberosum* cv. Atica für Virulenzexperimente.

Die Anzucht von *N. tabacum* und *C. communis* erfolgte im Gewächshaus (15 Stunden Licht bei 24 °C / 9 Stunden Dunkelheit bei 22 °C). *A. thaliana* wurde für den Screen nach NLP-insensitiven Pflanzen im Gewächshaus angezogen (15 Stunden Licht bei 19 °C / 9 Stunden Dunkelheit bei 17 °C). Die Anzucht von *A. thaliana* für Infiltrationsexperimente erfolgte in der Klimakammer (20 °C, 8 Stunden Licht / 16 Stunden Dunkelheit).

2.1.2 Vektoren, Bakterien- und Hefestämme mit Anzuchtbedingungen

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande; recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' proAB, lacIqZΔM15, Tn10 (Tet^r)]) wurde zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37 °C in LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika zur Selektion.

Für die Expression der Proteine im NLP_{Pcc}-defizienten Stamm *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* SCC3200 (Mattinen *et al.*, 2004; Cm) wurden alle Konstrukte ohne eigenes Signalpeptid mit 227 bp des Promotors sowie dem Signalpeptid von NLP_{Pcc} fusioniert und über KpnI und SacI in pBluescript KS(-) (Invitrogen, Karlsruhe) eingefügt. Die Anzucht von *P. carotovorum* erfolgte bei 28 °C in LB-Medium mit Ampicillin zur Selektion.

Für die heterologe Expression in *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, Karlsruhe; his4, Mut⁺) wurde die kodierende Sequenz von NLP_{Pp}, NLP_{Pya} oder NLP_{Pcc} ohne eigenes Signalpeptid in pPIC9K (Invitrogen, Karlsruhe) über die Schnittstellen EcoRI und NotI für NLP_{Pp} und NLP_{Pya} bzw. AvrII und NotI für NLP_{Pcc} eingefügt. Die Anzucht von *Pichia pastoris* erfolgte in YPD-Medium zur Präparation elektro-

kompetenter Zellen. Transformierte Hefezellen wurden auf MD-Medium selektiert und zur heterologen Expression in BMGY- und BMMY-Medium angezogen. Die Hefen wurden jeweils bei 30 °C angezogen, Flüssigkulturen wurden bei 230 rpm geschüttelt.

LB-Medium:

1 %	Trypton
0,5 %	Hefeextrakt
1 %	NaCl
	pH 7,0
1,5 %	Agar für Festmedium

Antibiotikakonzentrationen:

Ampicillin:	100 µg/ml
Kanamycin:	50 µg/ml
Chloramphenicol:	25 µg/ml
Tetracyclin:	12,5 µg/ml
Cycloheximid:	50 µg/ml

YPD-Medium:

1 %	Hefeextrakt
2 %	Pepton
2 %	Dextrose
2 %	Agar für Festmedium

BMGY-/BMMY-Medium:

1,34 %	YNB
4×10^{-5} %	Biotin
2 %	Dextrose
1,5 %	Agar für Festmedium

MD-Medium:

1 %	Hefeextrakt
2 %	Pepton
100 mM	KP _i -Puffer pH 6,0
1,34 %	YNB
4×10^{-5} %	Biotin
1 %	Glycerol für BMGY
0,5 %	Methanol für BMMY

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Transformation von Bakterien

Escherichia coli

Chemisch kompetente *E. coli* XL1-Blue wurden nach Sambrook *et al.* hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Transformation von 200 µl Zellen erfolgte 30 Minuten nach Zugabe der DNA durch Hitzeschock (30 Sekunden, 42 °C). Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die transformierten Zellen unter Schütteln inkubiert (1 Stunde bei 37 °C) und auf LB-Festmedium mit Antibiotikum zur Selektion angezogen.

Pectobacterium carotovorum

Pectobacterium carotovorum (250 ml) wurde bei einer OD₆₆₀ von 0,5 sedimentiert (4 °C, 10 min, 4500 g) und in 250 ml Transformationspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden dann wie zuvor zentrifugiert und in 125 ml Transformationspuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation und Lösen in 2,5 ml Transformationspuffer wurden 200 µl Bakteriensuspension mit 100 ng Plasmid in der Elektroporationsküvette gemischt, auf Eis inkubiert (5 min) und pulsiert (2500 Volt, 5 ms). Die Zellen wurden mit 800 µl LB-Medium versetzt und nach Inkubation (1 h, 30 °C, 750 rpm) auf LB-Festmedium mit Antibiotikum ausgestrichen.

Transformationspuffer:

272	mM	Saccharose
1	mM	MgCl ₂
7	mM	Natriumphosphatpuffer pH 7,4

2.2.2 Transformation von *Pichia pastoris*

Die Transformation von *Pichia pastoris* GS115 erfolgte mittels Elektroporation nach Anleitung des Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

4 ml Bakterienkultur wurden pelletiert (3000 g) und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in 200 µl Lösung 1 resuspendiert und zur alkalischen Lyse der Zellen mit 400 µl Lösung 2 versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren der Reaktionsgefäße wurde 300 µl Lösung 3 zugegeben und das Gemisch homogenisiert. Bei diesem Schritt erfolgte eine Fällung von Proteinen und genomischer DNA, welche anschließend abzentrifugiert wurden (10 Minuten bei 16 000 g). Der Überstand wurde einmal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Durch Mischen der wässrigen Phase mit Isopropanol (1 Vol.) erfolgte die Fällung der Plasmid-DNA. Diese wurde abzentrifugiert (30 Minuten, 16 000 g, RT), mit 70 % Ethanol gewaschen und in 70 µl RNase-Lösung (50 µg/ml) gelöst.

Lösung 1:		Lösung 2:	
25 mM	Tris	0,2 N	NaOH
10 mM	EDTA	1 %	SDS
50 mM	Glucose		
pH	8,0	Lösung 3:	
		60 ml	5 M KAc
		11,5 ml	Eisessig
		28,5 ml	H ₂ O

2.2.4 PCR

Die Vervielfältigung von DNA-Fragmenten durch PCR wurde mit Taq-Polymerase (Genaxxon, Biberach) beim Screen nach NLP-insensitiven Mutanten und mit Pfu Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) bei Klonierungen nach Empfehlung der Hersteller durchgeführt. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.2.5 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte mittels 1 %igem Agarosegel in 1 x TBE-Puffer. Zum Anfärben der DNA wurde dem Gel Ethidiumbromid (100 µg/ml) zugegeben. Die DNA-Proben wurden mit 0,5 Volumen Lade-puffer versetzt und zum Größen- bzw. Mengenvergleich neben PstI-geschnittener λ-DNA (100 ng/µl) aufgetragen.

10 x TBE-Puffer:		3 x DNA-Ladepuffer:	
108 g/l	Tris	3,5 ml	87 % Glycerin
55 g/l	Borsäure	5,5 ml	30 mM Tris,
40 ml/l	0,5 M EDTA pH 8,0		3 mM EDTA pH 8,0
		1 ml	0,4 % Bromphenolblau

2.2.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung von DNA nach PCR oder Restriktionsverdau wurde mit dem QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.2.7 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese und das Konstruieren der hierfür benötigten Oligonukleotide wurde nach Anleitung des QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. In 50 µl Gesamtvolumen wurden 10 ng Plasmid-DNA, je 125 ng der Oligonukleotide, 5 µl 10 x Reaktionspuffer, 1 µl dNTPs (10 mM) und 1 µl Pfu Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) gegeben. Das verwendete PCR-Programm enthielt 1 Minute Anfangsdenaturierung bei 95 °C, 18 Zyklen mit je 95 °C für 50 Sekunden, 60 °C für 50 Sekunden und 68 °C für 1 Minute pro 500 bp Plasmid sowie 7 Minuten Endelongation bei 68 °C. Die verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.2.8 Isolierung genomischer DNA aus Pflanzen

Blattmaterial (50-100 mg) wurde in 500 µl 2 x CTAB-Puffer homogenisiert und nach 90 min Inkubation bei 65 °C zentrifugiert (15 min, 16 000 g). Der Überstand wurde mit 500 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt. Nach Zentrifugation (5 min, 16 000 g) wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß mit Isopropanol (1 Vol.) überführt, 10 Minuten auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert (30 min, 16 000 g, 4 °C). Die sedimentierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 30 µl RNase-Lösung (50 µg/ml) gelöst.

2 x CTAB-Puffer:

55 mM	Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)
1,4 M	NaCl
20 mM	EDTA pH 8
0,1 M	Tris-HCl pH 8

2.2.9 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial

Blattmaterial (50-100 mg) wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und mittels Mörsern homogenisiert. Das Pulver wurde nach Zugabe von 1 ml Trizol-Reagenz unter kräftigem Schütteln aufgetaut und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) wurden die Proben erneut homogenisiert und anschließend zentrifugiert (5 min, RT, 16 000 g). 600 µl der wässrigen Phase wurden in neue Eppendorfgefäße zu 1 Vol. Isopropanol gegeben und nach Inkubation auf Eis (15 min) zentrifugiert (30 min, 4 °C,

16 000 g). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol (500 µl) gewaschen und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser aufgenommen. Für die reverse Transkription wurde die RNA mit RNase-freier DNase (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers behandelt und anschließend einer Extraktion mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) für die Inaktivierung der DNase unterzogen. Nach einer Fällung der wässrigen Phase (0,2 Volumen 3 M Natriumacetat; 2,5 Volumen 100 % Ethanol) wurde die RNA in 20 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst und zur Konzentrationsbestimmung photometrisch bei 260 nm an einem NanoDrop ND-1000 (PeqLab, Erlangen) vermessen.

Trizol-Reagenz:

38	% (v/v)	Phenol pH 4,5-5
0,8	M	Guanidinthiocyanat
0,4	M	Ammoniumthiocyanat
0,1	M	Natriumacetat pH 5,0
5	% (v/v)	Glycerin

2.2.10 RT-PCR

Zur reversen Transkription wurden 1 µg RNA mit 0,5 µl Oligo-dT₂₀-Nukleotiden (30 µM) in einem Gesamtvolumen von 5,5 µl versetzt und inkubiert (10 min, 70 °C). Nachdem die Reaktion auf Eis abgekühlt war, wurden 1 µl dNTPs (2,5 mM), 2 µl 5 x Puffer, 0,25 µl RNase-Inhibitor (Fermentas, St. Leon-Rot) und 0,5 µl M-MuLVTM Reverse Transkriptase (Fermentas, St. Leon-Rot) zugegeben und das Volumen mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach 1 Stunde bei 42 °C wurde die Reaktion für 10 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

2.2.11 Quantitative PCR-Analyse

Die quantitative PCR-Analyse erfolgte an einem iQ5 Real-Time PCR Detektionssystem (Bio-Rad, München) unter Verwendung des iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München). Die Reaktionsansätze setzten sich zusammen aus 1 µl cDNA (1:5 verdünnt), je 0,5 µl Oligonukleotide (10 µM), 10 µl iQ SYBR Green Supermix und 8 µl H₂O. Es wurden Triplikate der jeweiligen Reaktionsansätze pipettiert. Nach einer anfänglichen Denaturierung für 15 Minuten bei 95 °C wurden 40 Zyklen mit jeweils 95 °C für 20 Sekunden, 56,5 °C für 20 Sekunden und 68 °C für 1 Minute durchgeführt. Die Spezifität der Amplifikation wurde anschließend

durch eine Schmelzkurvenanalyse überprüft. Hierbei wurde die Temperatur von 56,5 °C auf 95 °C erhöht (0,1 °C/Sekunde). Die Auswertung wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ -Methode vorgenommen (Livak und Schmittgen, 2001).

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Proteinextraktion aus Pflanzen

Blattmaterial (50-100 mg) wurde in gefrorenem Zustand gemörsert, mit 50 µl Extraktionspuffer versetzt und auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 16 000 g, 4 °C) und der Überstand für weitere Analysen verwendet.

Proteinextraktionspuffer:

20	mM	Tris-HCl pH 7,5
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA
1	%	Triton X-100
0,1	%	SDS
5	mM	DTT
1	Tablette / 10 ml	Complete Protease Inhibitor Mini, EDTA-frei (Roche, Mannheim)

2.3.2 Heterologe Proteinexpression in *Pichia pastoris*

Pichia pastoris wurde als Vorkultur (5-25 ml) 24 h in BMGY-Medium kultiviert. Nach Zentrifugation (5 min, 1500 g, RT) wurden die Zellen in 100-500 ml BMMY-Medium resuspendiert und für 3-4 Tage kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert (10 min, 10 000 g, RT) und der Überstand mit PD-10-Säulen (GE Healthcare, München) entsalzt oder für eine Aufreinigung mittels FPLC mit 60 % (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Nach Zentrifugation (15 min, 20 000 g, 4 °C) wurde das Sediment in 1-5 ml H₂O gelöst und gegen den jeweiligen Puffer für die Ionenaustauschchromatographie dialysiert.

2.3.3 Heterologe Proteinexpression in *Pectobacterium carotovorum*

6 ml Bakterienkultur wurden für 24 h in LB-Medium mit Ampicillin kultiviert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien wurden daraus periplasmatische Proteine präpariert, welche die heterolog exprimierten Proteine enthielten.

Dafür wurden die Zellen abzentrifugiert (3 min, 6000 g, RT) und in 1 ml Lösung 1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (3 min, 4° C, 6000 g) wurden die Zellen in 200 µl Lösung 2 resuspendiert, mit 200 µl Lösung 3 versetzt und inkubiert (10 min, RT). Es folgte eine Zentrifugation (5 min, 16 000 g, RT) nach welcher der Überstand verworfen wurde. Mit Hilfe eines Zahnstochers wurden die Sedimente am Rand des Gefäßes verteilt, in 200 µl Lösung 4 auf Eis resuspendiert und inkubiert (10 min, auf Eis). Nach Zentrifugation (10 min, 16 000 g, 4° C) wurde der Überstand mit den darin enthaltenen periplasmatischen Proteinen entnommen. Für größere Volumina bis zu 500 ml Bakterienkultur wurde das Protokoll entsprechend adaptiert.

Die Proteinlösung wurde über PD-10-Säulen (GE Healthcare, München) entsalzt und anschließend zur Konzentration lyophilisiert oder gegen den jeweiligen Puffer für eine anschließende Ionenaustauschchromatographie dialysiert.

Lösung 1:

10 mM Tris-HCl pH 7,5
 30 mM NaCl
 4 °C

Lösung 2:

30 mM Tris-HCl pH 7,5
 Raumtemperatur

Lösung 3:

30 mM Tris-HCl pH 7,5
 40 % (w/v) Saccharose
 0,2 mM EDTA
 Raumtemperatur

Lösung 4:

20 mM MgCl₂
 4 °C

2.3.4 Proteinreinigung

Die Proteinlösungen wurden an einem Äkta Explorer (GE Healthcare, München) mit Fraktionssammler (Frac-950, GE Healthcare, München) mittels Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration konzentriert und gereinigt. Die Proteine wurden hierfür gegen den für die Ionenaustauschchromatographie verwendeten Puffer A dialysiert. Nach Äquilibrieren der Säule (HiTrap SP FF 1 ml oder HiTrap Q FF 1 ml, GE Healthcare, München) mit dreifachem Säulenvolumen Puffer A wurde die dialysierte Probe mit 1 ml/min aufgetragen und anschließend mit 10-15 Säulenvolumen nachgewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte über einen Gradienten von 0-100 % Puffer B über 10 ml. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE auf NLP-Gehalt untersucht. Die

Fraktionen mit dem höchsten NLP-Gehalt wurden für die Größenausschlusschromatographie über eine HiLoad™ 16/60 Superdex 75 (GE Healthcare, München) bei 1 ml/min unter Verwendung des in Tabelle 2-1 aufgeführten Puffer GF aufgetrennt. Nach erneuter Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE wurden die gereinigten Proteine gegen H₂O dialysiert.

	Puffer A	Puffer B	Säule	Puffer GF
NLP _{Pp}	20 mM Tris pH 8,5	20 mM Tris pH 8,5 500 mM KCl	HiTrap Q FF 1 ml	20 mM Tris pH 8,5 150 mM KCl
NLP _{Pcc}	50 mM MES pH 5,7	50 mM MES pH 5,7 500 mM KCl	HiTrap SP FF 1 ml	50 mM MES pH 5,7 150 mM KCl
NLP _{Pya}	20 mM NaAc pH 4,7	20 mM NaAc pH 4,7 500 mM KCl	HiTrap SP FF 1 ml	20 mM NaAc pH 4,7 150 mM KCl

Tab. 2-1: Übersicht der für die Proteinreinigung verwendeten Puffer und Säulen.

2.3.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe erfolgte mittels 10 oder 12 %iger Polyacrylamidgele in SDS-Laufpuffer bei 20 mA. Die Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladepuffer versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Zum Größenvergleich diente der PageRuler™-Prestained Proteinmarker (Fermentas, St. Leon-Rot).

Polyacrylamidgele:

Sammelgel (1 ml):

689	µl	H ₂ O
170	µl	30 % Acrylamidmix
130	µl	1 M Tris-HCl pH 6,8
10	µl	10 % Ammoniumpersulfat
1	µl	TEMED

10 % Trenngel (10 ml):

4	ml	H ₂ O
3,3	ml	30 % Acrylamidmix
2,5	ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
100	µl	10 % Ammoniumpersulfat
4	µl	TEMED

12 % Trenngel (10 ml):

3,3	ml	H ₂ O
4	ml	30 % Acrylamidmix
2,5	ml	1,5 M Tris-HCl pH 8,8
100	µl	10 % Ammoniumpersulfat
4	µl	TEMED

5 x Proteinladepuffer:

250	mM	Tris-HCl pH 6,8
10	%	SDS
50	%	Glycerin
5	%	β -Mercaptoethanol
0,02	%	Bromphenolblau

10 x SDS-Laufpuffer:

1,9	M	Glycin
250	mM	Tris-HCl pH 8,3
1	%	SDS

2.3.6 Coomassie-Färbung von Proteingelen

Proteingele wurden in Lösung A bis zum Erreichen des Siedepunktes erhitzt und anschließend unter Schütteln auf Raumtemperatur abgekühlt. Lösung A wurde durch Lösung B ersetzt und das Gel wieder bis zum Siedepunkt erhitzt, anschließend wurde Lösung B direkt abgeschüttet und das Gel in Lösung C bis zum Siedepunkt erhitzt. Wieder wurde Lösung C direkt abgeschüttet und das Gel in Lösung D bis zum Sieden erhitzt. Nach Zugabe eines Papiertuchs zum Absorbieren überschüssigen Farbstoffes wurde das Gel bis zur gewünschten Entfärbung bei Raumtemperatur geschüttelt.

Lösung A:

10	%	Essigsäure
25	%	Isopropanol
0,025	%	Coomassie Brilliantblau R-250

Lösung B:

10	%	Essigsäure
10	%	Isopropanol
0,005	%	Coomassie Brilliantblau R-250

Lösung C:

10	%	Essigsäure
0,002	%	Coomassie Brilliantblau R-250

Lösung D:

10	%	Essigsäure
----	---	------------

2.3.7 Western Blotting

Das Western Blotting von Proteingelen erfolgte in einem PerfectBlue Semi-Dry-Elektroblotter (PeqLab, Erlangen). Auf die Minus-Pol-Platte der Apparatur wurden drei Lagen Whatman-3MM-Papier, das zu blottende SDS-Polyacrylamidgel, eine Nitrozellulose Hybond-ECL-Membran (GE Healthcare, München) und wiederum drei Lagen Whatman-Papier geschichtet. Membran und Whatman-Papier wurden vorher auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und kurz in Blotpuffer befeuchtet. Das Gel wurde in Blotpuffer äquilibriert (10 min) und für 1 bis 1½ Stunden geblottet (1 mA/cm²). Nach einer anschließenden Ponceau-S-

Färbung zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde die Membran 1 Stunde in 5 % Milchpulver in TBS geblockt und dann eine Stunde mit dem ersten Antikörper in 5 % Milchpulver in TBS inkubiert. Die Membran wurde nach drei Waschstritten (je 10 Minuten in TBS) 1 h mit dem zweiten Antikörper inkubiert. Es folgten wiederum drei Waschstritte und die Farbreaktion mit den Substraten NBT (100 µg/ml) und BCIP (50 µg/ml) in NBT/BCIP-Detektionspuffer.

Blot-Puffer:

25 mM	Tris-HCl pH 8,3
192 mM	Glycin
20 %	Methanol

Detektionspuffer für NBT/BCIP:

150 mM	Tris-HCl pH 9,5
100 mM	NaCl
5 mM	MgCl ₂

TBS:

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
150 mM	NaCl

Ponceau-S:

0,1 % (w/v)	Ponceau-S
in 5 % (v/v)	Essigsäure

Verwendete Antikörper:

Anti-NLP_{Pp} IgG aus Kaninchen: 1:3000 gegen Aminosäuren 54-83 (Eurogentec, Herstal, Belgien)

Anti-NLP_{Ps} IgG aus Kaninchen: 1:3000 gegen das vollständige Protein (Eurogentec, Herstal, Belgien)

Anti-PM-ATPase IgG aus Kaninchen: 1:2000 (Palmgren *et al.*, 1991)

Anti-Kaninchen IgG (Alkalische-Phosphatase-Konjugat) aus Ziege (Sigma-Aldrich, Taufkirchen): 1:3000

2.3.8 Isolierung von Plasmamembranen

Als Ausgangsmaterial für die Plasmamembranisolierung wurden Mikrosomen aus 4-6 Wochen alten *Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN und 3 Wochen alten *Commelina communis* hergestellt. Dazu wurden 500 g Pflanzenmaterial im Mixer in 750 ml Puffer zerkleinert und durch Miracloth (Merck, Darmstadt) gefiltert. In einer ersten Zentrifugation des Filtrats (15 min, 10 000 g, 4 °C) wurden restliche Zelltrümmer sedimentiert. Nach einer anschließenden Zentrifugation (60 min, 100 000 g, 4 °C) befanden sich die Mikrosomen im Pellet, der Überstand wurde verworfen.

Die Mikrosomen wurden in 5 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und die darin enthaltenen Plasmamembranen mittels einer Zweiphasenextraktion nach

Larsson *et al.* (1987) aufgereinigt. Die Konzentration an Dextran und Polyethylenglykol betrug hierbei 6,4 % (w/w), die Konzentration an KCl 3 mM. Die Oberphase mit der angereicherten Plasmamembran wurde mit Resuspendierungspuffer 2,5 fach verdünnt und zum Konzentrieren der Plasmamembran zentrifugiert (60 min, 100 000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Plasmamembran-Suspension wurde mittels Bradford-Test bestimmt, und die Qualität der Anreicherung wurde mittels Western Blot mit Antikörper gegen die Plasmamembran-ATPase analysiert.

Extraktionspuffer:

330 mM	Saccharose
50 mM	MOPS-KOH pH 7,5
5 mM	EDTA
0,6 % (w/v)	Polyvinylpyrrolidon
5 mM	DTT
0,5 mM	PMSF
0,1 µg/ml	Leupeptin
1 µg/ml	Pepstatin
1 µg/ml	Antipain
1 µg/ml	Aprotinin
1 µg/ml	Chymostatin

Resuspendierungspuffer:

330 mM	Saccharose
5 mM	KP _i -Puffer pH 7,8
0,1 mM	EDTA
1 mM	DTT
1 Tablette/ 50 ml	Complete Protease Inhibitor (Roche, Mannheim)

2.3.9 Untersuchungen zur Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln

Plasmamembranen mit einem Proteingehalt von 100-500 µg wurden mit 2 Volumen 60 mM Calcein in Calceinpuffer für 30 Minuten ultraschallbehandelt. Dabei wurde jeweils 20 Sekunden bei einer Amplitude von 20-25 % sonifiziert und 20 Sekunden pausiert. Anschließend wurden die Vesikel inkubiert (30 min, RT) und zentrifugiert (15 min, 16 000 g, RT), um restliche Partikel der Sonotrode zu entfernen. Die gefüllten Vesikel wurden von dem überschüssigen freien Farbstoff durch Gelfiltration über eine Sephadex-G-75-Medium-Säule mit Calceinpuffer als Laufpuffer getrennt (Abb. 2-1). Es wurden Fraktionen von ca. 120 µl gesammelt, von denen anschließend 5 µl in 195 µl Vesikelpuffer pH 5,8 mit und ohne 0,5 % Triton X-100 im Fluoreszenzdetektor vermessen wurden. Die Anregungswellenlänge betrug dabei 485 nm, die Emission 520 nm.

Die Fraktionen mit einem mindestens zweifachen Unterschied in der Fluoreszenz mit und ohne Triton X-100 wurden vereinigt und einer Proteinbestimmung unter-

zogen. Für die anschließenden Messungen wurden Vesikel mit einer Proteinmenge von 100 bis 500 ng verwendet und mit verschiedenen Konzentrationen der Testproteine versetzt. Die Messungen wurden in einem Gesamtvolumen von 200 μl in Vesikelpuffer mit Plasmamembranvesikeln einer Proteinkonzentration von 1 ng/ μl und NLP-Konzentrationen von 0,01 bis 500 nM über 15 Minuten durchgeführt. Am Ende der Messung wurde die maximale Calceinfreisetzung durch Zugabe von Triton X-100 auf eine Endkonzentration von 0,5 % (v/v) ermittelt. Die Permeabilisierung, verursacht durch die zu untersuchenden Proteine, wird durch Calceinfreisetzung angezeigt und wurde in Prozent des Maximalwertes nach Tritonbehandlung angegeben. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel: $\text{Calceinfreisetzung} = (F_{\text{gem}} - F_{\text{anf}}) / (F_{\text{max}} - F_{\text{anf}}) * 100$, wobei F_{gem} , F_{anf} , und F_{max} jeweils die gemessene, anfängliche und maximale Fluoreszenz darstellen.

Zum tryptischen Verdau von Membranproteinen wurden 50 μl Plasmamembranvesikel mit einer Proteinkonzentration von 25 ng/ μl mit 1 μl Trypsin (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) versetzt und inkubiert (60 min, RT). Zum Abstoppen des Verdau wurde 1 μl Trypsin-Inhibitor (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zugegeben. Die anschließenden Messungen erfolgten wie im vorherigen Abschnitt beschrieben.

Zur Untersuchung von inhibitorischen Effekten verschiedener Membranbestandteile wurde 40 nM NLP_{pp}-Lösung (1 ng/ μl) mit verschiedenen Lipiden (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; 500 ng/ μl ; 100 ng/ μl ; 50 ng/ μl) (Sigma-Aldrich, Taufkirchen; Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA) versetzt und inkubiert (30 min, RT). Anschließend wurde dieses Gemisch 1:1 mit Plasmamembranvesikeln aus Tabak gemischt und die Calceinfreisetzung verfolgt.

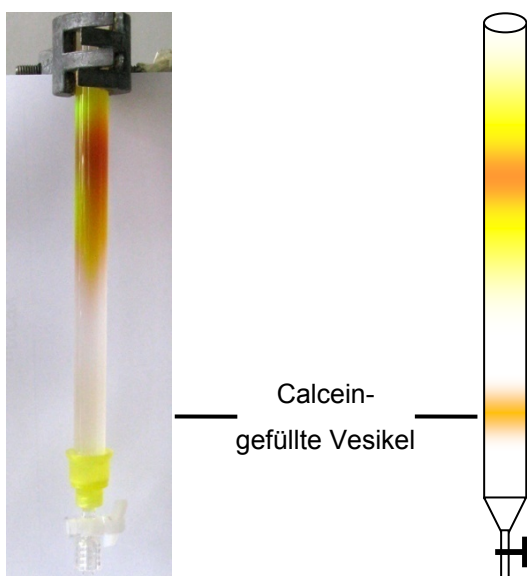


Abb. 2-1: Chromatographische Trennung calceingefüllter Vesikel.

Calceingefüllte Vesikel sind als sehr schwache orange Bande vor der starken gelb-rot-gelb-Färbung des freien Calceins zu sehen.

Vesikelpuffer pH 5,8:

20 mM	MES-KOH pH 5,8
140 mM	NaCl

Calceinpuffer:

20 mM	Tris-HCl pH 8,5
140 mM	NaCl
1 mM	EDTA

Vesikelpuffer pH 7,5:

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
140 mM	NaCl

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Präparation von Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana*

Zellkulturen von *Arabidopsis thaliana* Col-0 (10 ml) wurden nach Zentrifugation (400 g, 5 Minuten) in Puffer A ohne Enzyme (10 ml) gewaschen und anschließend in Puffer A mit Enzymen (10 ml) unter Schütteln bei Dunkelheit inkubiert (26 °C, 50 rpm, 6 h). Die dadurch frei werdenden Protoplasten wurden sedimentiert (5 min, 100 g, RT) und mit je 10 ml Puffer A ohne Enzyme und W5-Lösung gewaschen. Das Sediment wurde in 10 ml W5-Lösung resuspendiert und im Dunkeln inkubiert (20 min, 4 °C). Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 100 g, RT) wurden die Protoplasten in 2 ml K3-Lösung aufgenommen und bis zur Analyse im Dunkeln bei 26 °C aufbewahrt.

K3-Lösung pH 5,6:

1,09 mM	NaH ₂ PO ₄
6,12 mM	CaCl ₂
24,73 mM	KNO ₃
3,12 mM	NH ₄ NO ₃
1,01 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
1,01 mM	MgSO ₄
4,5 µM	KI
48,5 µM	H ₃ BO ₃
33,5 µM	MnSO ₄
6,96 µM	ZnSO ₄
1,03 µM	Na ₂ MoO ₄
0,11 µM	CuSO ₄
0,11 µM	CoCl ₃
8,12 µM	Nikotinsäure
4,86 µM	Pyridoxin
29,64 µM	Thiamin
104,15 µM	EDTA
100 µM	Fe(II)SO ₄
4,63 mM	CaHPO ₄
555 µM	<i>myo</i> -Inositol
1,67 mM	D(+)-Xylose
400 mM	Saccharose

Puffer A pH 5,5:

1 % (w/v)	Zellulase
0,25 % (w/v)	Mazerozym
8 mM	CaCl ₂
0,4 M	Mannitol

W5-Lösung pH 5,8-6,0:

154 mM	NaCl
125 mM	CaCl ₂
5 mM	KCl
5 mM	Glukose

2.4.2 Proteinmarkierung mit Cy3 und Lokalisierung des markierten Proteins in Protoplasten

NLP_{Pp} wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (Invitrogen, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers markiert. Zur Trennung des markierten Proteins von freiem Farbstoff wurde eine Gelfiltration (siehe 2.3.4) durchgeführt. Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden mit einer Endkonzentration der markierten Proteine von 50 nM versetzt und anschließend am Fluoreszenzmikroskop beobachtet. Zur Kontrolle wurde die OD₅₅₂ von freiem Cy3 auf den gleichen Wert eingestellt wie die markierten Proteine und die Protoplasten mit dem entsprechenden Volumen Cy3-Lösung versetzt.

2.5 Biologische Studien

2.5.1 Virulenzexperimente auf Kartoffel

Kartoffelknollen der Sorte Atica (SaKa Pflanzenzucht GbR, Hamburg) wurden in 0,8 cm dicke Scheiben geschnitten und mit 15 µl der *P. carotovorum* Kulturen mit einer OD₅₄₆ von 0,07 inokuliert. Die Kartoffelscheiben wurden auf ein Drahtgitter in wassergefüllte, dicht schließende Boxen ca. 1-2 cm über der Wasseroberfläche gelegt. Nach drei Tagen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Scheiben fotografiert und je drei Scheiben pro Konstrukt wurden zur Auswertung des Bakterienwachstums in 25 ml MgCl₂ (10 mM) aufgenommen. Nach kräftigem Schütteln wurden Aliquots der nun in MgCl₂ gelösten Bakterien entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Festmedium mit Ampicillin, Chloramphenicol und Cycloheximid ausgestrichen. Das Wachstum der Bakterien wurde berechnet, indem die Zahl der koloniebildenden Bakterieneinheiten nach drei Tagen durch die Zahl der eingesetzten koloniebildenden Bakterieneinheiten geteilt wurde. Um drei unabhängige Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde das prozentuale Wachstum der zu testenden Bakterienstämme relativ zum *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* *nlp*⁺-Stamm (SCC3193; *Pcc nlp*⁺) bzw. zum WT-NLP_{Pcc}-komplementierten *Pcc nlp*⁻-Stamm berechnet und als Mittelwert der drei Experimente ± Standardabweichung angegeben.

2.5.2 Suche nach NLP-insensitiven Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Als Ausgangsmaterial für den Screen diente eine *Arabidopsis thaliana* Ecotyp Col-3 Linie, welche ein Konstrukt zur Dexamethason (DEX)-induzierbaren Überexpression von NLP_{Ps} trägt (Abb. 2-2). Diese Linie wurde bereits vor der Anfertigung dieser Arbeit im Labor von Sophien Kamoun (Norwich, Großbritannien) hergestellt. Das Plasmid, welches zur Herstellung der Linien verwendet wurde ist pTA7002 (Aoyama und Chua, 1997). Hier wurde NLP_{Ps} mit eigenem Signalpeptid über die Schnittstellen SpeI und XhoI eingefügt. Samen der T₃-Generation wurden von Dr. Frédéric Brunner einer Mutagenese mittels Ethylmethansulfonat unterzogen.

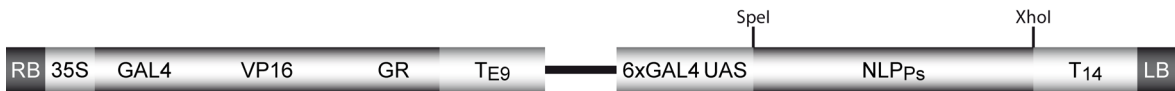


Abb. 2-2: Konstrukt zur Herstellung von DEX-induzierbaren NLP_{Ps}-Pflanzen.

Das Konstrukt enthält die Sequenz für den Glukokortikoid-Rezeptor (GR), an den DEX bindet. Dadurch kommt es zur Verlagerung des Fusionsproteins aus GAL4-Bindedomäne, VP16-Transaktivierungsdomäne und GR in den Nukleus. Nach Bindung an die GAL4-aktivierende Sequenz (upstream activating sequence, UAS) kommt es zur Aktivierung der NLP_{Ps}-Transkription.

In dieser Arbeit wurde zur Selektion von NLP-insensitiven Mutanten die M₃-Generation der mutagenisierten Linien großflächig ausgesät und im Stadium von etwa 1½ Wochen mit 5 µM Dexamethason besprüht. Die überlebenden Pflanzen wurden selektiert und sollten in der nächsten Generation mit *Arabidopsis thaliana* *Landsberg erecta* gekreuzt werden, um ein Mapping der mutierten Gene zu ermöglichen. Auf diese Weise wurden ca. 1,8 Mio. Linien durchmustert.

Um die Anzahl der selektierten Mutanten auf die besten Kandidaten einzuschränken, wurden diese in der nächsten Generation nochmals mit Dexamethason behandelt. Daraufhin wurde die NLP-Sensitivität durch Infiltration von rekombinantem NLP_{Pp} untersucht sowie das Expressionsniveau des NLP_{Ps}-Konstruktes analysiert. Ebenfalls wurde das eingebrachte Konstrukt sequenziert, um Mutanten auszuschließen, welche Fehler im Konstrukt tragen.

2.5.3 Zelltodanalysen in Pflanzen

Proteinlösungen (10-20 µl) wurden mit einer 1 ml Spritze von der Blattunterseite in Pflanzen infiltriert (*A. thaliana*, 4 Wochen alt; *N. tabacum*, 4-6 Wochen alt). Die Entwicklung des Zelltodes wurde nach drei Tagen fotografisch dokumentiert.

2.5.4 Ionenfreisetzung in *Nicotiana tabacum*

Tabakpflanzen (4-6 Wochen alt) wurden mit den zu untersuchenden Proteinlösungen infiltriert. 10 Minuten nach der Infiltration wurden Blattscheiben mit 6 mm Durchmesser ausgestochen und in deionisiertem Wasser gewaschen (1 ml pro Probe, 30 min). Anschließend wurden die Blattscheiben in 1 ml frisches deionisiertes Wasser transferiert und die Leitfähigkeit über 8 Stunden mit einem Konduktivitätsmessgerät (Q cond 2200, VWR, Darmstadt) verfolgt. Für jedes Protein wurde je eine Infiltration in zwei Tabakpflanzen vorgenommen und die beiden Blattscheiben vereinigt.

3 Ergebnisse

Die NLP-Familie umfasst Mitglieder aus Oomyzeten, Pilzen und Bakterien. Nekrotisierende Formen wurden bislang nur in Pathogenen mit nekrotropher oder hemibiotropher Lebensweise identifiziert. Soweit bekannt, verursachen diese Proteine ausschließlich in dikotylen Pflanzen nekrotische Läsionen und die Induktion von abwehrassozierten Reaktionen.

In den folgenden Untersuchungen sollten Kenntnisse über die Virulenzfunktion der NLPs sowie über den Wirkort und Wirkmechanismus der Proteine gewonnen werden. Außerdem sollte die Bedeutung hochkonservierter Motive und Aminosäuren von NLPs für deren Aktivität und strukturelle Funktionen untersucht werden. Schließlich sollte eine Zuordnung der NLPs zu einer der bestehenden Gruppen abwehrstimulierender mikrobieller Strukturen ermöglicht werden (vgl. 1.3).

3.1 NLPs sind Virulenzfaktoren

Einige NLPs aus Bakterien und Pilzen tragen zur Virulenz von Pathogenen bei. Der Pilz *Colletotrichum coccodes* ist normalerweise nur sehr schwach virulent auf *Abutilon theophrasti*-Pflanzen. Durch heterologe Expression von NEP1 aus *Fusarium oxysporum* in *Colletotrichum coccodes* wurde die Aggressivität des Pilzes jedoch enorm gesteigert (Amsellem *et al.*, 2002). Weiterhin konnten Mattinen *et al.* (2004) zeigen, dass NLP_{Pcc} (NLP aus *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, ehemals *Erwinia carotovora* subsp. *carotovorum*) zur Virulenz von *P. carotovorum* auf Kartoffelknollen beiträgt. *P. carotovorum* SCC3200, ein NLP_{Pcc}-defizienter Stamm (*Pcc nlp*⁻), zeigt reduziertes Wachstum auf Kartoffelknollen im Vergleich zum NLP-exprimierenden Stamm (*Pcc nlp*⁺). Durch Transformation mit dem NLP_{Pcc}-Konstrukt in einem bakteriellen Expressionsvektor kann die reduzierte Virulenz komplementiert beziehungsweise durch Überexpression sogar noch gesteigert werden.

Für NLPs aus Oomyzeten konnte eine solche Virulenzfunktion bisher nicht nachgewiesen werden, da die Anwendung reverser Genetik in Oomyzeten bis zum heutigen Zeitpunkt nicht ausreichend etabliert ist. Von Qutob *et al.* (2002) wurde

allerdings eine verstärkte NLP_{Ps} (NLP aus *Phytophthora sojae*)-Produktion während des Übergangs von der biotrophen zur nekrotrophen Phase von *Phytophthora sojae* bei der Infektion von Sojabohne beschrieben. Diese Eigenschaft ist für Virulenzfaktoren typisch. Um eine Virulenzfunktion nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit eine sogenannte „cross kingdom complementation“ durchgeführt. Dabei wurde versucht, die reduzierte Virulenz des NLP_{Pcc}-defizienten *P. carotovorum*-Stammes (*Pcc nlp*⁻) durch zwei NLPs aus Oomyzeten, NLP_{Pp} (NLP aus *Phytophthora parasitica*) und NLP_{Pya} (NLP aus *Pythium aphanidermatum*), zu komplementieren. Zur Kontrolle wurde *Pcc nlp*⁻ ebenfalls mit NLP_{Pcc} und dem leeren Vektor transformiert. Die Expression dieser Proteine wurde mittels SDS-PAGE der periplasmatischen Proteine und Coomassiefärbung überprüft. Um die Auswirkung der NLPs auf die Virulenz des Bakterienstammes zu testen, wurden Scheiben von Kartoffelknollen mit NLP_{Pcc}⁻, NLP_{Pp}⁻ bzw. NLP_{Pya}-komplementierten *Pcc nlp*⁻-Bakterien inokuliert und mit *Pcc nlp*⁺-inokulierten Kartoffelscheiben verglichen.

Nach drei Tagen Inkubation ist auf Kartoffelscheiben mit NLP-exprimierenden Bakterien mazeriertes und faules Gewebe sowie Bakterienwachstum deutlich zu sehen (Abb. 3-1 B). Die Bakterien wurden von den Scheiben abgelöst und zur Bestimmung der koloniebildenden Einheiten in verschiedenen Verdünnungen auf Festmedium angezogen. So war es möglich, die Vermehrung der Bakterien seit der Inokulation zu analysieren. Zum Vergleich dreier unabhängiger Experimente wurde die Vermehrung von *Pcc nlp*⁻ + NLP_{Pcc}, NLP_{Pp}, NLP_{Pya} und der Leervektor-kontrolle relativ zur Vermehrung von *Pcc nlp*⁺ in Prozent berechnet (Abb. 3-1 A).

Durch NLP_{Pcc} komplementierte *Pcc nlp*⁻ zeigen ein ähnliches Wachstum ($116,7 \pm 6,4$ %) wie *Pcc nlp*⁺ (100 %). NLP_{Pp} und NLP_{Pya} können dagegen nur etwa $\frac{1}{3}$ des Wachstums von *Pcc nlp*⁺ vermitteln. Allerdings ist das Wachstum deutlich gesteigert im Vergleich zu Leervektor-transformierten *Pcc nlp*⁻-Bakterien ($0,8 \pm 0,2$ %). Mit $30,2 \pm 4,2$ % (NLP_{Pp}) bzw. $39,1 \pm 6$ % (NLP_{Pya}) ist das Wachstum im Fall von NLP_{Pp} 38-fach höher und im Fall von NLP_{Pya} 49-fach höher als bei der Leervektorkontrolle. Somit tritt eine deutlich höhere Virulenz auch durch Expression der beiden NLPs aus Oomyzeten auf. Daraus ist zu schließen, dass NLPs funktionell verwandte Virulenzfaktoren sind, die bei der Infektion zur Symptombildung wie Gewebemazerierung und Zelltod beitragen.

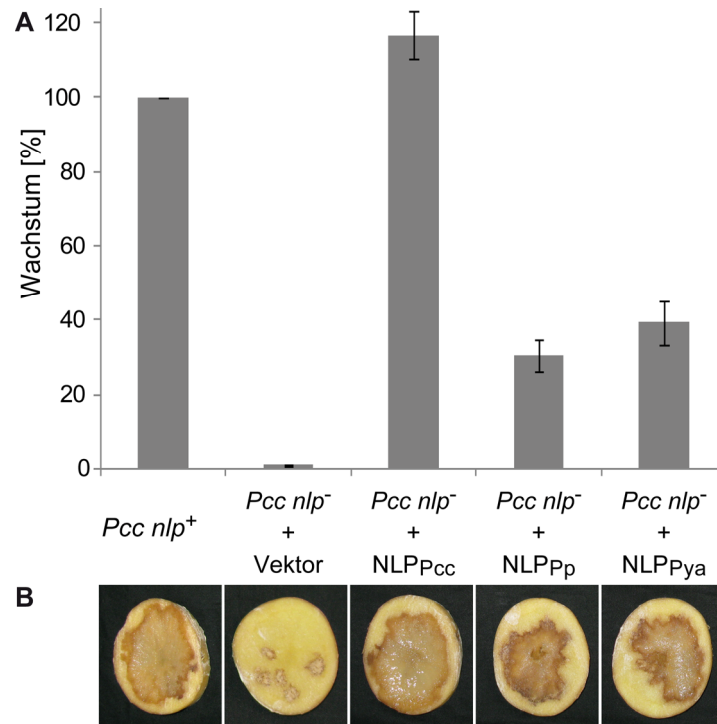


Abb. 3-1: NLPs steigern die Virulenz von *Pectobacterium carotovorum* auf Kartoffelknollen.

Scheiben von *Solanum tuberosum* cv. Atica wurden mit einer definierten Menge koloniebildender Einheiten von NLP_{Pcc}-exprimierenden *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc nlp*⁺) inokuliert sowie mit NLP_{Pcc}-defizienten *P. carotovorum* (*Pcc nlp*⁻), welche mit einem NLP-Konstrukt oder dem Leervektor als Kontrolle transformiert wurden. Nach drei Tagen wurde die Zahl der koloniebildenden Einheiten bestimmt und das Wachstum relativ zu *Pcc nlp*⁺ berechnet. Der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen wurde berechnet (A). Exemplarisch sind die Fäulnissymptome nach drei Tagen für eine der in die Berechnung eingehenden Kartoffelscheiben gezeigt (B). NLP_{Pp} und NLP_{Pya} zeigen speziesübergreifend eine virulenzsteigernde Funktion, können die Aktivität von NLP_{Pcc} jedoch nur partiell komplementieren.

3.2 Interaktion von NLPs mit Membranen

3.2.1 Suche nach NLP-insensitiven Mutanten in *Arabidopsis thaliana*

Um herauszufinden, ob NLPs als PAMP-ähnliche molekulare Muster agieren, wurde ein Versuchsansatz zur Identifizierung eines zugehörigen Mustererkennungsrezeptors konstruiert. Das Ausschalten der Rezeptoren für bekannte PAMPs wie Flagellin, EF-Tu oder Chitin beeinträchtigt die Vitalität der Pflanzen nicht, führt aber zu Insensitivität bezüglich der PAMPs und erhöhter Anfälligkeit für phytopathogene Bakterien (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006; Miya *et al.*, 2007). Für bekannte PRRs kodierende Gene treten im Genom meist als Einzelkopien auf, weswegen ein vorwärts gerichteter genetischer Screen zur Identifizierung solcher Rezeptorproteine erfolgreich sein sollte.

In dieser Arbeit wurde dementsprechend in einem solchen Screen nach Pflanzen mit Resistenz gegenüber NLPs gesucht. Hierfür wurden transgene *Arabidopsis thaliana* Col-3 aus dem Labor von Sophien Kamoun verwendet, welche NLP_{PS} unter Kontrolle eines Dexamethason (DEX)-induzierbaren Promotors exprimieren und nach Induktion der NLP-Expression durch einen NLP-induzierten systemischen Zelltod sterben. Eine zufallsgerichtete Mutagenese durch Ethylmethansulfonat (EMS) sollte potentielle NLP-Zielmoleküle mutieren und somit Insensitivität gegenüber den NLPs vermitteln. Der verwendete konditional letale Ansatz erlaubte es, eine Vielzahl zufällig mutierter Linien zu durchsuchen.

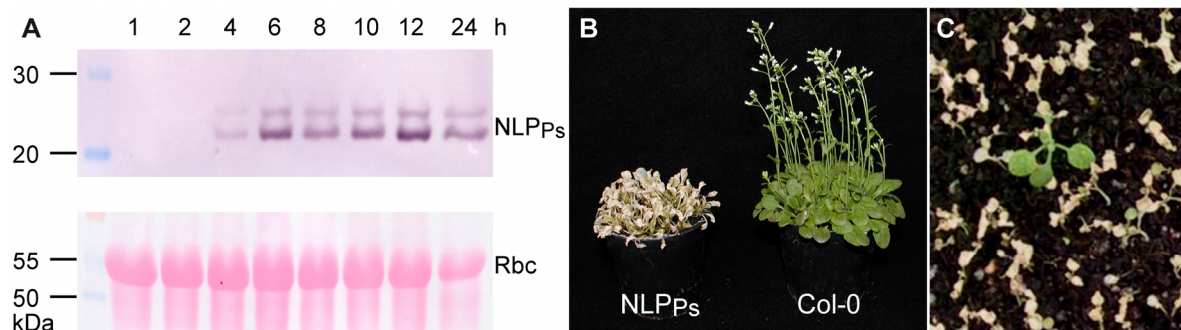


Abb. 3-2: Analyse der DEX::NLP_{PS}-Pflanzen.

Die Expression von NLP_{PS} wurde in drei Wochen alten Pflanzen mittels Western Blot überprüft (A). Die stärkste Expression erfolgt zwischen 6 und 12 h nach Behandlung mit 5 μM DEX. Sichtbar ist NLP_{PS} mit Signalpeptid sowie das sekretierte reife NLP_{PS} ohne Signalpeptid. Als Ladekontrolle dient die Ponceau-S-Färbung der großen Rubisco-Untereinheit (Rbc). In B ist der Zelltodphänotyp 5 Tage nach DEX-Behandlung dargestellt. Zur Selektion von resistenten Linien (C) wurden 10 Tage alte Pflanzen mit DEX behandelt und überlebende Pflanzen vereinzelt.

Nach Induktion mit 5 μM DEX kann die Expression von NLP_{PS} per Western Blot nachgewiesen werden (Abb. 3-2 A), wobei die höchste Proteinmenge zwischen 6 und 12 Stunden nach der Induktion auftritt. Weiterhin wird durch die induzierte NLP_{PS}-Expression ein Zelltodphänotyp ausgelöst (Abb. 3-2 B). Dieser ist bereits ca. 6 h nach DEX-Behandlung durch leichte Welkungserscheinungen sichtbar und ist unabhängig vom Entwicklungsstadium der Pflanzen. Mit DEX behandelte WT-Pflanzen hingegen zeigen keine vergleichbare Reaktion. Die Samen der T₃-Generation dieser Linie wurden mittels EMS mutagenisiert. Aus der M₃-Generation wurden nach zweifacher DEX-Behandlung etwa 1000 NLP_{PS}-insensitive Pflanzen entsprechend Abb. 3-2 C selektiert. Nach einer Woche wurde die DEX-Behandlung wiederholt und die Expression von NLP_{PS} nach 8 h überprüft. So konnten ca.

50 Linien selektiert werden, die NLP_{PS}-Signale auf dem Western Blot aufwiesen. Die restlichen 950 Linien wurden verworfen, da sie keine NLP_{PS}-Expression zeigten. Die Gründe hierfür könnten in Mutationen innerhalb des Proteinbiosyntheseapparates oder des DEX-Konstruktes liegen, die zu fehlerhafter Translation oder Transkriptionsabbruch führen.

Die nächste Generation dieser Linien wurde im Alter von 3 Wochen erneut mit DEX behandelt, um die Resistenz gegen NLP_{PS} zu verifizieren und eventuell instabile Linien auszusortieren. Ebenso wurde die Expression von NLP_{PS} analysiert, die NLP-Resistenz nach Infiltration von NLP_{PP} überprüft und das Konstrukt sequenziert. Exemplarisch sind in Abb. 3-3 der Zelltodphänotyp und das zugehörige Expressionsmuster einiger Linien dargestellt. Es zeigte sich, dass mehrmaliges Besprühen mit DEX bei einigen Linien dennoch eine Zelltodreaktion hervorrufen kann (Abb. 3-3 A), die den nichtmutagenisierten NLP_{PS}-Pflanzen vergleichbar ist (z. B. Linie 4-25). Andere Linien zeigen einen schwächer ausgeprägten (Linie 6-3 und 15-1) beziehungsweise keinen Zelltodphänotyp (Linie 10-11, 14-12, 14-14 und 15-6). Vergleicht man diese Symptome mit den Signalen des Western Blots, wird deutlich, dass die Stärke des Zelltodes mit der Stärke der Expression korreliert (Abb. 3-3 B). Pflanzen der Linie 4-25 z. B. exprimieren NLP_{PS} ähnlich stark wie nichtmutagenisierte NLP_{PS}-Pflanzen und überleben die Behandlung nicht. Die Expression von NLP_{PS} in den Linien 6-3 und 15-1 ist etwas schwächer und verursacht nur partiell auftretende Nekrosen. Bei den insensitiven Linien 10-11, 14-12 und 14-14 ist NLP_{PS} fast nicht mehr detektierbar. Die einzige Ausnahme in dieser Reihe bildet die Linie 15-6, welche trotz des fehlenden Zelltodes nach DEX-Induktion starke Signale im Western Blot aufweist. Bei dieser Linie wurde jedoch ein Basenaustausch in der NLP_{PS}-Sequenz festgestellt, welcher zu einem vorzeitigen Stopkodon zehn Aminosäuren vor dem Ende des Proteins führt. Nach Infiltration von 2 µM, 1 µM und 0,5 µM NLP_{PP} reagieren all diese Pflanzen mit Ausbildung von Nekrosen, ohne Unterschied in der Sensitivität bezüglich der drei verschiedenen Konzentrationen (Daten nicht gezeigt).

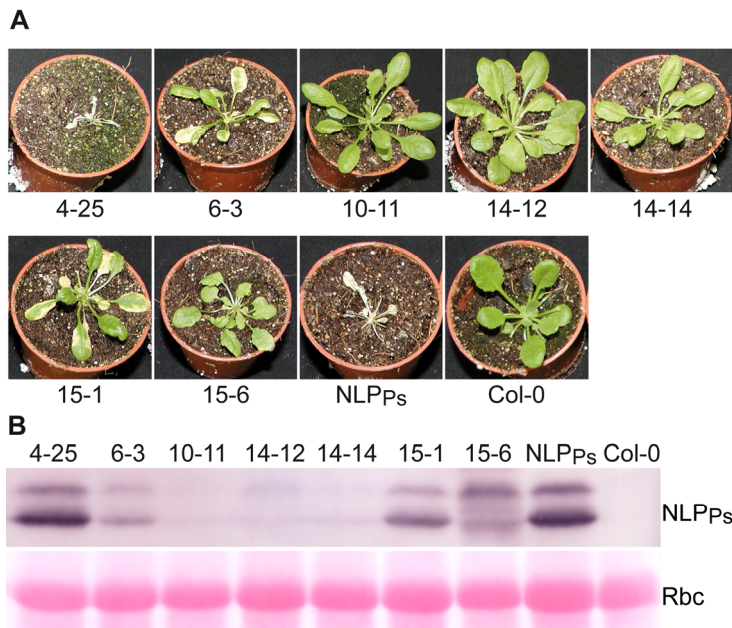


Abb. 3-3: Analyse der Folgegeneration der selektierten NLP_{ps}-insensitiven Linien.

Phänotypen einiger als NLP-insensitiv identifizierter Linien im Alter von drei Wochen, drei Tage nach Behandlung mit 5 μ M DEX (A). Die NLP_{ps}-Expressionsanalyse der Pflanzen 8 h nach Induktion zeigt NLP_{ps} mit Signalpeptid sowie das sekretierte reife NLP_{ps} ohne Signalpeptid (B). Als Ladekontrolle dient die Ponceau-S-Färbung der großen Rubisco-Untereinheit (Rbc).

Auf die beschriebene Weise wurden ca. 1,8 Mio. mutagenisierte Pflanzen auf Resistenz gegenüber NLP_{ps} untersucht, aus denen etwa 50 insensitive Linien selektiert wurden. Diese sogenannte Insensitivität beruht jedoch ausschließlich auf geringerer Expression von NLP_{ps} oder auf Fehlern im Konstrukt. Echte NLP-resistente Linien, welche z. B. auch nach Infiltration von NLP_{pp} keine oder schwächere Zelltodsymptome zeigen, wurden nicht identifiziert. Nach der Anzahl durchsuchter Pflanzen wurde keine Selektion „echter Überlebender“ mehr erwartet und so wurde der Screen eingestellt. Möglicherweise haben Mutationen, welche NLP-Interaktoren betreffen, letale Auswirkungen. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die entsprechenden Gene Mitglieder von größeren Genfamilien darstellen und die NLP-Insensitivität durch Redundanz ausbleibt. Weder Letalität noch Redundanz treten jedoch nach Mutation von bekannten PRRs auf, wie z. B. den Rezeptoren für flg22 und EF-Tu (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Zipfel *et al.*, 2006).

3.2.2 Lokalisation des NLP-Wirkortes

Da die nekrotisierende Aktivität von NLPs offenbar nicht auf einer Interaktion mit klassischen PRRs beruht, wurden Analysen zur Spezifizierung des NLP-Wirkortes durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Dr. Dinah Qutob (London, Ontario, Kanada) wurde untersucht, ob NLPs intrazellulär oder extrazellulär wirken. Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana*-Blätter durch „particle bombardment“ transient mit NLP_{ps}-

Konstrukten mit und ohne Signalpeptid zur Sekretion transformiert. Gleichzeitig wurde ein β -Glukuronidase (GUS)-Konstrukt kotransformiert, um die Vitalität der transformierten Zellen zu visualisieren.

Abb. 3-4 A zeigt, dass GUS-Aktivität ausschließlich nach Kotransformation mit dem NLP_{PS}-Konstrukt ohne Signalpeptid vorhanden ist. Nach Kotransformation mit dem NLP_{PS}-Konstrukt mit Signalpeptid sterben die transformierten Zellen, so dass kein aktives GUS-Protein vorhanden ist. Demnach scheint die Aktivität von NLPs eine Interaktion mit der extrazytoplasmatischen Seite der Pflanzenzelle zu erfordern (Qutob *et al.*, 2006).

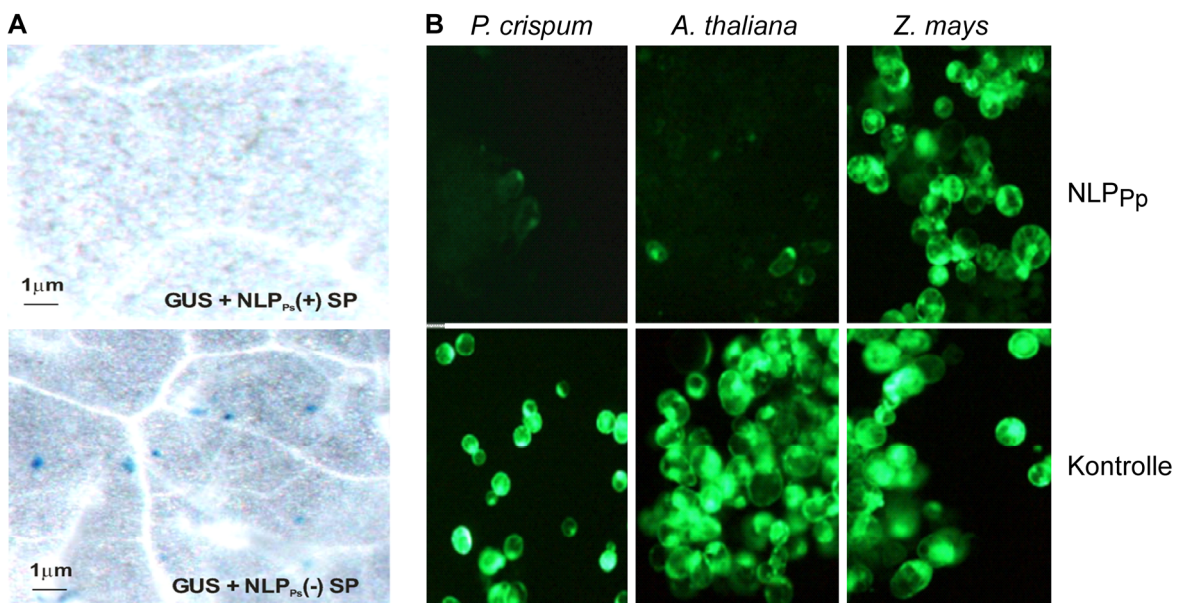


Abb. 3-4: NLPs wirken an der äußeren Seite der Plasmamembran.

Durch „particle bombardment“ transformierte *Arabidopsis thaliana*-Zellen sterben nur, wenn das NLP_{PS}-Konstrukt ein Signalpeptid zur Sekretion trägt (A). In der Vitalitätsfärbung von Protoplasten aus *Petroselinum crispum*, *Arabidopsis thaliana* und *Zea mays* wird deutlich, dass NLPs nur in Protoplasten aus Dikotyledonen Zelltod auslösen und hierfür keine Zellwand benötigen (B). Aus Qutob *et al.*, 2006.

Um herauszufinden, ob für diese Interaktion nur die Plasmamembran oder auch Komponenten der Zellwand erforderlich sind, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Frédéric Brunner (Tübingen) die Auswirkung von NLPs auf Protoplasten analysiert. Fluoreszenz durch Vitalitätsfärbung mit Fluoresceindiacetat tritt nach NLP_{pp}-Behandlung nur in den insensitiven *Zea mays*-Protoplasten auf (Abb. 3-4 B). Das Sterben von Protoplasten der Dikotyledonen *Petroselinum crispum* und *Arabidop-*

sis thaliana zeigt, dass keine Zellwand für die NLP-Aktivität benötigt wird. Vielmehr ist ein Kontakt mit der äußeren Seite der Plasmamembran erforderlich.

Es ist dennoch vorstellbar, dass sich die Lokalisation des Proteins oder von Teilen des Proteins nach Kontakt mit der Plasmamembran ändert. Bei vielen Toxinen tritt an der Plasmamembran eine Prozessierung mit anschließender Internalisierung ein (Parker und Feil, 2005). Um Lokalisationsstudien auf zellulärer Ebene durchzuführen, wurde NLP_{Pp} mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert. Dies führt zu keiner Beeinträchtigung der nekrotisierenden Wirkung, da auch das markierte Protein nach Infiltrationen in *A. thaliana* Nekrosen auslöst (Daten nicht gezeigt). Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden mit einer Endkonzentration von 50 nM Cy3-NLP_{Pp} versetzt und am Fluoreszenzmikroskop beobachtet.

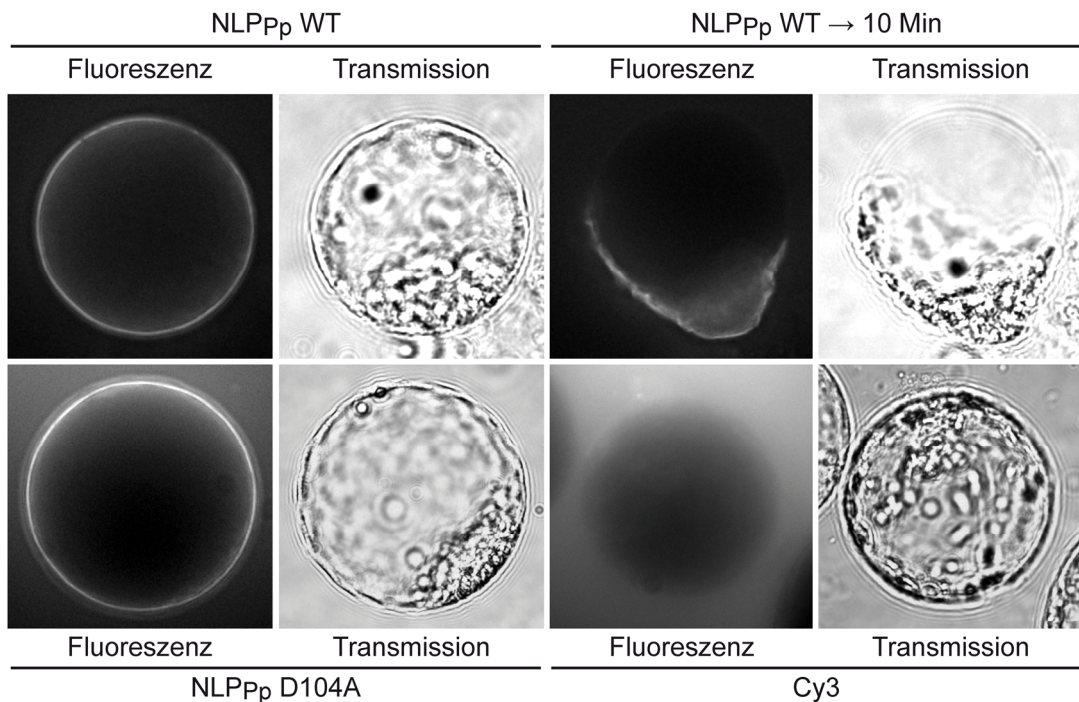


Abb. 3-5: Lokalisationsstudien mit Cy3-markiertem NLP_{Pp}.

Protoplasten aus *Arabidopsis thaliana* wurden mit 50 nM Cy3-NLP_{Pp} WT, Cy3-NLP_{Pp} D104A und mit freiem Cy3 als Kontrolle versetzt. Sowohl Cy3-NLP_{Pp} WT als auch D104A lagern sich innerhalb von 10 Minuten an die Plasmamembran an. Nur im Fall des WT-Proteins erfolgte bei 90 % der analysierten Protoplasten innerhalb der nächsten 2-10 Minuten ein Zerplatzen der Zelle, so dass Zellinhalte frei wurden.

Im Fluoreszenzlicht ist nach Behandlung mit Cy3-NLP_{Pp} WT über eine Zeit von 10 bis 30 Minuten eine Verdichtung der Fluoreszenz an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 3-5). Ist die Plasmamembran der Protoplasten durchgehend

gefärbt, platzt die Zelle nach 2 bis 15 Minuten und die Vakuole tritt aus. Dabei verbleibt die Fluoreszenz an der Membran. Weder die Vakuole zeigt eine Färbung noch frei werdendes Zytoplasma oder frei werdende Organellen. Es wurden 20 gefärbte Protoplasten über einen Zeitraum von 15 Minuten beobachtet, bei etwa 90 % traten die beschriebenen Auswirkungen auf. Der Zelltod geht also mit einer Zerstörung der Plasmamembran einher, wobei sich die Lokalisation des markierten Proteins ausschließlich auf diese beschränkt und keine nachfolgende Internalisierung zu beobachten ist.

Die Untersuchungen wurden zum Vergleich außerdem mit einer inaktiven NLP-Mutante, Cy3-NLP_{Pp} D104A (siehe 3.3), und mit freiem Farbstoff durchgeführt. Eine Behandlung mit NLP_{Pp} D104A führt ebenfalls zu einer Färbung der Plasmamembran, jedoch wurde über 15 Minuten bei keinem der 20 beobachteten Protoplasten eine Zerstörung der Membran ausgelöst. Freies Cy3 lagert sich nicht an die Plasmamembran an.

3.2.3 Analyse der Plasmamembranintegrität nach NLP-Behandlung

Die zytoplasmatischen Lokalisationsstudien mit Cy3-markiertem Protein weisen darauf hin, dass NLPs ausschließlich mit der Plasmamembran interagieren und eine Zerstörung derselben verursachen. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, wurde die Auswirkung von NLPs auf Membranen genauer erforscht. Tierische und artifizielle Membransysteme wurden auf Veränderung der Integrität nach NLP_{Pp}-Behandlung bereits untersucht. Es wurden jedoch keinerlei membrandestabilisierende Auswirkungen von NLP_{Pp} beobachtet (Qutob *et al.*, 2006).

Um die Auswirkungen von NLPs auf pflanzliche Plasmamembranen zu analysieren, wurde eine Methode ähnlich der zur Untersuchung porenbildender Toxine angewandt. Vesikel aus hochreinen Plasmamembranen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Calcein gefüllt, welcher in hohen Konzentrationen seine Fluoreszenz selbst unterdrückt. Eine Zerstörung der Membran kann man verfolgen, wenn der Farbstoff austritt und aufgrund der stattfindenden Verdünnung fluoresziert. Als Pflanzenmaterial wurde für die Aufreinigung der Plasmamembranen die einkeimblättrige Pflanze *Commelina communis* sowie die zweikeimblättrige Pflanze *Nicotiana tabacum* verwendet. Die Anreicherung der Plasmamembranen aus Gesamtmikrosomen mittels einer Zweiphasenextraktion (Larsson *et al.*, 1987)

wurde durch einen Western Blot überprüft (Abb. 3-6). Hierbei wurde die gleiche Proteinmenge von Mikrosomen und Plasmamembranen geladen und mit einem Antikörper gegen die Plasmamembran-ATPase detektiert. Da angenommen wird, dass sich der Wirkort der NLPs an der äußeren Seite der Plasmamembran befindet (Qutob *et al.*, 2006; Abschnitt 3.2.2) und dort ein leicht saurer pH vorliegt, wurde für die Messungen zur Calceinfreisetzung ein Puffer mit pH 5,8 verwendet. Nach Zugabe von NLP_{Pp}, NLP_{Pya} und NLP_{Pcc} wurde die Fluoreszenz über 15 Minuten verfolgt und in Abhängigkeit der NLP-Konzentration untersucht. Die Freisetzung wurde als Prozentwert relativ zur maximal möglichen Freisetzung berechnet. Hierzu wurde am Ende jeder Messung 0,5 % (v/v) Triton X-100 zugegeben.

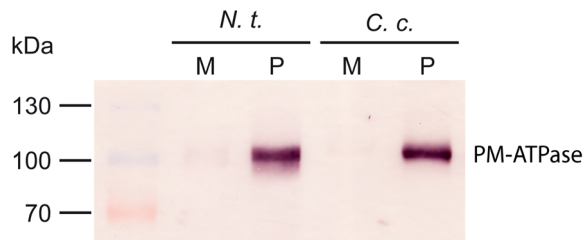


Abb. 3-6: Detektion der Plasmamembran-ATPase vor und nach der Zweiphasenextraktion.

Geladen wurden Mikrosomen-(M) und Plasmamembran-(P)fraktionen von *N. t.*, und *C. c.* mit einem Proteingehalt von 10 µg. Für beide Pflanzen ist eine deutliche Anreicherung der Plasmamembran-ATPase nach der Zweiphasenextraktion zu sehen.

Durch Zugabe von NLP_{Pp}, NLP_{Pya} und NLP_{Pcc} wird Calcein aus Plasmamembranvesikeln von *Nicotiana tabacum* in hohem Maße freigesetzt. Bei einer Konzentration von 20 nM ist das Maximum der Reaktion von ca. 60-70 % Calceinfreisetzung bereits nach 10 bis 15 Minuten erreicht (Abb. 3-7). Dass keine komplette Permeabilisierung der Vesikel erreicht wird kann durch die Anwesenheit von „inside-out“-Vesikeln erklärt werden, welche bei der Anreicherung von Plasmamembranen stets zu etwa 30 % entstehen (Johansson *et al.*, 1995; Oecking *et al.*, 1997). Die Behandlung von Vesikeln der monokotylen Pflanze *Commelina communis* hingegen führt nur zu einer geringen Freisetzung von ca. 10 %.

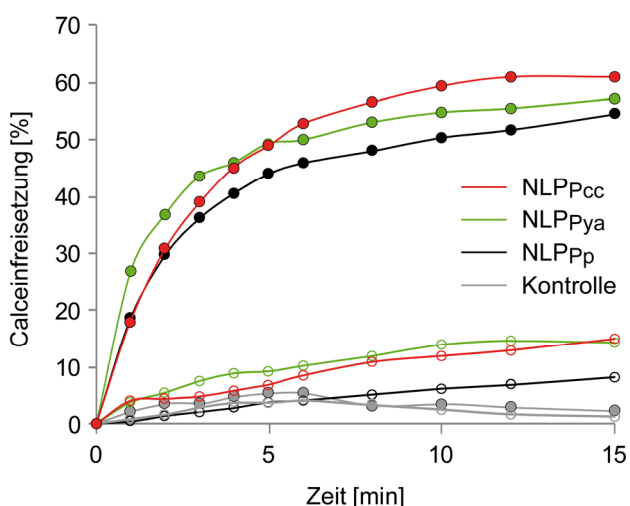


Abb. 3-7: Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln durch NLPs.

Dargestellt ist die Calceinfreisetzung durch 20 nM NLP_{Pp}, NLP_{Pya} und NLP_{Pcc} sowie die leere Vektorpräparation als Kontrolle über 15 Minuten aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* (gefüllte Kreise) und *C. communis* (ungefüllte Kreise). Die Werte sind relativ zur maximalen Freisetzung nach Tritonzugabe (0,5 %) berechnet. Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Zur Erstellung von Dosis-Wirkungskurven wurde die Calceinfreisetzung nach 15 Minuten gegen die Konzentration aufgetragen (Abb. 3-8). Vergleicht man die EC₅₀-Werte der drei NLPs, so ist erkennbar, dass NLP_{Pya} am aktivsten ist (EC₅₀ = 0,37 nM), gefolgt von NLP_{Pp} (EC₅₀ = 3,52 nM) und NLP_{Pcc} (EC₅₀ = 13,37 nM). Zu beachten ist, dass für den Vergleich der drei Proteine neben den beiden NLPs aus Oomyzeten auch das hier verwendete bakterielle NLP_{Pcc} in *Pichia pastoris*, also in einem eukaryotischen System exprimiert wurde. Aus Vesikeln von *C. communis* konnte auch bei hohen NLP-Konzentrationen keine Calceinfreisetzung erreicht werden, die ähnlich zur Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* ist.

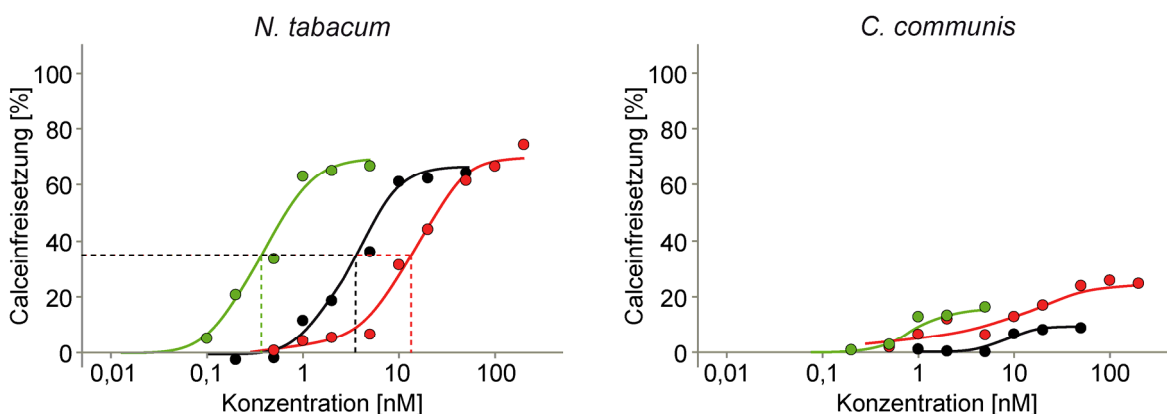


Abb. 3-8: Dosis-Wirkungskurven der Calceinfreisetzung aus *Nicotiana tabacum* und *Commelina communis*.

Dargestellt ist die Calceinfreisetzung durch verschiedene Konzentrationen von NLP_{Pp} (schwarz), NLP_{Pya} (grün) und NLP_{Pcc} (rot) nach 15 Minuten aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* und *C. communis*. Die Werte sind relativ zur maximalen Freisetzung nach Tritonzugabe (0,5 %) berechnet. NLPs verursachen eine starke Freisetzung von Calcein aus Vesikeln von *N. tabacum* (ca. 70 %). Die EC₅₀-Werte sind aus dem Schnittpunkt der gestrichelten Linie mit der x-Achse abzulesen.

Die Integrität von Plasmamembranen der dikotylen Pflanze *N. tabacum* wird also stark durch NLPs beeinflusst, während Plasmamembranen der monokotylen Pflanze *C. communis*, wenn überhaupt, nur sehr schwach permeabilisiert werden. Dies bestätigt die Beobachtungen, die bei den Lokalisierungsstudien mit Cy3-markiertem NLP_{pp} an *A. thaliana*-Protoplasten gemacht wurden. Die unterschiedliche Veränderung der Integrität von Membranen aus Dikotyledonen und Monokotyledonen spiegelt die unterschiedliche nekrotisierende Aktivität der NLPs in diesen Pflanzen wider. Unterschiede in der Komposition der Plasmamembranen könnten die Erklärung für die selektive Aktivität von NLPs sein. Außerdem lässt sich schlussfolgern, dass das primäre Angriffsziel der NLP-Wirkung die äußere pflanzliche Plasmamembran ist (vgl. 3.2.2; Qutob *et al.*, 2006).

3.2.4 Ansätze zur Identifizierung von NLP-Zielmolekülen

Der in Kapitel 3.2.1 beschriebene genetische Screen zur Identifizierung NLP-insensitiver Mutanten in *Arabidopsis thaliana* verlief ohne Erfolg. Versuche mit farbstoffgefüllten Vesikeln aus Plasmamembranen haben gezeigt, dass die NLP-Aktivität auf dieses Zellkompartiment gerichtet ist (siehe 3.2.3). Plasmamembranvesikel wurden im Folgenden verwendet, um die Eigenschaften von NLP-Zielmolekülen einzuschränken.

Die komplexe Zusammensetzung pflanzlicher Plasmamembranen ist nicht bis ins Detail bekannt. Wie bei allen biologischen Membranen sind aber auch hier integrale und periphere Membranproteine in eine Lipiddoppelschicht eingebettet oder angelagert. Ob solche Membranproteine eine Rolle für die NLP-Aktivität spielen, wurde im folgenden Experiment analysiert. Hierfür wurden Plasmamembranvesikel mit der Proteinase Trypsin behandelt, einer Endopeptidase, die Peptidbindungen C-terminal von den Aminosäuren Arginin und Lysin spaltet. Die Reaktion wurde nach einstündigem Verdau mit Trypsininhibitor abgestoppt. Der erfolgreiche Abbau der Membranproteine wurde mittels Western Blot mit einem Antikörper gegen die Plasmamembran-ATPase überprüft. Anschließend wurden die Vesikel mit NLP_{pp} behandelt und die Calceinfreisetzung verfolgt.

Nach der Trypsinbehandlung fehlt das Signal der Plasmamembran-ATPase auf dem Western Blot, in der Kontrollspur mit unbehandelten Vesikeln ist es hingegen deutlich sichtbar (Abb. 3-9 A). Die desintegrierende Aktivität der NLPs verändert

sich durch diesen tryptischen Verdau der Membranvesikel jedoch nicht (Abb. 3-9 B). Ähnlich wie bei unbehandelten Vesikeln mit einer Calceinfreisetzung durch NLP_{Pp} von 54 % wird aus den tryptinverdauten Vesikeln 60 % des Calceins freigesetzt. Dieses Resultat impliziert, dass der Proteinanteil der Plasmamembran als Ziel und für die Aktivität der NLPs unwichtig ist. Vielmehr scheinen andere Komponenten der Plasmamembran, wie z. B. Lipide, eine wichtigere Rolle dabei zu spielen.

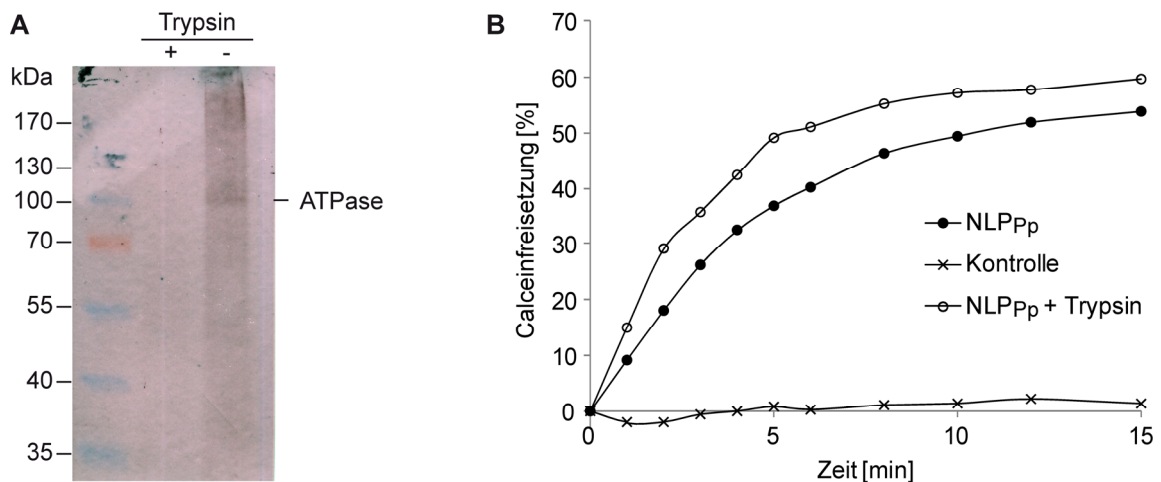


Abb. 3-9: Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln nach Trypsinverdau.

Calceingefüllte Plasmamembranvesikel aus *N. tabacum* wurden nach dem tryptischen Verdau per Western Blot bezüglich PM-ATPase analysiert (A). Geladen wurden Vesikel mit einem Proteingehalt von 500 ng sowie das entsprechende Volumen nach dem Verdau. Anschließend wurde die Calceinfreisetzung durch NLP_{Pp} im Vergleich zur Leervektorkontrolle und zur Freisetzung durch NLP_{Pp} aus nichtverdauten Vesikeln analysiert (B). Das Experiment wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen durchgeführt.

Um festzustellen, ob bzw. welche Lipidkomponenten als Zielmoleküle für NLPs dienen könnten, wurde die inhibitorische Wirkung von Lipiden auf die NLP-vermittelte Zerstörung der Plasmamembran untersucht. Verwendet wurden hierfür Phospholipide, Sterole, Sphingolipide, Ceramide und Glykosylglyceride. Zwar sind nicht alle diese Komponenten in pflanzlichen Plasmamembranen vorhanden, könnten aber strukturelle Ähnlichkeit zu vorkommenden Lipiden besitzen und im Falle einer Inhibierung Hinweise auf diese liefern. NLP_{Pp} -Lösung wurde mit 1000-fachem Überschuss an Masse der verschiedenen Lipide versetzt und 1 h inkubiert. Zur Analyse der Calceinfreisetzung wurde dieses NLP_{Pp} -Lipid-Gemisch mit

Plasmamembranvesikeln aus Tabak versetzt, so dass die Endkonzentration an NLP_{Pp} 20 nM betrug.

Die Freisetzung von Calcein durch NLP_{Pp} -Behandlung wird in diesem Experiment nur durch zwei der eingesetzten Lipide reduziert, nämlich Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin (Abb. 3-10). Im Gegensatz zur NLP_{Pp} -Probe ohne Lipid mit einer Freisetzung von 58 % wird nach Vorinkubation mit Phosphatidylserin nur 37 % und nach Vorinkubation mit Phosphatidylinositol nur 20 % des Farbstoffes durch NLP_{Pp} freigesetzt. NLP -Vorinkubation mit Phosphoserin und Inositol können die Membranpermeabilisierung nicht herabsetzen (Daten nicht gezeigt). Für die inhibitorische Wirkung sind also nicht nur die Kopfgruppen von Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol verantwortlich, sondern auch der Lipidanteil.

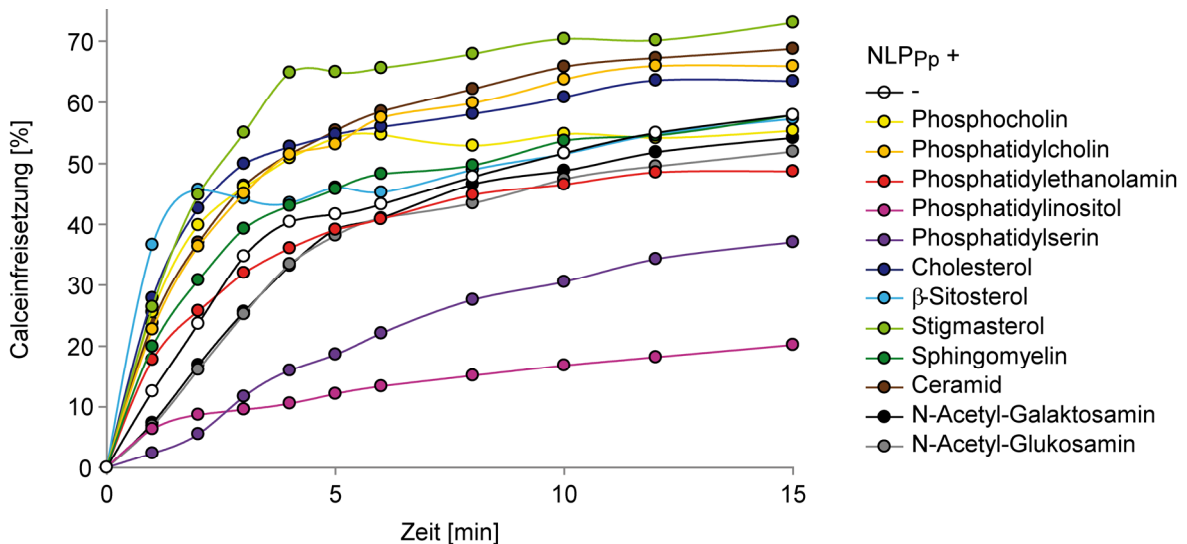


Abb. 3-10: Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* in Anwesenheit verschiedener Lipide.

NLP_{Pp} wurde mit 1000-fachem Überschuss an Masse der aufgeführten Lipide 1 h inkubiert. Bei der anschließenden Messung der Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* durch dieses Gemisch betrug die Proteinkonzentration der Vesikel 1 ng/ μ l und die NLP_{Pp} -Konzentration 20 nM. Aufgetragen ist die prozentuale Freisetzung relativ zur maximalen Freisetzung durch 0,5 % Triton X-100. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt. Phosphatidylserin und Phosphatidylinositol verursachen eine Verminderung der Farbstofffreisetzung.

Da Phosphatidylinositol die NLP -vermittelte Calceinfreisetzung vermindert, wurde auch der Einfluss der phosphorylierten Varianten dieses Lipids, der Phosphatidylinositolphosphate (PIPs), untersucht. Wie bei den Experimenten der vorherigen Abschnitte wurde NLP_{Pp} dazu mit verschiedenen PIPs unterschiedlicher Fett-

säurezusammensetzung inkubiert und anschließend mit Vesikeln gemischt. Verwendet wurde Phosphatidylinositol-4-Phosphat aus Gehirn (PI(4)P) sowie synthetisches 1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,5-bisphosphat] (PI(3,5)P₂ 8:0), 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,5-bisphosphat] (PI(3,5)P₂ 18:1), 1,2-Dioctanoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat] (PI(3,4,5)P₃ 8:0) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-[phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat] (PI(3,4,5)P₃ 18:1).

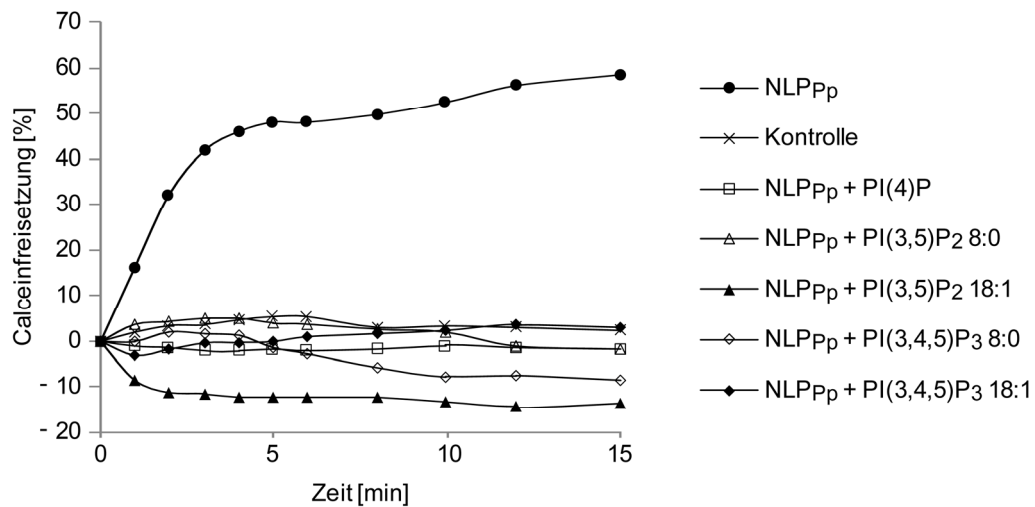


Abb. 3-11: Calceinfreisetzung in Anwesenheit von Phosphatidylinositolphosphaten.

Nach Inkubation von NLP_{pp} mit 1000-fachem Überschuss an Masse der aufgeführten Lipide wurden Plasmamembranvesikel aus *N. tabacum* zugegeben und die Calceinfreisetzung verfolgt. Die Proteinkonzentration der Vesikel betrug 1 ng/μl, die Endkonzentration von NLP_{pp} 20 nM.

Bezeichnenderweise inhibieren all diese phosphorylierten Varianten von Phosphatidylinositol die Calceinfreisetzung komplett (Abb. 3-11). Um die Effekte der verschiedenen PIPs und deren verschiedenen Fettsäurezusammensetzung genauer aufzulösen, wurden geringere Mengen der PIPs eingesetzt. Neben der inhibitorischen Wirkung von 1000-fachem Überschuss an Lipiden wurden auch die Effekte von 500-, 100- und 50-fachem Überschuss untersucht.

Tab. 3-1 stellt die inhibitorische Wirkung der verschiedenen Dosen an PIPs in Prozent der Freisetzung durch NLP_{pp} ohne Vorinkubation mit Lipiden dar. Dabei ist zu erkennen, dass 18:1-PI(3,5)P₂ und 18:1-PI(3,4,5)P₃ die höchsten inhibitorischen Effekte verursachen. Die Calceinfreisetzung ist in Anwesenheit dieser Lipide am niedrigsten und auch noch bei einem geringen Lipid:NLP-Verhältnis von 50:1 gehemmt.

% von maximaler Calceinfreisetzung durch NLP _{Pp} ohne Inhibitor				
PIP-Variante	Lipid:NLP-Verhältnis			
	1000:1	500:1	100:1	50:1
PI(4)P Gehirn	< 10	<10	40	50
8:0-PI(3,5)P ₂	<10	<20	40	50
18:1-PI(3,5)P ₂	<10	<10	<20	<20
8:0-PI(3,4,5)P ₃	<10	<20	50	70
18:1-PI(3,4,5)P ₃	<10	<20	<30	<30

Tab. 3-1: Dosisabhängigkeit der inhibitorischen Effekte von PIPs auf NLP_{Pp}.

Nach Inkubation von NLP_{Pp} mit 1000-, 500-, 100- oder 50-fachem Überschuss an Masse der aufgeführten Lipide wurden Plasmamembranvesikel aus *N. tabacum* zugegeben und die Calceinfreisetzung verfolgt. Die Proteinkonzentration der Vesikel betrug 1 ng/μl, die Endkonzentration von NLP_{Pp} 20 nM. Angegeben ist die prozentuale Freisetzung im Vergleich zur NLP_{Pp}-vermittelten Freisetzung ohne Inhibitor.

Diese Ergebnisse weisen auf eine Interaktion von NLPs mit phosphoryliertem Phosphatidylinositol hin. Welche Rolle dies *in vivo* spielt ist noch genauer zu untersuchen, da diese Moleküle bis jetzt ausschließlich auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran gefunden wurden.

3.3 Mutagenese von NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} zur Untersuchung konservierter Aminosäuren

3.3.1 Vergleich der Sequenzen aktiver NLPs und Auswahl putativ wichtiger Aminosäuren

Zur Identifizierung von Aminosäuren oder Motiven, welche essentiell für die Aktivität von NLPs sind, wurde die Primärsequenz von bereits charakterisierten nekrotisierenden NLPs (NEP1 aus *Fusarium oxysporum*, NLP_{Pp}, NLP_{Pi}, NLP_{Ps}, NLP_{PyA}, NLP_{Pcc}) nach der ClustalW-Methode miteinander verglichen. Abb. 3-12 zeigt den Vergleich dieser Sequenzen, wobei die Konsensussequenz schwarz hinterlegt ist. Die Sequenzidentität der Oomyzetenproteine ist relativ hoch (Tab. 3-2). NEP1 aus dem Pilz *Fusarium oxysporum* sowie das bakterielle NLP_{Pcc} unterscheiden sich hingegen stärker von den anderen Proteinen. Trotzdem existieren einige Bereiche, die in allen sechs Proteinen identisch sind. Besonders auffällig sind ein Motiv aus den sieben Aminosäuren GHRHDWE und einige konservierte Aminosäuren in dessen näherer Umgebung. Die Reste des Heptapeptidmotives sowie einige der anderen hochkonservierten Reste in NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} wurden einer zielgerichteten Mutagenese zu Alanin unterzogen. Die betroffenen Aminosäuren sind in

Abb. 3-12 rot umrandet. Außerdem wurde auch eine Deletion des gesamten Heptapeptidmotives durchgeführt.



Abb. 3-12: Vergleich der Aminosäuresequenz zeltodauslösender NLPs.

Die Aminosäuresequenzen von NEP1_{Fo}, NLP_{Pp}, NLP_{Pi}, NLP_{Ps}, NLP_{Pya}, und NLP_{Pcc} ohne Signalpeptid wurden in „Lasergene MegAlign“ durch die ClustalW-Methode verglichen. Die Konsensussequenz ist schwarz hinterlegt. Hochkonservierte Aminosäuren, die für die zielgerichtete Mutagenese ausgewählt wurden sind rot umrahmt. Besonders auffällig ist das Heptapeptidmotiv GHRHDWE.

		% Identität					
		NLP _{Fo}	NLP _{Pp}	NLP _{Pi}	NLP _{Ps}	NLP _{Pya}	NLP _{Pcc}
Divergenz	NLP _{Fo}		41,9	41,5	43,0	47,1	22,1
	NLP _{Pp}	114		94,5	80,1	63,6	29,0
	NLP _{Pi}	116,6	6,7		78,3	61,8	29,8
	NLP _{Ps}	108,7	28,9	32,9		65,1	27,6
	NLP _{Pya}	92,9	63,8	69,8	59,7		29,0
	NLP _{Pcc}	162,8	149,8	145,2	161,8	152,9	

Tab. 3-2: Identität und Divergenz der NLP-Proteinsequenzen.

NLPs aus Oomyzeten sind sich untereinander sehr ähnlich. Größere Unterschiede treten jedoch zu den Pilz- und Bakterien-NLPs auf.

3.3.2 Expression der mutierten Varianten von NLP_{Pp} und NLP_{Pcc}

Die mutierten Proteine wurden im Fall von NLP_{Pp} heterolog in *Pichia pastoris* exprimiert und aus dem Kulturüberstand aufgereinigt. NLP_{Pcc} wurde in *Pectobacterium carotovorum* exprimiert und aus der periplasmatischen Proteinfraction aufgereinigt. Zu beachten ist, dass in der weiteren Arbeit die Aminosäuren in NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} entsprechend NLP_{PyA} nummeriert sind, um Vergleiche mit der Kristallstruktur von NLP_{PyA} (siehe 3.3.6) zu vereinfachen.

Wie Tabelle 3-3 zeigt, konnte rekombinantes Protein nur für die Varianten NLP_{Pp} K92A, D93A, G100A, H101A, R102A, H103A, D104A, E106A, S126A, H128A, Y151A, und H159A aus dem Überstand der Hefen beziehungsweise NLP_{Pcc} K92A, D93A, G100A, H101A, R102A, H103A, D104A, E106A, S126A, H128A aus der periplasmatischen Proteinfraction von *Pectobacterium carotovorum* isoliert werden. Für die restlichen Punktmutationen sowie die Deletion des gesamten Heptapeptidmotives wurde kein Protein detektiert. Die exprimierten Proteine wurden über Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration gereinigt und in den folgenden Versuchen verwendet.

	Y86A	Y89A	K92A	D93A	G100A	H101A	R102A	H103A	D104A
NLP _{Pp}	-	-	+	+	+	+	+	+	+
NLP _{Pcc}	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	W105A	E106A	S126A	H128A	Y151A	H159A	W176A	F203A	Δ7
NLP _{Pp}	-	+	+	+	+	+	-	-	-
NLP _{Pcc}	-	+	+	+	*	*	-	-	-

Tab. 3-3: Übersicht der mutierten Aminosäuren in NLP_{Pp} und NLP_{Pcc}.

Gezeigt werden NLP-Varianten, deren Protein nach Expression erfolgreich isoliert werden konnte (+) oder nicht nachweisbar war (-). NLP_{Pp} wurde in *Pichia pastoris* exprimiert, NLP_{Pcc} in *Pectobacterium carotovorum*. Für mit * markierte Varianten wurde keine Expression durchgeführt. Bei Δ7 wurde die gesamte GHRHDWE-Sequenz deletiert.

3.3.3 Zelltodanalysen nach Infiltration der mutierten NLP_{Pp}-Proteine

Um Aussagen über die Relevanz der jeweiligen Aminosäuren für die zelltodinduzierende Aktivität der NLPs machen zu können, wurde die Ausbildung von Nekrosen nach Infiltrieren in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* untersucht. Für

die Infiltrationen der mutierten NLP_{PP}-Varianten wurde eine Proteinkonzentration von 0,5 µM verwendet.

Sechs der mutierten Variationen von NLP_{PP} zeigen bei einer Konzentration von 0,5 µM in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* eine vergleichbare Aktivität zum Wildtypprotein (Abb. 3-13). Es handelt sich hierbei um die Proteine R102A, H103A, S126A, H128A, Y151A und H159A. Die Proteine D93A, G100A und E106A sind in ihrer Aktivität deutlich beeinträchtigt und lösen bei der getesteten Konzentration in *N. tabacum* keine Nekrosen aus. *A. thaliana* reagiert bei gleicher Konzentration generell sensitiver auf NLPs als *N. tabacum*, weswegen eine schwache Reaktion auf diese Proteine zu beobachten ist. Komplette inaktive Proteine entstehen durch die Mutationen K92A, H101A und D104A, sie zeigen weder in *N. tabacum* noch in *A. thaliana* Aktivität.

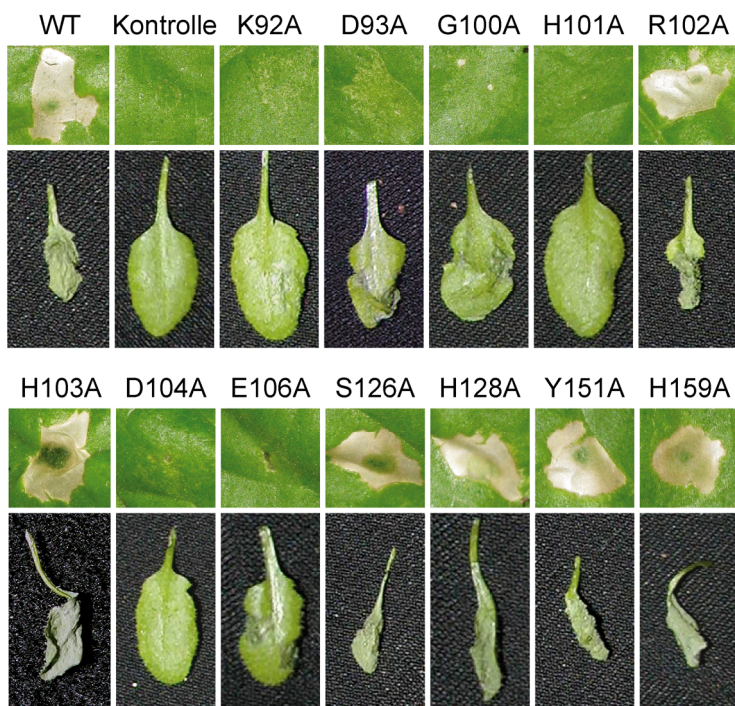


Abb. 3-13: Ausbildung von Nekrosen nach Infiltration der NLP_{PP}-Varianten.

0,5 µM NLP_{PP} WT, NLP_{PP} Mutanten sowie die Leervektorkontrolle wurden in *N. tabacum* (obere Reihe) und in *A. thaliana* (untere Reihe, schwarzer Hintergrund) infiltriert. Fotos wurden nach einem Tag bei *A. thaliana* und nach drei Tagen bei *N. tabacum* aufgenommen. In *N. tabacum* und *A. thaliana* entstehen Nekrosen bei WT, R102A, H103A, S126A, H128A, Y151A und H159A. D93A, G100A und E106 verursachen nur sehr schwache Symptome in *A. thaliana*. K92A, H101A und D104A sind gänzlich inaktiv.

3.3.4 Zelltodanalysen nach Infiltration der mutierten NLP_{PCC}-Proteine

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Infiltration der mutierten NLP_{PCC} Proteine. In Abb. 3-14 sind Symptome in *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* nach Infiltration der Proteine mit einer Konzentration von 0,5 µM gezeigt. In *N. tabacum* wurden zusätzlich steigende Konzentrationen von 0,01 µM bis 20 µM getestet (Daten nicht gezeigt). Wie bei NLP_{PP} sind auch hier die Proteinvarianten R102A,

H103A, S126A und H149A ähnlich aktiv wie das Wildtypprotein. Das Wildtypprotein und H151A lösen ab einer Konzentration von 0,2 μM Nekrosen aus, R102A, H103A, S126A und G100A ab 0,5 μM . Proteine mit Punktmutationen der Aminosäuren Y151 und H159 wurden hier nicht getestet. Mutanten mit einer reduzierten Aktivität stellen für NLP_{Pcc} K92A (ab 5 μM) und E106A (ab 10 μM) dar. Die Infiltration der Proteine mit den Mutationen D93A, H101A und D104A verursachen bei keiner der getesteten Konzentrationen Zelltod.



Abb. 3-14: Ausbildung von Nekrosen nach Infiltration der NLP_{Pcc} -Varianten.

0,5 μM NLP_{Pcc} WT, NLP_{Pcc} Mutanten sowie die Leervektorkontrolle wurden in *N. tabacum* (obere Reihe) und in *A. thaliana* (untere Reihe, schwarzer Hintergrund) infiltriert. Fotos wurden nach einem Tag bei *A. thaliana* und nach drei Tagen bei *N. tabacum* aufgenommen. In *N. tabacum* und *A. thaliana* entstehen Nekrosen bei WT, G100A, R102A, H103A, S126A und H128A. K92A und E106 verursachen nur sehr schwache Symptome in *A. thaliana*. D93A, H101A und D104A sind gänzlich inaktiv.

Vergleicht man die Aktivitäten der NLP_{Pp} - und NLP_{Pcc} -Mutanten, so unterscheiden sich diese lediglich in der stärkeren Aktivität von NLP_{Pcc} G100A gegenüber NLP_{Pp} G100A. Alle anderen Mutanten zeigen keine Unterschiede.

3.3.5 Ionenfreisetzung nach Infiltration der mutierten NLP_{Pcc} -Proteine

Als Maß für den eintretenden Zelltod kann auch der damit verbundene Austritt von Ionen dienen, welcher in Form von steigender Konduktivität in der Inkubationslösung von behandelten Infiltrationsstellen messbar ist (Dellagi *et al.*, 1998; Eppele *et al.*, 2003). Diese Methode wurde verwendet um die Ergebnisse der Zelltodanalysen aus Abschnitt 3.3.4 zu bestätigen und zu quantifizieren.

Die Experimente wurden nach Infiltration der mutierten NLP_{PCC}-Varianten mit einer Konzentration von 0,5 μ M durchgeführt. WT NLP_{PCC} führt nach 8 h zu einer Konduktivität von $214 \pm 34 \mu$ S. Pro Versuch wurde dieser Messpunkt als 100 % gesetzt und alle anderen Messpunkte wurden relativ dazu berechnet. Auch hier ist ein Konduktivitätsanstieg in der Inkubationslösung neben dem WT-Protein nur bei den Proteinen G100A, R102A, H103A, S126A und H128A zu verzeichnen (Abb. 3-15). Ähnlich zum WT-Protein verläuft die Kurve nach Infiltration von H128A, nach 8 h erreicht die Konduktivität $95 \pm 2 \%$ des WT-Wertes. Geringere Werte wurden nach Infiltration der Mutanten R102A ($75 \pm 1 \%$), H103A ($72 \pm 5 \%$) und S126A ($67 \pm 3 \%$) verzeichnet, die erst ab einer Konzentration von 0,5 μ M Nekrosen auslösen. NLP_{PCC} WT und H128A sind hingegen schon ab 0,2 μ M aktiv. Die Kurve von G100A verläuft noch niedriger und erreicht nach 8 h nur $49 \pm 9 \%$ des WT. Bei der verwendeten Konzentration können Behandlungen mit K92A ($10 \pm 1 \%$), D93A ($13 \pm 2 \%$), H101A ($12 \pm 1 \%$), D104A ($8 \pm 1 \%$) und E106A ($12 \pm 3 \%$) keine erhöhte Konduktivität im Vergleich zur Kontrollbehandlung ($10 \pm 1 \%$) hervorrufen.

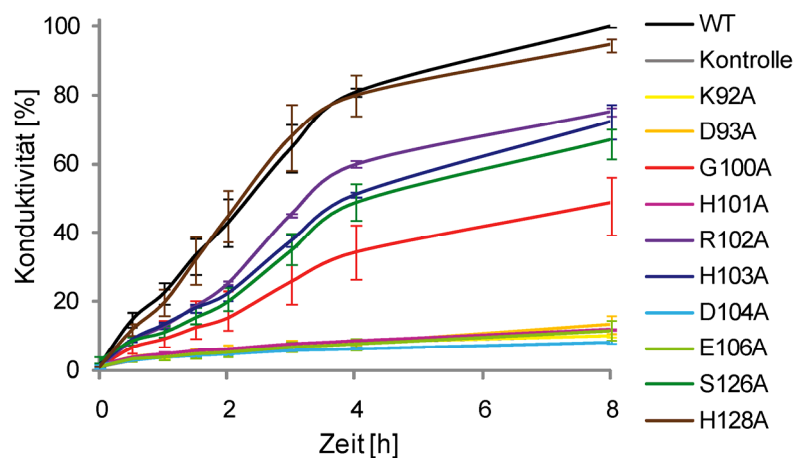


Abb. 3-15: Ionenaustritt nach Infiltration von NLP_{PCC} WT und mutierten Varianten in *N. tabacum*.

Die Proteine wurden mit einer Konzentration von 0,5 μ M in Blätter vier Wochen alter Pflanzen infiltriert. Gezeigt werden Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Konduktivität wurde relativ zum 8 h-Wert der WT-Probe (jeweils 234 bzw. 190 μ S) in Prozent berechnet. Nach dem WT-Protein sind in absteigender Reihenfolge H128A, R102, H103, S126 und G100A aktiv. K92A, D93A, H101A, D104A, E106A und die Kontrollpräparation vermitteln hingegen keine Elektrolytfreisetzung.

3.3.6 Strukturelle Eigenschaften von NLPs

Während der Durchführung dieser Arbeit gelang den Arbeitsgruppen Seitz und Oecking (Tübingen) die Aufklärung der Kristallstruktur von NLP_{Pya}. Eine Oberflächendarstellung (Abb. 3-16 A) sowie eine Modelldarstellung (Abb. 3-16 B) der NLP_{Pya}-Struktur wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Claudia Oecking zur Verfügung gestellt.

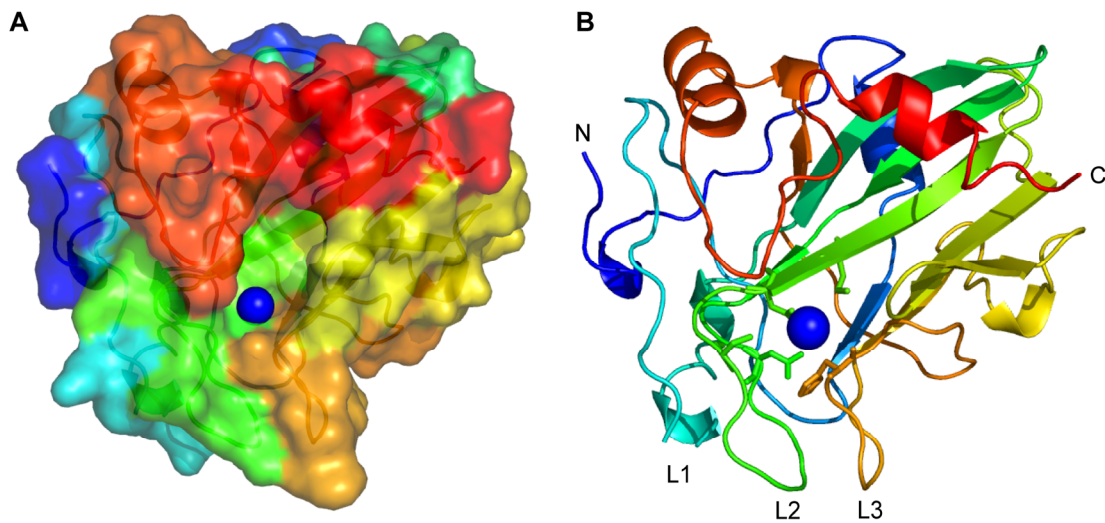


Abb. 3-16: Dreidimensionale Struktur von NLP_{Pya}.

Dargestellt sind die Oberflächenansicht (A) sowie die Cartoonansicht (B) der 3-D-Struktur von NLP_{Pya}. Das Farbspektrum von blau nach rot repräsentiert den Verlauf des Proteins vom N- zum C-Terminus. Die blaue Kugel verkörpert das in der oberflächenexponierten Grube koordinierte zweiwertige Kation. Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Claudia Oecking zur Verfügung gestellt.

NLP_{Pya} stellt ein kompakt gebautes, globuläres Protein dar, welches aus einer Domäne besteht. Das zentrale β -Sandwich aus 5 bzw. 3 nahezu parallel verlaufenden Faltblättern wird von drei α -Helices umgeben. Bei der in Abb. 3-16 dargestellten Orientierung zeichnet sich der nach oben gerichtete Teil des Proteins durch eine flache Oberfläche aus, während die Basis des Proteins eine unebene Oberfläche aufweist. Hier befinden sich drei große Loopstrukturen (L1, L2, L3), die eine keilartige Struktur ausbilden. Die bereits postulierte Disulfidbrücke zwischen den konservierten Cysteinen (Fellbrich *et al.*, 2002) konnte bestätigt werden, sie verbindet den ersten Loop mit dem zentralen β -Sandwich. Das auffälligste Merkmal von NLP_{Pya} wird in der Oberflächendarstellung (Abb. 3-16 A) deutlich. Oberhalb der drei großen Loops befindet sich eine oberflächenexponierte Grube,

welche stark negativ geladen ist. In dieser Grube ist ein zweiwertiges Kation koordiniert. Ob es sich dabei um ein Ca^{2+} - oder Mg^{2+} -Ion handelt, scheint vom Kristallisationspuffer abhängig zu sein und kann daher nicht eindeutig festgelegt werden. Interessanterweise ist das hochkonservierte Heptapeptid GHRHDWE maßgeblich an der Ausbildung der Grube beteiligt.

3.3.7 Lage der konservierten Aminosäuren in der 3D-Struktur von NLP_{Pya}

Um Einsichten in die Struktur-Funktions-Beziehung der in dieser Arbeit untersuchten konservierten Aminosäuren zu erhalten, wurde deren Lage in der Struktur von NLP_{Pya} analysiert. Jedoch musste zuerst sichergestellt werden, dass neben ähnlichen Elementen in der Primärstruktur von NLP_{Pya} , NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} eine entsprechende Ähnlichkeit in der Tertiärstruktur vorhanden ist. Hierfür wurde von Dr. Christian Ottmann und Prof. Dr. Claudia Oecking eine Modellierung von NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} auf Grundlage der NLP_{Pya} -Struktur vorgenommen.

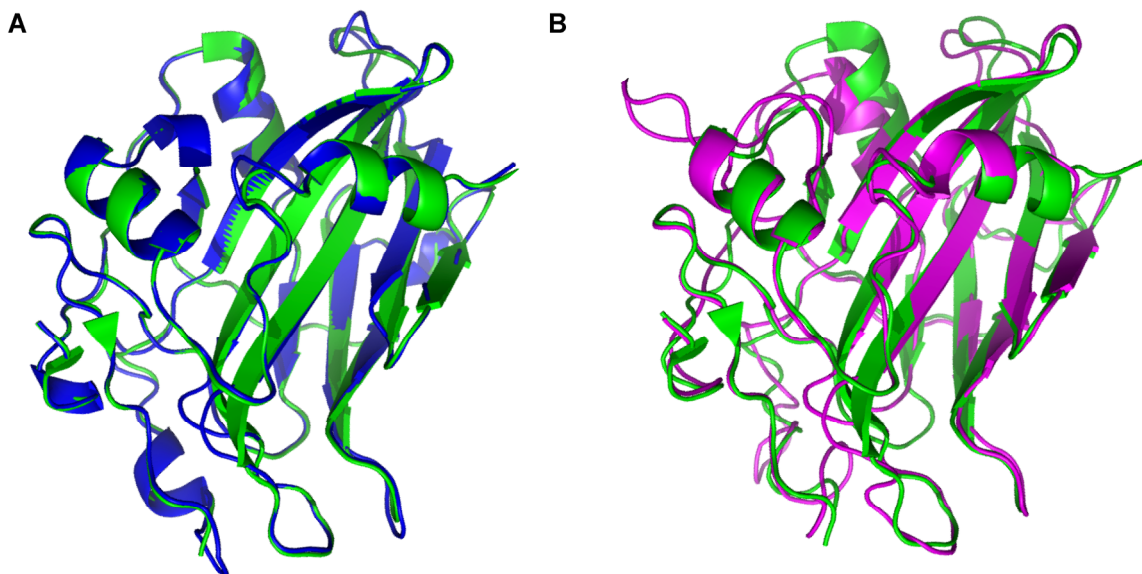


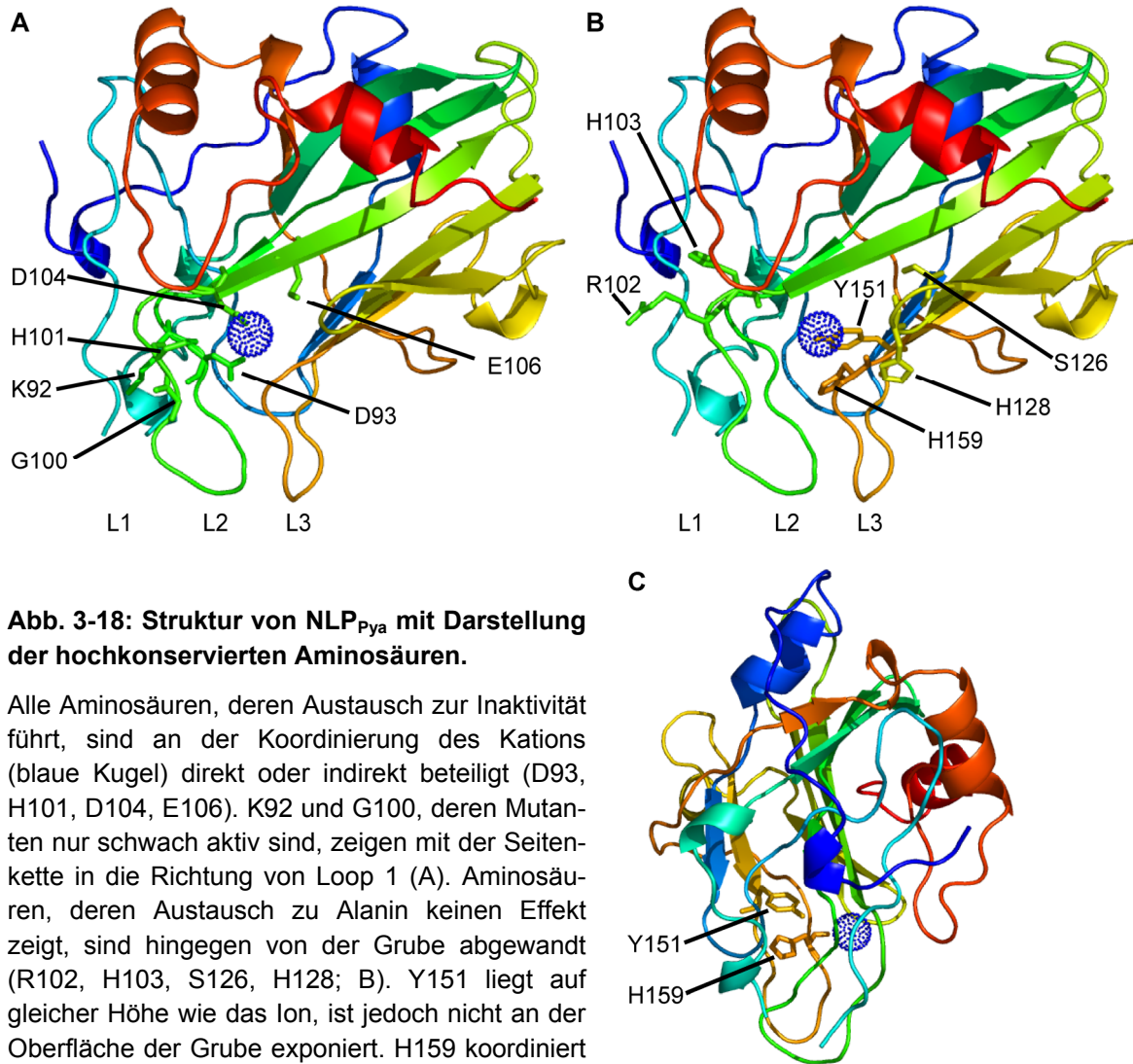
Abb. 3-17: Modellierung von NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} auf Grundlage der Struktur von NLP_{Pya} .

Die Überlagerung der NLP_{Pya} -Struktur (grün) mit der modellierten NLP_{Pp} -Struktur (blau) in A sowie der modellierten NLP_{Pcc} -Struktur (pink) in B zeigt einen nahezu identischen Aufbau, vor allem in Bezug auf Lage und Ausrichtung der α -Helices und β -Faltblätter.

Die Überlagerung der Strukturen zeigt, dass die Faltung von NLP_{Pp} nahezu identisch zu der von NLP_{Pya} verläuft (Abb. 3-17 A), was wegen der hohen primären Sequenzidentität (63,6 %) nicht überraschend war. Zwischen NLP_{Pya} und NLP_{Pcc} hingegen beträgt die Sequenzidentität nur 29,0 %. Trotzdem fügt sich NLP_{Pcc} gut in die NLP_{Pya}-Struktur ein (Abb. 3-17 B). Unterschiede treten lediglich in einigen Loopstrukturen auf. Der Verlauf von β -Faltblättern und α -Helices ist jedoch nahezu identisch. Neben der hohen Konservierung NLP-charakteristischer Aminosäuren tritt demnach auch eine hohe strukturelle Konservierung auf und bekräftigt die Annahme, dass es sich um funktionell homologe Proteine handelt.

Zum Vergleich der zelltodauslösenden Aktivität der jeweiligen NLP-Mutanten mit der strukturellen Eigenschaft der betreffenden Aminosäuren wurden von Prof. Dr. Claudia Oecking Abbildungen zur Verfügung gestellt, in denen die Seitenketten der Aminosäuren hervorgehoben sind. Bei den hochkonservierten Aminosäuren, welche zur zielgerichteten Mutagenese ausgewählt wurden, handelt es sich unter anderem um das hochkonservierte Heptapeptidmotiv GHRHDWE und einige Aminosäuren in der näheren Umgebung (siehe Abb. 3-12). Nach Austausch der Aminosäuren K92, D93, G100, H101, R102, H103, D104, E106, S126, H128 zu Alanin in NLP_{Pp} und NLP_{Pcc} konnte jeweils rekombinantes Protein gewonnen werden, im Hinblick auf NLP_{Pp} zudem für die Proteine Y151A und H159A. Die zielgerichtete Mutagenese der Aminosäuren Y86, Y89, W105, W176 und F203 zu Alanin erlaubte keine heterologe Expression der entsprechenden Proteine. Vermutlich tragen diese Aminosäuren wesentlich zur Stabilität des Proteins bei.

Alle Aminosäureauswechslungen, die zu einer mehr oder weniger stark beeinträchtigten Aktivität des Proteins führen, sind in Abb. 3-18 A eingezeichnet. Die NLP-Varianten D93A, H101A, D104A und E106A sind komplett inaktiv. Interessanterweise sind D93, D104 und E106 direkt für die Koordinierung des divalenten Kations verantwortlich. Auch H101 trägt indirekt dazu bei, indem es das zugehörige Wassernetzwerk stabilisiert (Prof. Dr. Claudia Oecking, persönliche Mitteilung). Die Seitenkette dieses Histidins konnte mittels PyMOL nicht dargestellt werden, da sie unterschiedliche Konformationen anzunehmen scheint. Entweder ist sie zum gebundenen Ion oder zum Lösungsmittel gerichtet. Somit definiert es die Abgrenzung der Grube. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Koordinierung des Kations von essentieller Bedeutung für die Aktivität von NLPs ist.



K92A und G100A sind zwar in ihrer Funktion beeinträchtigt, weisen jedoch noch eine geringe Restaktivität auf. Beide Aminosäuren sind nicht am Aufbau der Ionenbindestelle beteiligt, sondern sind oberflächenexponiert nahe Loop 1 lokalisiert. Sie könnten an der Stabilisierung des Loops beteiligt sein oder direkt mit Molekülen interagieren, welche für die NLP-Aktivität von Bedeutung sind. Dass die Lage von Loop 1 wichtig ist, zeigt auch eine intramolekulare Disulfidbrücke zwischen C37 und C63, welche den Loop 1 mit dem zentralen β -Faltblatt-Kern verbindet. Diese Disulfidbrücke ist für die Aktivität des Proteins essentiell (Fellbrich *et al.*, 2002).

In Abb. 3-18 B sind Aminosäuren dargestellt, deren Austausch zu Alanin nicht zu veränderter Aktivität führt. Hierbei ist erkennbar, dass diese Aminosäuren von der Grube abgewandt sind. Ausnahmen bilden Y151 und H159. Y151 liegt zwar auf

der gleichen Höhe wie die Grube, befindet sich aber nicht an der Oberfläche der Grube und kann so nicht in Kontakt zum Ion treten. H159 ist zwar neben D93, D104 und E106 an der Koordinierung des Ions beteiligt, jedoch ist hierfür nicht die Seitenkette, sondern die Carbonylgruppe der Hauptkette zuständig. Vermutlich ist deshalb die NLP_{Pp}-Mutante H159A noch voll aktiv. Die Lage von Y151 und H159 wird durch eine 90°-Drehung der Struktur um die vertikale Achse besser sichtbar (Abb. 3-18 C).

3.3.8 Membranpermeabilisierung durch NLP_{Pcc}-Proteinvarianten

Sowohl durch die Lokalisierungsstudien mit Cy3-markiertem NLP_{Pp} als auch durch die Permeabilisierungsexperimente mit calceingefüllten Vesikeln wird deutlich, dass NLPs die Integrität der Plasmamembran beeinflussen. Vermutlich liefert diese Zerstörung der Membran die molekulare Basis für die NLP-induzierten Nekrosen. Die mutierten Proteinvarianten der NLPs bieten ein gutes Hilfsmittel, um dieser Vermutung nachzugehen.

Die verschiedenen mutierten NLP_{Pcc}-Proteine wurden auf ihre calceinfreisetzende Aktivität aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* untersucht. Wie bei den vorhergehenden Experimenten mit mutiertem NLP_{Pcc} wurden diese Proteine in *Pectobacterium carotovorum* SCC3200 exprimiert. Das WT-Protein ist bei gleicher Konzentration etwas aktiver als das für die Dosis-Wirkungskurve in Abschnitt 3.2.3 verwendete NLP_{Pcc} aus *Pichia pastoris* und liefert maximale Calceinfreisetzung mit der in diesem Experiment verwendeten Konzentration von 20 nM. Die Änderung der Fluoreszenz wurde über 30 Minuten nach NLP-Zugabe verfolgt und die Calceinfreisetzung in Prozent relativ zur maximal möglichen Freisetzung durch 0,5 % (v/v) Triton X-100 berechnet.

Die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes nach Behandlung mit verschiedenen NLP_{Pcc}-Varianten korreliert auffällig stark mit dem Muster, welches diese Proteine bezüglich zelltodstimulierender Aktivität aufweisen (Abb. 3-19). NLP_{Pcc} WT und H128A vermitteln die Freisetzung des Farbstoffes am stärksten mit einer Freisetzung nach 30 Minuten von 61 % durch NLP_{Pcc} WT und 60 % durch NLP_{Pcc} H128A. NLP_{Pcc} R102A, H103A und S126A lösen Zelltod nach Infiltration in Tabak in leicht geringerem Maße aus als NLP_{Pcc} WT (vgl. Abschnitte 3.3.4 und 3.3.5). Sie zeigen auch hier eine leicht verminderte Calceinfreisetzung, nämlich

56 % durch S126A, 43 % durch H103A und 40 % durch R102A. K92A und G100A setzen nur 21 % und 14 % des Farbstoffes frei. Diese Proteine zeigen auch nach Infiltration erst bei hohen Konzentrationen Nekrosen (K92A, ab 5 μM ; Daten nicht gezeigt) bzw. geringere Elektrolytfreisetzung nach Infiltration von 0,5 μM Protein (G100A; Abb. 3-15). Alle anderen Proteine rufen keine höhere Farbstofffreisetzung als die Leervektorkontrolle hervor (D93A: 4 %; H101A: 7 %; D104A: 4 %; E106A: 6 %; Kontrolle: 7 %).

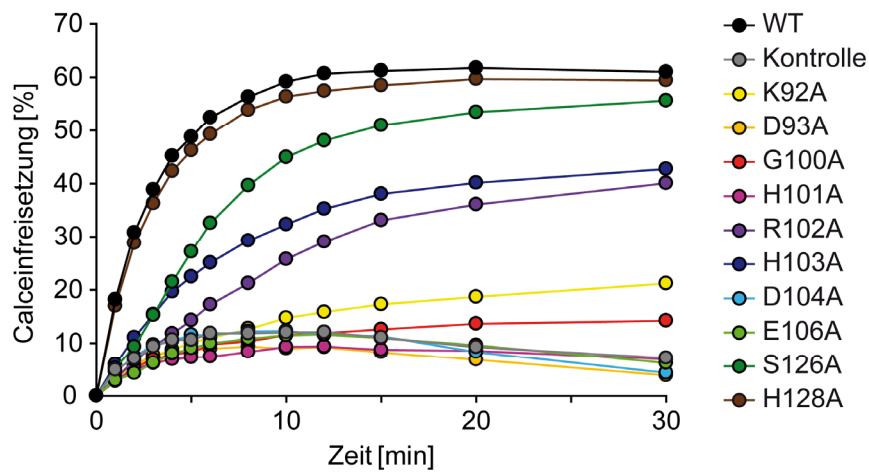


Abb. 3-19: Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* durch NLP_{PCC}-Proteinvarianten.

Die Calceinfreisetzung aus Tabak-Plasmamembranvesikeln wurde unter Anwesenheit der NLP_{PCC}-Varianten mit einer Konzentration von 20 nM verfolgt und relativ zur maximalen Freisetzung nach Tritonzugabe (0,5 %) berechnet. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Somit liegt eine klare Abhängigkeit von nekrotisierender Aktivität und Membranpermeabilisierung vor. Die Zerstörung der Membran scheint der bestimmende Mechanismus zu sein, durch den NLPs Zelltod hervorrufen.

3.3.9 Rolle des Kations für die NLP-Aktivität

3.3.9.1 Einfluss zweiwertiger Kationen auf die Aktivität von NLPs

Alle Aminosäuren, deren Mutation zu einem komplett inaktiven Protein führt, sind an der Koordinierung des zweiwertigen Ions beteiligt. Dies scheint demnach essentiell für die Funktion der NLPs zu sein. Durch den Entzug zweiwertiger Ionen mittels Chelatoren sollte dies in einem weiteren Experiment nachgewiesen werden.

Hierfür wurde die Freisetzung von Calcein aus Plasmamembranvesikeln in Anwesenheit der Chelatoren EDTA (1 mM), EGTA (5 mM) und BAPTA (5 mM) untersucht. EGTA ist bei pH 5,8 fast nicht in der Lage, zweiwertige Ionen zu komplexieren, sondern erst ab pH 7,0. Daher wurden die Messungen mit EGTA auch bei pH 7,0 durchgeführt. Hier ist die NLP_{pp}-Aktivität gerade noch zu verfolgen, bei einem höheren pH-Wert ist das Protein jedoch kaum noch in der Lage, Calcein freizusetzen (Daten nicht gezeigt).

Bei pH 5,8 wird die Aktivität von NLP_{pp} in Anwesenheit von EDTA und EGTA deutlich herabgesetzt und in Anwesenheit von BAPTA komplett inhibiert (Abb. 3-20 A). Nach 15 Minuten beträgt die Calceinfreisetzung durch NLP_{pp} ohne Chelator 70 %, mit EGTA 59 %, mit EDTA 21 % und mit BAPTA -1,6 % (negative Werte können durch die Bleichung des Fluoreszenzfarbstoffes während der Messdauer entstehen). Bei Behandlung mit der Leervektorkontrolle tritt 4 % Calceinfreisetzung auf. Bei pH 7,0 liegen Bedingungen vor, welche sowohl für EGTA als auch für EDTA zum Komplexieren zweiwertiger Ionen besser geeignet sind, also wird die NLP_{pp}-Aktivität auch durch diese Chelatoren komplett inhibiert (Abb. 3-20 B). Die Freisetzung nach 15 Minuten beträgt im Falle von NLP_{pp} alleine 22 %, mit EGTA -7 %, mit EDTA -16 % und nach Behandlung mit der Leervektorkontrolle -8 %.

Dieses Experiment zeigt, dass zweiwertige Kationen tatsächlich eine wichtige Rolle für die Aktivität von NLPs spielen, da die Permeabilisierung der Plasmamembran nach Entzug der Ionen nicht mehr stattfinden kann. Während EDTA relativ unspezifisch für zweiwertige Kationen ist, zeigen EGTA und besonders BAPTA Selektivität für Ca²⁺-Ionen. Bei dem in der Kristallstruktur von NLP_{pya} koordinierten Ion handelt es sich also wahrscheinlich um Kalzium. Es scheint nicht etwa als „Ersatzligand“ in Abwesenheit des eigentlichen Interaktionspartners der NLPs zu dienen, sondern selbst zur Aktivität der Proteine beizutragen.

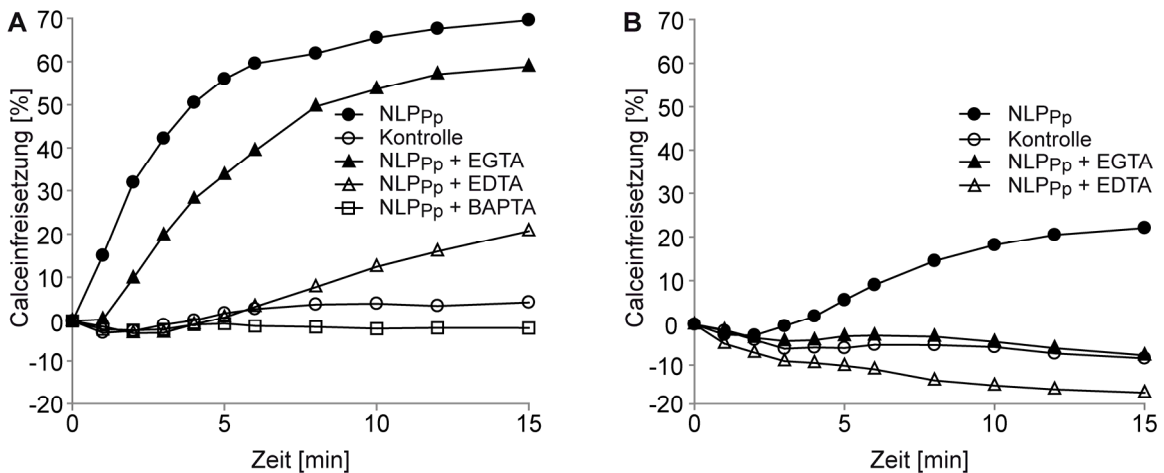


Abb. 3-20: Calceinfreisetzung in Anwesenheit von NLP_{Pp} mit und ohne Chelatoren.

Calceingefüllte Plasmamembranvesikel aus *Nicotiana tabacum* wurden mit 20 nM NLP_{Pp}, mit 20 nM NLP_{Pp} sowie äquivalenter Menge der Leervektorkontrolle und 5 mM EGTA, 1 mM EDTA oder 5 mM BAPTA behandelt. Die Messungen wurden bei pH 5,8 (A) und pH 7,0 (B) durchgeführt, wobei die Aktivität von NLP_{Pp} bei pH 7,0 verringert ist. Bei den für die jeweiligen Chelatoren angepassten Bedingungen wird die Aktivität der NLPs unterdrückt.

3.3.9.2 Die Koordinierung des Ca²⁺-Ions durch D104

In der dreidimensionalen Struktur von NLP_{Pya} scheint die Seitenkette der Aminosäure D104 dem Ion räumlich am nächsten zu sein (vgl. Abb. 3-18 A). Die negative Ladung könnte direkt an der Koordinierung des Ions beteiligt sein. Dass ein Austausch dieser Aminosäure zu Alanin zum kompletten Funktionsverlust des Proteins führt, ist aus den Ergebnissen der Abschnitte 3.3.3 bis 3.3.5 bereits bekannt. Ob die negative Ladung von D104 die entscheidende Rolle in der Koordinierung des Ions spielt, wurde durch die Herstellung zusätzlicher Konstrukte von NLP_{Pcc} mit Mutationen der Aminosäuren D104 untersucht. D104 wurde zu Aminosäuren mit ebenfalls negativ geladener Seitenkette, mit positiv geladener Seitenkette und zu einer Aminosäure mit ungeladener Seitenkette, aber ähnlicher räumlicher Größe mutiert, nämlich Glutamat, Lysin und Asparagin. Diese mutierten NLP_{Pcc}-Proteine wurden hinsichtlich nekrotisierender Wirkung, Elektrolytfreisetzung und Calceinfreisetzung untersucht.

Unter diesen NLP_{Pcc} D104-Mutanten befindet sich nur ein Protein, welches Aktivität in den durchgeführten Experimenten zeigt. NLP_{Pcc} D104E verursacht Nekrosen ab einer Konzentration von 0,5 µM (Abb. 3-21 A) und vermittelt den damit verbundenen Austritt von Ionen zu $88 \pm 20 \%$ im Vergleich zum WT-Protein (Abb. 3-21

B). NLP_{PCC} D104K und D104N hingegen lösen keine Nekrosen aus und setzen nur $20 \pm 3 \%$ (D104K) und $18 \pm 7 \%$ (D104N) der Elektrolyte verglichen mit dem WT frei. Dies entspricht ungefähr dem Wert der Kontrollbehandlung ($16 \pm 9 \%$). Studien zur Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln erlauben noch sensiblere Analysen, da sie in einem kürzeren Zeitfenster und mit einer genau definierten Menge an Plasmamembranen durchgeführt werden. Hier zeigt sich, dass NLP_{PCC} D104E zwar Einfluss auf die Integrität der Membran hat, der Effekt jedoch im Vergleich zur NLP_{PCC} WT-behandelten Probe verzögert eintritt (Abb. 3-21 C). Da die Seitenkette von Glutamat um eine CH₂-Gruppe länger ist als die des Aspartats, könnte es sein, dass bei NLP_{PCC} D104E die elektrostatische Anziehung des Interaktors zwar erfolgt, das Zusammenspiel dieser Aminosäure mit den anderen ionenkoordinierenden Aminosäuren aber nicht ideal ist und Membranen deshalb langsamer zerstört werden. Die Kurven der Ansätze mit D104K und D104N nehmen den gleichen Verlauf wie bei der Leervektorkontrolle.

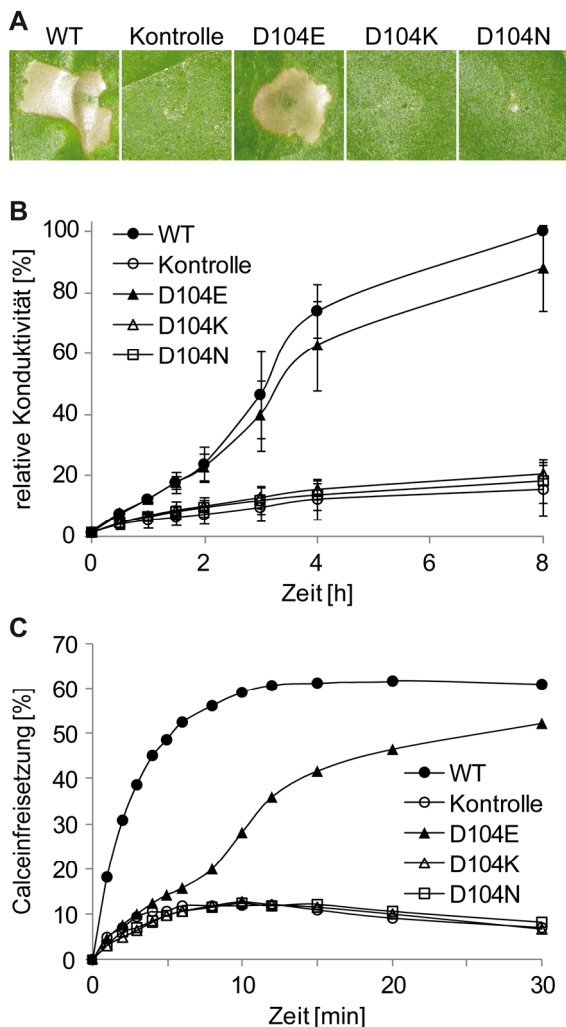


Abb. 3-21: Aktivität der NLP_{PCC}-Varianten D104E, D104K und D104N.

A: Drei Tage nach Infiltration von $0,5 \mu\text{M}$ der NLP_{PCC}-Varianten und der Leervektorkontrolle in *N. tabacum* wurden Zelltodsymptome dokumentiert. Aktiv sind NLP_{PCC} WT und D104E.

B: Die Elektrolytfreisetzung wurde nach Infiltration von $0,5 \mu\text{M}$ der NLP_{PCC}-Varianten und Leervektorkontrolle in *N. tabacum* verfolgt. Gezeigt sind Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Die Konduktivität wurde relativ zum 8 h-Wert der WT-Probe (jeweils 137 bzw. $169 \mu\text{S}$) in Prozent berechnet.

C: Nach Zugabe von 20 nM der NLP_{PCC}-Varianten und Leervektorkontrolle wurde die Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln von *N. tabacum* verfolgt.

Dieses Resultat verdeutlicht abermals die Bedeutung von Ca^{2+} für die Aktivität der NLPs und die Notwendigkeit der negativen Seitenkette des D104 für die Koordination des Ions. Weder Lysin mit einer positiv geladenen Seitenkette noch Asparagin mit einer ungeladenen Seitenkette, die in der Struktur des Proteins den gleichen Raum ausfüllen sollte wie Aspartat, sind in der Lage den Zelltod auszulösen. Das bedeutet auch, dass das Ca^{2+} -Ion nicht direkt durch die positive Ladung der Lysinseitenkette ersetzt werden kann.

3.3.10 Die nekrotisierende Aktivität der NLPs bestimmt die Virulenz

Die Komplementation eines NLP_{Pcc} -defizienten Stammes mit WT NLP_{Pcc} , NLP_{Pp} und NLP_{Pya} macht deutlich, dass die Expression von NLPs einen essentiellen Faktor für die Virulenz der NLP-produzierenden bakteriellen und Oomyzeten-Pathogene darstellt (vgl. 3.1). Offen ist jedoch die Frage, ob die zelltodauslösende Aktivität zur Virulenz beiträgt. Die beschriebenen punktmutierten NLP-Proteine bieten auch hier die Möglichkeit, diese Frage zu beantworten. Wäre die nekrotisierende Aktivität der NLPs der Auslöser für die höhere Virulenz und damit das höhere Bakterienwachstum, so sollte sich das Muster der zelltodauslösenden Aktivität unter den Punktmutanten auch im Komplementieren der Virulenz des NLP_{Pcc} -defizienten Stammes widerspiegeln. Die Experimente wurden mit den mutierten Varianten von NLP_{Pcc} wie in Kapitel 3.1 durchgeführt und die Gewebemazerierung und das Bakterienwachstum wurde im Vergleich zum WT- NLP_{Pcc} -komplementierten *Pcc nlp*⁻-Stamm dokumentiert.

Ähnlich der Nekrotisierung in Tabak (Abb. 3-14) sind deutliche Mazerierungssymptome sichtbar, wenn Kartoffeln mit NLP_{Pcc} WT-, R102A-, H103A-, S126A- und H128A-exprimierenden Bakterien infiziert werden (Abb. 3-22 B). Verschwiegend gering sind die Symptome bei Infektion mit NLP_{Pcc} K92A- und G100A-exprimierenden Bakterien. Produzieren die Bakterien hingegen NLP_{Pcc} D93A, H101A, D104A, E106A oder gar kein NLP_{Pcc} , treten keine oder lediglich sehr schwache Fäulnissymptome auf.

Vergleicht man die quantitative Auswertung des Bakterienwachstums (Abb. 3-22 A) mit der Stärke der Ionenfreisetzung in Tabak (Abb. 3-15) und der Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln durch die mutierten Proteine (Abb. 3-19), so ist ein ähnliches Muster erkennbar. NLP_{Pcc} H128A-exprimierende Bakterien zeigen

annähernd das Wachstum von WT-NLP_{Pcc}-komplementierten Bakterien (99 ± 23 %). Bei Bakterien mit den Konstrukten NLP_{Pcc} R102A, H103A und S126A beträgt das Wachstum jeweils nur 41 ± 10 %, 31 ± 14 % und 40 ± 17 %. Auch bei der Ionenfreisetzung liefern diese Mutanten geringere Werte als das WT-Protein, kommen aber immerhin auf etwa 70 %. Die Infiltration von $0,5 \mu\text{M}$ NLP_{Pcc} G100A verursacht nur eine sehr schwache Elektrolytfreisetzung, K92A löst Zelltod gar erst ab einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ aus. Auch in diesem Experiment wird die Virulenz des NLP_{Pcc}-defizienten Stammes durch Expression von NLP_{Pcc} K92A und G100A allenfalls minimal erhöht, mit einem Wachstum von 17 ± 3 % und 12 ± 2 %. Alle anderen Proteine vermitteln keine deutlich erhöhte Virulenz im Vergleich zum Kontrollstamm (5 ± 5 %), welcher mit dem leeren Expressionsvektor transformiert wurde. Das Wachstum beträgt 6 ± 2 % bei D93A, 8 ± 6 % bei H101A, 6 ± 3 % bei D104A und 8 ± 3 % bei E106A.

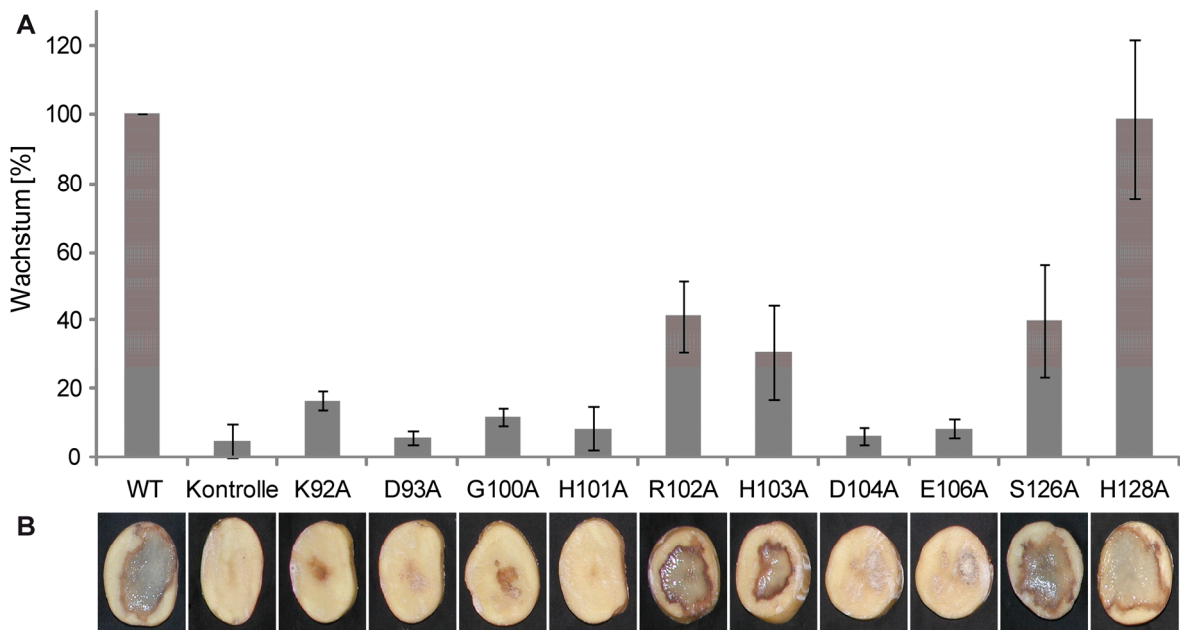


Abb. 3-22: Bakterienwachstum und Fäulnis auf Kartoffelscheiben nach Inokulation mit NLP_{Pcc}-exprimierenden *Pectobacterium carotovorum*.

Das Wachstum von NLP_{Pcc} H128A-exprimierenden Bakterien verhält sich ähnlich zu NLP_{Pcc} WT-komplementierten Bakterien. R102A, H103A und S126A können im Vergleich zum WT-Protein nur 41 %, 31 % und 40 % des Wachstums vermitteln. K92A und G100A erhöhen das Wachstum gegenüber der Leervektorkontrolle nur minimal, D93A, H101A, D104A und E106A hingegen gar nicht.

Es tritt somit eine klare Korrelation im Muster zwischen zelltodauslösender Aktivität und virulenzvermittelnder Aktivität der mutierten NLP_{PCC}-Proteine auf. Dabei wird deutlich, dass sich bereits geringste Einbußen der Zelltodaktivität drastisch auf die Virulenz auswirken. Das Abtöten der Wirtszellen durch NLPs führt zu bakterieller Fitness und letztendlich zu gesteigertem Wachstum und ist damit für die Bakterien dringend notwendig. Vermutlich werden durch die NLP-Aktivität Nährstoffe für die Bakterien aus den Kartoffelzellen freigesetzt. Somit ist die nekrotisierende Aktivität der NLPs verantwortlich für den Beitrag dieser Proteine zur mikrobiellen Virulenz.

3.3.11 Induktion abwehrspezifischer pflanzlicher Gene

NLPs wurden ursprünglich nicht nur wegen ihrer zelltodauslösenden Aktivität identifiziert, sondern auch weil sie pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen können. Eine Einordnung der NLPs in die Gruppen bereits charakterisierter, immunstimulierender Substanzen (vgl. 1.3) ist allerdings nicht trivial. Die nekrotisierende Wirkung der NLPs erinnert auf den ersten Blick an die hypersensitive Antwort (HR) von resistenten Kultivaren nach Erkennung von Avr-Effektorproteinen durch pflanzliche R-Proteine (ETI). Eine solche Abwehrreaktion dient der Pflanze aber vornehmlich dazu, die Ausbreitung biotropher Pathogene zu verhindern. Aktive NLPs wurden bis jetzt aber ausschließlich in nekrotrophen oder hemibiotrophen Organismen identifiziert, so dass sich eine R-Protein-vermittelte Induktion von Zelltod für die Pflanze eher nachteilig auswirken würde. Außerdem ist eine solche Avr-R-Protein-Interaktion meist speziesspezifisch. Selektivität bezüglich NLPs tritt aber zumindest innerhalb dikotyler Pflanzen nicht auf (Bailey, 1995). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich der NLP-vermittelte Zelltod genetisch von der HR unterscheidet und unabhängig von HR-auslösenden Faktoren wie Salicylsäure, Aktivität von SGT1b und Caspasen ist (Kanneganti *et al.*, 2006; Qutob *et al.*, 2006).

NLPs weisen auch Charakteristika klassischer PAMPs wie flg22 oder elf18 auf. Es wurde daher vermutet, dass NLPs unabhängig von der nekrotisierenden Eigenschaft zusätzlich von pflanzlichen Rezeptoren als PAMP erkannt werden (Qutob *et al.*, 2006). In früheren Untersuchungen wurde durch zufällig generierte Deletionsmutanten von NLP_{Pp} nach einem Minimalmotiv gesucht. Mit Ausnahme einer NLP_{Pp}-Variante mit einer kurzen Deletion des C-Terminus zeigten diese Proteine

weder nekrotisierende Wirkung noch Stimulierung von Abwehrreaktionen (Fellbrich *et al.*, 2002). Eine Wahrnehmung von NLPs als PAMPs könnte dem zufolge nur noch durch eine Erkennung der intakten Proteinstruktur erfolgen. Solange Punktmutanten des Proteins die Oberflächenstruktur beibehalten, wäre die zelltodaktivierende Wirkung dann nicht zwingend notwendig.

Eine weitere Erklärung für die pflanzlichen Immunantworten nach NLP-Behandlung wäre, dass die Perzeption von NLPs nicht direkt stattfindet, sondern indirekt durch Wahrnehmung von NLP-vermittelten zellulären Veränderungen. Dabei könnte es sich z. B. um zelluläre Abbauprodukte oder Abweichungen in der Ionenhomöostase als Folge der Membrandestabilisierung handeln. In diesem Fall wäre die nekrotisierende Aktivität Bedingung für das Auslösen von Immunantworten.

Um festzustellen, ob NLPs in eines der beschriebenen Muster eingeordnet werden können, wurden die mutierten Varianten von NLP_{Pcc} auf ihre Aktivität bezüglich der Stimulierung von Abwehrreaktionen untersucht. Als Maß hierfür wurde die Induktion der abwehrstimulierten Gene HIN1 und PAD3 vier Stunden nach Infiltration der Proteine in *Nicotiana tabacum* durch quantitative RT-PCR analysiert. Eine Induktion dieser Gene nach NLP-Behandlung wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Qutob *et al.*, 2006).

Vier Stunden nach Infiltration des WT-Proteins ist HIN1 32,7-fach ($\pm 0,8$) und PAD3 8,0-fach ($\pm 1,2$) im Vergleich zur Kontrollinfiltration induziert (Abb. 3-23). Eine Analyse der Expression beider Gene nach Infiltration der mutierten NLP_{Pcc}-Proteine zeigt erneut eine Übereinstimmung zur nekrotisierenden Aktivität und den virulenzsteigernden Eigenschaften der Proteine. Starke Induktionen treten nach Infiltration der zelltod- und virulenzvermittelnden Mutanten R102A (HIN1 19,1 $\pm 0,6$; PAD3 7,1 $\pm 0,5$), H103A (HIN1 14,3 $\pm 0,8$; PAD3 6,7 $\pm 0,6$), S126A (HIN1 35,1 $\pm 0,9$; PAD3 4,2 $\pm 0,9$) und H128A (HIN1 28,4 $\pm 0,9$; PAD3 5,2 $\pm 0,8$) auf. Mutanten mit schwacher zelltodauslösender Aktivität, durch deren Expression die Virulenz von *Pcc nlp* kaum gesteigert wird, führen zur Induktion der beiden Markergene. Diese fällt jedoch etwas geringer aus als bei den stark aktiven Mutanten: K92A (HIN1 6,3 $\pm 0,6$; PAD3 3,9 $\pm 0,8$) und G100A (HIN1 9,3 $\pm 0,8$; PAD3 3,5 $\pm 0,8$). Hingegen führen die inaktiven Mutanten D93A (HIN1 0,9 $\pm 0,7$; PAD3 1,3 $\pm 0,6$), H101A (HIN1 0,7 $\pm 0,7$; PAD3 1,0 $\pm 0,5$), D104A (HIN1 0,6 $\pm 0,9$; PAD3 0,7 $\pm 0,9$) und E106A (HIN1 0,8 $\pm 0,9$; PAD3 0,3 $\pm 0,9$) nicht zu erhöhter Expression von HIN1 und PAD3.

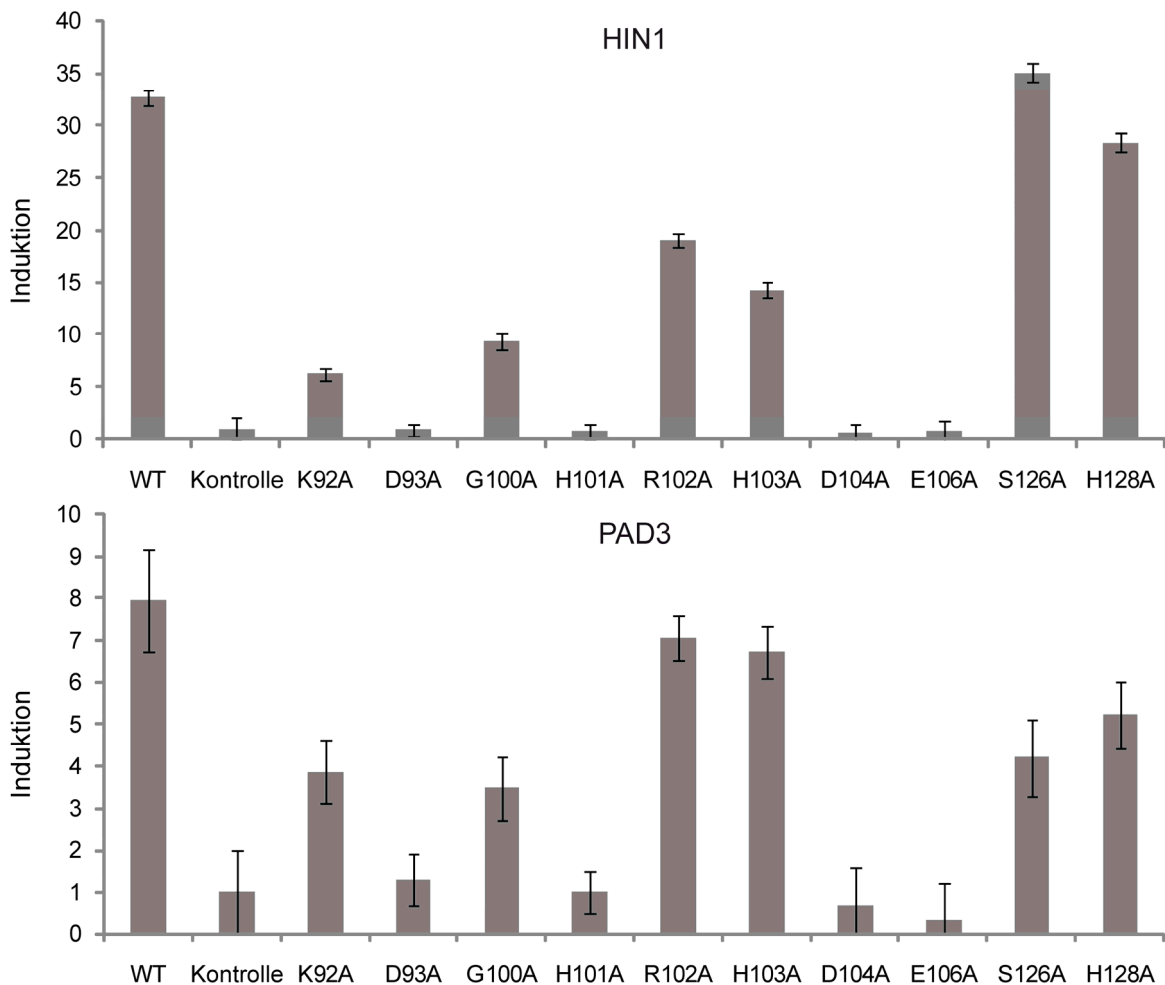


Abb. 3-23: Induktion der abwehrspezifischen Gene HIN1 und PAD3 nach Infiltration der NLP_{Pcc}-Proteinvarianten in *Nicotiana tabacum*.

Zwei *Nicotiana tabacum* Pflanzen (4-6 Wochen alt) wurden jeweils mit 0,5 μ M NLP_{Pcc} WT, Leervektorkontrolle sowie den mutierten Varianten von NLP_{Pcc} infiltriert. Nach vier Stunden wurden die infiltrierten Stellen zur RNA-Präparation geerntet und die beiden Infiltrationsstellen pro Konstrukt vereint. Die Induktion wurde mit dem Expressionsstatus der Kontrolle verglichen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung aus Triplikaten. Sowohl für HIN1 als auch für PAD3 vermitteln NLP_{Pcc} WT, K92A, G100A, R102A, H103A, S126A und H128A einen Anstieg des Transkriptlevels. Das Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Somit tritt auch beim HIN1- und PAD3-Expressionsmuster nach Behandlung mit den verschiedenen NLP_{Pcc}-Varianten eine deutliche Korrelation mit der zelltod-auslösenden Aktivität auf. Letztere scheint deshalb Voraussetzung für die Stimulierung abwehrrassoziierter Reaktionen zu sein. Eine direkte Perzeption des Proteins als PAMP wird nach diesen Ergebnissen vorerst ausgeschlossen. Ferner ist zu vermuten, dass die membrandestabilisierende Wirkung von NLPs stimulierend auf die pflanzliche Immunabwehr wirkt.

4 Diskussion

NLPs sind sekretierte Proteine aus Oomyzeten, Pilzen und Bakterien. Neuesten Datenbankanalysen zufolge umfasst die NLP-Familie gegenwärtig ca. 130 Gene (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), es ist jedoch zu erwarten, dass die Zahl mit der Sequenzierung des Genoms weiterer Organismen stark ansteigt. Für einige dieser Proteine wurde gezeigt, dass sie in dikotylen Pflanzen Nekrosen sowie Reaktionen der Immunabwehr auslösen. Diese pflanzlichen Reaktionen wurden ausgiebig untersucht, unbekannt sind jedoch die Bedeutung der Proteine für die mikrobielle Virulenz sowie eine mögliche mechanistische Verknüpfung zwischen nekrotisierender und abwehrinduzierender Aktivität der Proteine. Darüber hinaus ist die molekulare Basis der Zelltodinduktion nur wenig erforscht.

4.1 NLPs – ein Beispiel für toxininduzierte Immunität in Pflanzen

4.1.1 Die nekrotisierende Aktivität von NLPs vermittelt Virulenz

In dieser Arbeit konnten erstmals virulenzfördernde Eigenschaften zweier aus Oomyzeten stammender NLPs nachgewiesen werden. Dies gelang durch heterologe Expression in einem NLP_{Pcc}-defizienten Stamm von *Pectobacterium carotovorum*. Bedingt durch die fehlende Expression von NLP_{Pcc} weist dieser Stamm normalerweise eine verminderte Virulenz auf (Mattinen *et al.*, 2004). Die Transformation des Stammes mit NLP_{Pp} und NLP_{Pya} kann das Wachstum auf Kartoffelknollen um das 38-fache bzw. 49-fache des Wachstums von NLP_{Pcc}-defizienten Bakterien steigern (siehe 3.1). Im Vergleich zu NLP_{Pcc}-exprimierenden Bakterien beträgt das NLP_{Pp}- und NLP_{Pya}-vermittelte Wachstum ca. 30 %. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die Beobachtung zurückzuführen, dass von den Bakterien geringere Proteinmengen der beiden eukaryotischen NLPs im Vergleich zu NLP_{Pcc} produziert werden (Daten nicht gezeigt).

Der Beitrag von NLPs aus Oomyzeten zur Virulenz wurde bisher nicht analysiert, da das Herstellen von Knockoutmutanten in Oomyzeten schwierig ist. Außerdem enthalten Oomyzetengenome im Gegensatz zu bakteriellen Genomen oft mehrere NLP-Sequenzen (Gijzen und Nürnberger, 2006; Tyler *et al.*, 2006), so dass reduzierte Virulenz nach Inaktivierung eines Gens aufgrund von Redundanz eventuell

nicht detektierbar wäre. Neben den virulenzsteigernden Eigenschaften des bakteriellen NLP_{Pcc} und den beiden NLPs aus Oomyzeten in dieser Arbeit wurden virulenzfördernde Eigenschaften auch für ein pilzliches NLP nachgewiesen. NEP1 aus *Fusarium oxysporum* steigert nach heterologer Expression in *Colletotrichum coccodes* die Krankheitssymptome von infizierten *Abutilon theophrasti*-Pflanzen drastisch (Amsellem *et al.*, 2002). Nachdem NLPs aus Bakterien, Pilzen und Oomyzeten zur Virulenz pflanzlicher Pathogene beitragen, und die Virulenz des NLP-defizienten *P. carotovorum*-Stammes durch heterologe Expression von NLPs aus Oomyzeten gesteigert werden kann („Cross-kingdom“-Komplementation), können diese Proteine als generelle Virulenzfaktoren bezeichnet werden.

Offen ist, wie die Förderung der Virulenz mechanistisch zu erklären ist. Da *P. carotovorum* ein nekrotrophes Pathogen ist, wurde vermutet, dass der Einfluss von NLPs auf die Virulenz mit der nekrotisierenden Wirkung der Proteine zusammenhängt. Daher wurde untersucht, wie mutierte Varianten von NLP_{Pcc} die Virulenz des NLP_{Pcc}-defizienten Stammes beeinflussen. Mit Hilfe dieser Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Steigerung der bakteriellen Virulenz durch den NLP-vermittelten Zelltod bestimmt wird. Nach dem Komplementieren des NLP_{Pcc}-defizienten *P. carotovorum*-Stammes mit den mutierten Proteinen sind nur die zelltodauslösenden Proteine NLP_{Pcc} R102A, H103A, S126A und H128A in der Lage, die Virulenz des NLP_{Pcc}-defizienten Stammes deutlich zu erhöhen. Die bezüglich Nekrotisierung inaktiven Proteine NLP_{Pcc} D93A, H101A, D104A und E106A sowie die nur sehr schwach aktiven Proteine NLP_{Pcc} K92A und G100A können die Virulenz des NLP_{Pcc}-defizienten Stammes nicht bzw. nur minimal steigern (siehe 3.3.10).

Dies zeigt eine direkte Korrelation zwischen der zelltodauslösenden Aktivität der Proteine und ihrer Fähigkeit bakterielle Virulenz zu vermitteln. Die biologische Aufgabe der zelltodvermittelnden NLPs für das nekrotrophe Pathogen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* besteht vermutlich darin, die Wirtszellen während der Infektion abzutöten. Auch in anderen Organismen scheint dies der Fall zu sein, denn zelltodvermittelnde NLPs wurden lediglich aus nekrotrophen oder hemibiotrophen Pathogenen identifiziert. Darüber hinaus wird NLP_{Ps} von dem hemibiotrophen Pathogen *Phytophthora sojae* verstärkt beim Übergang zur nekrotrophen Phase produziert (Qutob *et al.*, 2002). Daraus ist zu schließen, dass NLPs nicht nur zur Virulenz bakterieller, sondern auch oomyzetärer Mikroorga-

nismen beitragen, sehr wahrscheinlich beim Übergang von der biotrophen zur nekrotrophen Phase des mikrobiellen Wachstums.

4.1.2 NLPs sind membrandestabilisierende mikrobielle Toxine

Da NLPs durch ihre nekrotisierende Eigenschaft zur mikrobiellen Virulenz beitragen, erfüllen sie die Kriterien eines Toxins (vgl. 1.4; Bender *et al.*, 1999). So sind alle bisher untersuchten, aus natürlichen Quellen gereinigten NLPs sowie reines rekombinantes Protein in der Lage, Zelltod hervorzurufen (Bailey, 1995; Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2002; Mattinen *et al.*, 2004; Kanneganti *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2007; Schouten *et al.*, 2008). Weiterhin stammen alle bislang charakterisierten, nekrotisierenden NLPs aus Pathogenen, welche zumindest in einer bestimmten Lebensphase von heterotrophem Wachstum abhängig sind. In diesen Organismen werden NLPs während des Infektionszyklus in Pflanzen produziert. Beispielsweise wird NLP_{Ps} aus *Phytophthora sojae* während des Übergangs von der biotrophen zur nekrotrophen Phase produziert (Qutob *et al.*, 2002). Dass die Produktion von NLPs für die Infektion wichtig ist, wurde bereits für pilzliche und bakterielle NLPs gezeigt (Amsellem *et al.*, 2002; Mattinen *et al.*, 2004). Durch die Komplementation eines NLP_{Pcc}-defizienten *Pectobacterium carotovorum*-Stammes mit NLP_{Pp} und NLP_{Py} konnte nun erstmals belegt werden, dass auch NLPs aus Oomyzeten als Virulenzfaktoren dienen (siehe 3.1). Zudem ist die zelltodauslösende Wirkung der Proteine direkt verantwortlich für die Virulenzfunktion der NLPs, da nur aktive Formen von NLP_{Pcc} den NLP_{Pcc}-defizienten *Pcc*-Stamm komplementieren können (siehe 3.3.10).

Die Korrelation zwischen Zelltodinduktion und Virulenz wirft die Frage auf, wie die toxische Wirkung der NLPs Nekrosen verursacht. Experimente mit hochreinen Plasmamembranvesikeln zeigen, dass die nekrotisierende Aktivität und die damit verbundene Virulenzfunktion von NLPs mit einer membrandestabilisierenden Aktivität einhergehen (siehe 3.2.3 und 3.3.8). Bei Untersuchungen der mutierten Proteinvarianten von NLP_{Pcc} korrelierten die virulenzfördernden Eigenschaften nicht nur mit der nekrotisierenden Wirkung der Proteine, sondern auch mit der plasmamembrandestabilisierenden Aktivität der Proteine. Daher ist ganz offensichtlich die zelltodauslösende Eigenschaft der NLPs und damit der Beitrag dieser Proteine zur Virulenz auf zytolytische Eigenschaften zurückzuführen. Außerdem wird klar, dass

es sich bei dem Zelltod um ein toxinbedingtes Krankheitssymptom handelt, für das keinerlei Reaktionen von intakten pflanzlichen Zellen benötigt werden.

Anfänglich wurden NLPs als nekroseauslösende Elicitoren und der NLP-vermittelte Zelltod als hypersensitiver Zelltod eingestuft (Bailey, 1995; Veit *et al.*, 2001; Fellbrich *et al.*, 2002). Jedoch ist die weite Verbreitung der NLPs unter Oomyzeten, Pilzen und Bakterien untypisch für HR-auslösende mikrobielle Effektoren. Ferner wirken HR-auslösende Effektoren in der Regel nur in bestimmten Kultivaren einer Spezies. Bislang wurden aber keine NLP-resistenten Spezies unter Dikotyledonen gefunden (Bailey, 1995). Genauere Untersuchungen zeigten auch, dass sich die Zelltodreaktion nach NLP-Applikation vom hypersensitiven Zelltod unterscheidet. So existieren zum einen unterschiedliche genetische Grundlagen für die beiden Zelltodreaktionen (Kanneganti *et al.*, 2006; Qutob *et al.*, 2006). Der NLP-vermittelte Zelltod ist beispielsweise unabhängig von SGT1b, einer Ubiquitinligase, welche für den hypersensitiven Zelltod erforderlich ist (Azevedo *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2006; Mayor *et al.*, 2007). Zum anderen ist der hypersensitive Zelltod abhängig von den abwehrassozierten Hormonen SA, JA und Ethylen (Pieterse und van Loon, 1999; Asai *et al.*, 2000; Pieterse und Van Loon, 2004). Im Fall von NLPs ist zwar die Induktion von PR-Genen SA-abhängig (Fellbrich *et al.*, 2002), die Ausbildung von Nekrosen zeigt jedoch keinerlei Notwendigkeit von SA, JA oder Ethylen (Qutob *et al.*, 2006).

Bereits früher wurde aufgrund der Unterschiede zu klassischen ETI-auslösenden Effektoren vermutet, dass NLPs Toxine sind (Fellbrich *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2002; Qutob *et al.*, 2006). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen diese Annahme. NLPs wirken durch die Destabilisierung der Wirtsmembran und die damit verbundene Zytolyse der Wirtszelle als virulenzfördernde Toxine. Die Zelltodreaktion stellt dabei keine pflanzliche Abwehrreaktion, sondern ein toxinbedingtes Krankheitssymptom dar.

4.1.3 Mechanismus zur Stimulation der pflanzlichen Immunität durch NLPs

NLPs bewirken in dikotylen Pflanzen die Stimulation von Abwehrreaktionen, wie beispielsweise die Aktivierung von MAP-Kinasen oder die Produktion von Ethylen und Phytoalexinen (Fellbrich *et al.*, 2002; Bae *et al.*, 2006; Qutob *et al.*, 2006). Diese NLP-vermittelten pflanzlichen Abwehrreaktionen zeigen Ähnlichkeit mit den

Reaktionen der PTI, also der Perzeption von fremden mikrobiellen Strukturen („microbe-derived non-self“), weswegen NLPs ursprünglich als PAMPs angesehen wurden. Vergleicht man das Expressionsmuster von *A. thaliana* nach Behandlung mit dem klassischen PAMP flg22 und mit NLP_{pp}, so ergibt sich eine hohe Übereinstimmung, 55,4 % der durch beide Stimuli induzierten Gene sind sogar identisch (Qutob *et al.*, 2006). Weiterhin können die NLP-stimulierten Antworten durch ETS-vermittelnde Effektoren wie AvrPto und AvrPtoB unterdrückt werden (He *et al.*, 2006; Shan *et al.*, 2008). Dies ist eine weitere Eigenschaft von PAMPs. Auch die weite Verbreitung von NLPs unter Pathogenen ist charakteristisch für klassische PAMPs wie Flagellin oder Chitin (Boller, 1995; Felix *et al.*, 1999; Pemberton und Salmond, 2004; Gijzen und Nürnberger, 2006).

Diese Arbeit liefert Hinweise für virulenzfördernde Toxineigenschaften der NLPs (siehe 4.1.1 und 4.1.2). Dass NLPs durch ihre Toxinfunktion die pathogene Virulenz steigern, zugleich aber auch als PAMPs die pflanzliche Immunabwehr aktivieren, erscheint auf den ersten Blick paradox. Denn in der Regel sind klassische PAMPs konstitutiv vorhandene, lebensnotwendige Bestandteile von Pathogenen wie Flagellin als Bestandteil des Flagellums gramnegativer Bakterien oder Chitin als Bestandteil der pilzlichen Zellwand. NLPs hingegen spielen erst bei der Infektion des Wirtes eine wichtige Rolle (vgl. auch 4.1.1). Demnach wird NLP_{ps} in *Phytophthora sojae* konstitutiv nur schwach exprimiert und seine Synthese erst im Laufe der Infektion der Sojabohne hochreguliert (Qutob *et al.*, 2002). Ein weiterer, wesentlicher Unterschied von NLPs und PAMPs ist die nekrotisierende Aktivität der NLPs, die bei PAMPs normalerweise nicht auftritt. Nur in wenigen Ausnahmefällen wurde das Auslösen einer HR nach PAMP-Behandlung in einer spezies- oder pathovarspezifischen Weise beobachtet, wie nach Pep-13-Applikation in Kartoffel oder Applikation von Flagellin aus *Pseudomonas syringae* in Nicht-Wirtspflanzen der Bakterien (Taguchi *et al.*, 2003; Halim *et al.*, 2004; Taguchi *et al.*, 2006). Kennzeichnend für PAMPs ist auch die Bindung eines Minimalmotivs an spezifische Rezeptoren. So werden zum Beispiel flg22 und elf18, die Minimalmotive der bakteriellen PAMPs Flagellin und EF-Tu, von den membrangebundenen Rezeptoren FLS2 und EFR wahrgenommen (Felix *et al.*, 1999; Kunze *et al.*, 2004; Chinchilla *et al.*, 2006; Zipfel *et al.*, 2006). Die Gene dieser Rezeptoren sind als Einzelkopien im Genom vorhanden und ihr Ausschalten führt unter nichtinfektiösen Bedingungen zu keinerlei Beeinträchtigung der Pflanzen. Deshalb ist es

auch möglich, solche Rezeptoren nach Einführen von Knockoutmutationen anhand von PAMP-insensitiven Phänotypen zu finden. Zur Identifizierung eines putativen NLP-Rezeptors wurden sowohl im Rahmen dieser Arbeit (siehe 3.2.1) als auch von Prof. Dr. Mark Gijzen (London, Ontario, Kanada) genetische Screens mit jeweils zwei unabhängigen EMS-mutagenisierten Populationen und unterschiedlichen „read-outs“ durchgeführt (Wachstumsreduktion von *A. thaliana*-Keimlingen in Gegenwart von NLP_{PS} und konditionaler Zelltod nach induzierter NLP_{PS}-Expression in *A. thaliana*). Insgesamt wurden etwa 2 Mio. M₂-Samen auf NLP-Insensitivität getestet, jedoch konnten keine resistenten Pflanzen identifiziert werden. Daher muss davon ausgegangen werden, dass Mutationen in NLP-Zielmolekülen möglicherweise zur Letalität der Pflanzen führen oder dass aufgrund genetischer Redundanz von NLP-Perzeptionssystemen in *A. thaliana* kein Phänotyp auftritt. Die rezeptorvermittelte PAMP-Erkennung beruht auf der Bindung eines Minimalmotives und auch synthetische Epitope sowie hitzedenaturierte, proteinöse PAMPs können Reaktionen der PTI auslösen. Bei NLPs scheint dies nicht der Fall zu sein, denn weder synthetische Peptide noch Deletionsmutanten von NLP_{PP} sind in der Lage, pflanzliche Immunreaktionen auszulösen (Fellbrich *et al.*, 2002). Weiterhin führt Erhitzen über 65 °C neben dem Verlust der nekrotisierenden Aktivität gleichzeitig zur Inaktivität bezüglich PAMP-assoziiertes Abwehrreaktionen (Fellbrich *et al.*, 2002). Folglich scheint sich die NLP-Perzeption von der Erkennung klassischer PAMPs zu unterscheiden.

Die Wahrnehmung von NLPs als PAMPs unabhängig von der Toxinwirkung wäre nur erklärbar, wenn anstelle eines kurzen Peptids ein Bereich gebunden wird, der eine intakte Tertiärstruktur erfordert. Beeinträchtigungen in der Aktivität des Proteins durch den Austausch einzelner Aminosäuren würden keine Rolle spielen, solange die Tertiärstruktur erhalten bleibt. Das Auslösen von Abwehrreaktionen durch Xylanase II aus *Trichoderma reesei* beispielsweise ist zwar unabhängig von der enzymatischen Aktivität des Proteins, trotzdem ist eine intakte Tertiärstruktur für die Perzeption des PAMPs nötig (Enkerli *et al.*, 1999; Furman-Matarasso *et al.*, 1999). Die vorliegenden Ergebnisse verdeutlichen allerdings, dass sich NLPs von solchen Proteinen unterscheiden. Untersuchungen mit mutierten Proteinvarianten von NLP_{PCC} zeigen, dass eine direkte Korrelation zwischen dem Auslösen pflanzlicher Abwehrreaktionen und der zelltodvermittelnden Wirkung auftritt (siehe 3.3.11). HIN1 und PAD3, Markergene für Abwehr in Tabak, werden nur durch die

zelltodhervorrufenden Mutanten NLP_{Pcc} R102A, H103A, S126A und H128A sowie die schwächer aktiven Proteine NLP_{Pcc} K92A und G100A induziert. Bei Behandlung mit den komplett inaktiven Proteinvarianten NLP_{Pcc} D93A, H101A, D104A und E106A ist der Transkriptgehalt der Markergene vergleichbar mit der Kontrolle. Dies verdeutlicht, dass die NLP-induzierte Transkription abwehrassoziierter Gene offensichtlich von der Toxinwirkung des Proteins abhängig ist. NLPs werden scheinbar nicht direkt erkannt, sondern lediglich deren Toxinaktivität.

Die Perzeption der physiologischen Aktivität mikrobieller Effektoren ist ein Merkmal der effektorvermittelten Immunität (ETI) in Pflanzen. Hier werden Avr-Proteine, wie z. B. bakterielle Typ III-Effektoren, über Rezeptoren (R-Proteine) von resistenten Kultivaren des Wirtes über die Manipulation der Aktivität eines Zielproteins wahrgenommen („microbe-induced modified host self“). Im Unterschied dazu sind NLPs jedoch nicht pflanzenkultivarspezifisch wirksam und der NLP-vermittelte Zelltod unterscheidet sich vom hypersensitiven Zelltod der ETI (vgl. 4.1.2). Eine andere mögliche Erklärung für die Korrelation von Toxinaktivität und pflanzlichen Abwehrmechanismen wäre, dass die Wirkung von NLPs endogene Gefahrensignale generiert, welche von verletzten, aber noch lebenden Zellen oder von intakten Nachbarzellen wahrgenommen werden und Abwehrreaktionen auslösen. Ein toxinbedingter Mechanismus zur Induktion pflanzlicher Abwehr wurde bisher nicht beschrieben. In Tieren hingegen ist dieses Phänomen bereits bekannt. Toxininduzierte Abwehrreaktionen können dort mit dem sogenannten Gefahrenmodell assoziiert sein, welches erstmals 1994 von Matzinger beschrieben wurde (Matzinger, 1994). Nach diesem Modell wird die Aktivierung des angeborenen Immunsystems nicht nur durch PAMPs verursacht, sondern auch durch die Perzeption von nicht-physiologischem Zelltod, Verletzung oder Stress. Dies kann z. B. durch biotischen oder abiotischen Stress, aber auch durch Tumorzellen, Transplantate und Autoimmunkrankheiten zustande kommen (Matzinger, 2002; Tournier und Quesnel-Hellmann, 2006; Kono und Rock, 2008). Dadurch wird die Ausschüttung endogener Stimuli aus intrazellulären Speichern oder deren strukturelle Änderung vermittelt. Analog zur PAMP-Nomenklatur wurden diese Signale als schadensassoziierte molekulare Muster (**d**amage-**a**ssociated **m**olecular **p**atterns, DAMPs) oder auch als Alarmine bezeichnet (Seong und Matzinger, 2004; Oppenheim und Yang, 2005). Viele tierische DAMPs sind bereits bekannt. Diese Moleküle umfassen Proteine und Peptide wie Hitzeschockproteine, HMGB1 (**h**igh-**m**obility **g**roup **b**ox 1

protein) und N-formylierte Peptide sowie nichtproteinöse Substanzen wie DNA oder ATP und membranreizende Substanzen wie kristalline Harnsäure oder Asbest (Dostert *et al.*, 2008b; Kono und Rock, 2008). Die Wahrnehmung von DAMPs in Tieren kann wie bei PAMPs sowohl durch plasmamembranlokalisierte Rezeptoren, die Toll-ähnlichen Rezeptoren (Toll-like receptors, TLRs), als auch durch zytoplasmatische Rezeptoren, die NOD-ähnlichen Rezeptoren (NOD-like receptors, NLRs), erfolgen (Akira und Takeda, 2004; Meylan *et al.*, 2006). NLR-enthaltende Proteinkomplexe, sogenannte Inflammasome, spielen eine Schlüsselfunktion in der Regulation von Entzündungsreaktionen (Martinon *et al.*, 2002). Über die Aktivierung von Caspasen vermitteln sie die Prozessierung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin 1 und Interleukin 18, woraus die Einleitung von Immunreaktionen wie z. B. Entzündungen resultiert.

Besonders interessant ist, dass auch zahlreiche Toxine Inflammasome aktivieren (Aroian und van der Goot, 2007; Freche *et al.*, 2007). Beispielsweise wird die Wirkung der porenbildenden Toxine α -Toxin aus *Staphylococcus aureus* und Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* vom Nalp3-Inflammasom erkannt und führt zur Aktivierung von Caspase-1 (Bhakdi *et al.*, 1989; Gurcel *et al.*, 2006). Die Wahrnehmung dieser Toxine basiert auf der Abnahme der zytosolischen Kaliumkonzentration, die durch die porenbildenden Eigenschaften hervorgerufen wird (Walev *et al.*, 1995). Auch die Kaliumionophoren Nigericin und Valinomycin aus *Streptomyces hygroscopicus* sowie Maitotoxin aus *Gambierdiscus toxicus* vermitteln die Aktivierung des Nalp3-Inflammasoms (Walev *et al.*, 1995; Gurcel *et al.*, 2006; Mariathasan *et al.*, 2006). Toxine, welche die Bildung von größeren Poren zur Folge haben, vermitteln neben Ionenströmen auch den Aus- oder Eintritt von organischen Verbindungen, so dass die Aktivierung des Immunsystems auch durch Perzeption der oben genannten DAMPs erfolgen kann. Dies gilt z. B. für Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* oder Streptolysin O aus *Streptococcus pyogenes* (Mariathasan *et al.*, 2006; Kanneganti *et al.*, 2007).

In Pflanzen wurden ähnliche Reaktionen beobachtet, wie z. B. die Stimulation von Abwehrreaktionen nach Ionophorbehandlung. So führte die Behandlung von Sojabohnen-, Karotten- und Petersiliezellen mit den Ca^{2+} -Ionophoren Amphotericin B und A23187 zur Akkumulation von Phytoalexinen (Kurosaki *et al.*, 1987; Stüb und Ebel, 1987; Jabs *et al.*, 1997) sowie zur Induktion abwehrassoziierter Gene in Tabak und Weizen (Suzuki *et al.*, 1995; Takezawa, 1999). Die Stimulation der PR-

Gen-Expression in Tomate durch das Plasmamembran-ATPase-aktivierende Pilztoxin Fusicoccin lässt vermuten, dass selbst Veränderungen des Membranpotentials pflanzliche Abwehrreaktionen hervorrufen könnten (Roberts und Bowles, 1999; Schaller und Oecking, 1999). Ob wirklich ein direkter Zusammenhang zwischen einer abwehrstimulierenden Wirkung des Toxins und der Aktivierung der Plasmamembran-ATPase besteht ist allerdings nicht bekannt. Bei Stress und Verwundung wird außerdem ATP freigesetzt. Wie bei Tieren aktiviert dieses extrazelluläre ATP MAP-Kinasen sowie die Synthese von Ethylen, reaktiven Sauerstoffspezies und NO (Jeter *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2006; Foresi *et al.*, 2007). Kürzlich wurde auch die Identifizierung eines endogenen Signalmoleküls peptidischer Natur in *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Hierbei handelt es sich um Pep1, ein 23-Aminosäuren-langes Peptid, welches über eine LRR-Kinase pflanzliche Abwehrgene induziert (Huffaker *et al.*, 2006; Yamaguchi *et al.*, 2006). Die Generierung von Pep1 aus PROPEP1 erfolgt jedoch erst nach dem PAMP-induzierten Jasmonat- und Ethylenanstieg, so dass diese endogenen Abwehrsignale wohl eher zur Verstärkung als zur Initiierung von Immunreaktionen dienen (Huffaker und Ryan, 2007).

NLPs beeinflussen die Integrität von Plasmamembranen dikotyley Pflanzen. Dies wird durch Elektrolytverlust aus NLP-behandelten Tabakblättern sowie durch die Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein aus Plasmamembranvesikeln deutlich (vgl. 3.2.3 und 3.3.5). In Protoplasten aus *A. thaliana* wurde zudem die Lyse nach NLP-Gabe beobachtet (siehe 3.2.2). Dies liefert die Grundlage für eine Freisetzung endogener Gefahrensignale. Im Falle einer NLP-vermittelten Porenbildung wäre z. B. die Wahrnehmung von Ionenströmen und Veränderungen des Membranpotentials denkbar. Abhängig von der Porengröße könnte außerdem der Durchtritt größerer Moleküle erfolgen. In der Tat wurde das Auslösen von Ionenströmen durch NLPs bereits gezeigt. So wird in Tabakzellkultur durch NEP1 Kaliumausstrom bewirkt, (Jennings *et al.*, 2001) während in Petersilieprotoplasten nach Zugabe von NLP_{pp} die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ansteigt (Fellbrich *et al.*, 2002).

Neben der Freisetzung von Signalen aus dem Zytosol durch Störungen der Membranintegrität sind schon seit längerem endogene Abbauprodukte pflanzlicher Substanzen als Auslöser von Abwehrreaktionen bekannt. Beispielsweise wirken Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand wie Oligogalakturonide und Zello-

dextrine abwehrstimulierend. Solche Substanzen entstehen z. B. durch die Aktivität hydrolytischer Enzyme, die von phytopathogenen Pilzen freigesetzt werden (Reymond *et al.*, 1995; Moscatiello *et al.*, 2006; Aziz *et al.*, 2007; Osorio *et al.*, 2008). Ob auch durch die NLP-Wirkung Abbauprodukte als endogene Schadenssignale entstehen, ist bisher unklar. Dies wäre beispielsweise durch enzymatische Aktivität der NLPs oder durch die Freisetzung von Membranbruchstücken im Falle einer porenbildenden oder detergenzähnlichen Wirkung der NLPs möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass toxinvermittelte Immunität offensichtlich auch in Pflanzen vorkommt und im Fall von NLPs das direkte Resultat der Toxinwirkung ist. Somit würde eine weitere Parallele in der Organisation der angeborenen Immunität in Pflanzen und Tieren existieren. Ob die Perception von NLPs wirklich aufgrund der Freisetzung von DAMPs erfolgt (Erkennung von „microbe-induced modified self“) ist aber offen. Aussagen diesbezüglich setzen die Aufklärung des exakten Wirkmechanismus der NLPs sowie die Identifizierung der möglicherweise durch NLPs generierten DAMPs voraus. Nur so kann eine Bindung von NLPs an PRRs (Erkennung von „microbe-derived non-self“) endgültig ausgeschlossen werden. Da die NLP-vermittelte Induktion von Abwehrgenen mit einer membrandestabilisierenden Wirkung der Toxine korreliert, ist die Freisetzung von DAMPs sowie eine ionophore Wirkung und Störung des Membranpotentials als mögliche Signale der Zellschädigung denkbar. Deshalb ist eine indirekte Perception der Toxinaktivität, also von „microbe-induced modified self“, sehr wahrscheinlich. Das momentan in PAMP- und effektorvermittelte Immunität unterteilte Modell der pflanzlichen Immunität müsste also um eine weitere Komponente erweitert werden, die DAMP-vermittelte bzw. toxinvermittelte Immunität.

4.2 Molekularer Mechanismus der Toxinwirkung von NLPs

4.2.1 Strukturelle Ähnlichkeit von NLPs zu anderen Proteinen

Strukturelle Ähnlichkeiten zu Lektinen und porenbildenden Toxinen stellen ein weiteres unterstützendes Argument für Toxineigenschaften der NLPs dar (vgl. 4.1.2). Datenbanksuchen mit dem DALI Programm (Holm und Sander, 1996) (<http://www.ebi.ac.uk/dali/>) ergaben, dass die höchste strukturelle Ähnlichkeit zu NLP_{PyA} bei den Fruchtkörperlektinen XCL und ABL aus den Pilzen *Xerocomus*

chrysesteron und *Agaricus bisporus* (Birck *et al.*, 2004; Carrizo *et al.*, 2005) sowie bei den Aktinoporinen Equinatoxin II und Sticholysin II aus den Seeanemonen *Actinia equina* und *Stichodactyla helianthus* auftritt (Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002; Mancheno *et al.*, 2003) (Luberacki, 2006; Prof. Dr. Claudia Oecking, persönliche Mitteilung). Diese Proteine enthalten wie NLPs ein zentrales β -Sandwich, das von Helices umgeben wird, und weisen drei große Loopstrukturen an einer Seite des Proteins auf (Abb. 4-1). Sowohl Lektine als auch Aktinoporene besitzen eine Grube, die zusammen mit exponierten aromatischen Aminosäuren an den großen Loops für eine spezifische Bindung an bestimmte Moleküle in der biologischen Zielmembran nötig ist (Athanasiadis *et al.*, 2001; Mancheno *et al.*, 2003; Birck *et al.*, 2004; Bakrač *et al.*, 2008).

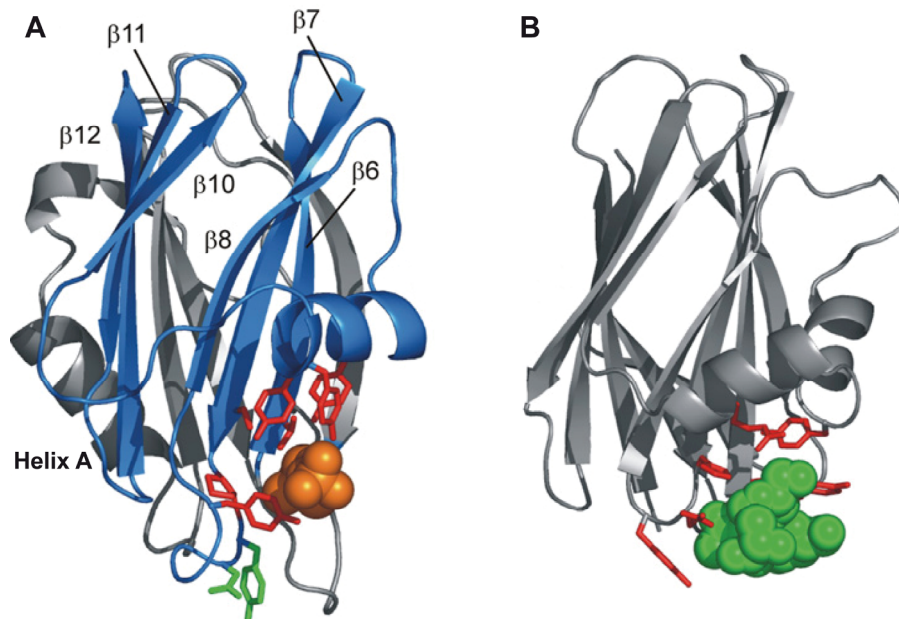


Abb. 4-1: Tertiärstruktur von Equinatoxin II und ABL.

Beide Proteine bestehen aus einem zentralen β -Sandwich, flankiert von α -Helices. Die für die Porenbildung von Equinatoxin II (A) wichtige N-terminale Helix A fehlt bei ABL (B). In orange und grün sind die Bindungspartner in der Phosphocholin- bzw. Thomsen-Friedenreich-Antigen-Bindestelle symbolisiert. Aus Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2006.

Lektine binden an Kohlenhydrate und sind an der Kommunikation und Interaktion von Zellen und Organismen beteiligt. XCL und ABL binden spezifisch an N-Acetyl-Galaktosamin und Galaktose, ABL darüber hinaus an das Thomsen-Friedenreich Antigen (Gal β 1-3-N-Acetyl-D-Galaktosamin), ein Disaccharid, das gehäuft in Glykoproteinen und an der Zelloberfläche von menschlichen Karzinomen auftritt. Für

beide Lektine konnten antiproliferative Eigenschaften nachgewiesen werden (Yu *et al.*, 1993; Marty-Detraves *et al.*, 2004).

Im Gegensatz zu Lektinen sind Aktinoporine porenbildende Toxine. Die Porenbildung wird durch eine N-terminale Helix vermittelt, die den Lektinen fehlt. Nach spezifischer Bindung an sphingomyelinhaltige Membranen (Anderluh *et al.*, 1999; Bonev *et al.*, 2003; Bakrač *et al.*, 2008) transferieren Aktinoporine ihre N-terminale Helix in die Membran und tetramerisieren (Malovrh *et al.*, 2003; Mancheno *et al.*, 2003; Gutierrez-Aguirre *et al.*, 2004). Die Pore wird aus vier Helices gebildet, vermutlich unter zusätzlicher Beteiligung von Lipiden (Valcarcel *et al.*, 2001; Anderluh *et al.*, 2003). Seeanemonen lysieren auf diese Weise die Zellen ihrer Feinde oder ihrer Beute (Maček, 1992; Anderluh und Macek, 2003). Die Membranen von Seeanemonen selbst enthalten ein Phosphonoanalog von Sphingomyelin, so dass ihre eigene Membran nicht als Ziel für die Toxine dient (Senčič und Maček, 1990; Meinardi *et al.*, 1995).

Beim Vergleich der NLP-Struktur mit der Struktur von Lektinen und Aktinoporinen fällt auf, dass auch in NLPs ein charakteristisches β -Sandwich und eine zur Oberfläche gerichtete Grube existieren. Weiterhin besitzen NLPs eine N-terminale α -Helix wie sie in Aktinoporinen zur Porenbildung verwendet wird. Da NLPs zudem zytolytische Wirkung zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass diese Region auch in NLPs essentiell für die Aktivität ist. Für NLP_{Pp} wurden bereits Deletionsmutanten im Bereich der N-terminalen Helix untersucht (Fellbrich *et al.*, 2002). Diese zeigen weder zelltodauslösende noch abwehrstimulierende Aktivität, was die funktionelle Relevanz der Helix verdeutlicht. Zusammengefasst kann man vermuten, dass die Toxinaktivität der NLPs durch eine Porenbildung und nachfolgende Zytolyse unter Beteiligung der N-terminalen Helix zustande kommt.

4.2.2 Wirkort und molekularer Mechanismus der Toxinwirkung von NLPs

Seeanemonen bilden mit Hilfe der NLP-ähnlichen Aktinoporine Poren in sphingomyelinhaltigen Membranen ihrer Zielorganismen. Um zu untersuchen, ob auch NLPs Wechselwirkungen mit Membranen eingehen, wurde der Wirkort von NLPs auf subzellulärer Ebene lokalisiert. Hierfür wurde zunächst die Vitalität pflanzlicher Zellen nach Kotransformation eines GUS- und NLP_{P_s}-Konstrukts in *A. thaliana* analysiert. NLP_{P_s} vermittelt nur dann Zelltod, wenn ein Signalpeptid zur Sekretion

vorgeschaltet ist, also wenn das Protein von der extrazellulären Seite angreifen kann (siehe 3.2.2; Qutob *et al.*, 2006). Bei intrazellulärer Expression hingegen sind die transformierten Zellen vital. Um zu untersuchen, ob die Zellwand bei dieser extrazellulären Aktivität von NLPs eine Rolle spielt, wurde die Auswirkung von NLPs auf Protoplasten getestet. Bei Protoplasten aus dikotylen Pflanzen führt die Zugabe von NLP_{Pp} zum Zelltod (siehe 3.2.2; Qutob *et al.*, 2006). Die Zellwand wird für die nekrotisierende Wirkung der NLPs also nicht benötigt. Dies zeigt, dass für den NLP-vermittelten Zelltod eine Interaktion mit der äußeren Seite der pflanzlichen Plasmamembran Voraussetzung ist. Einige Toxine werden bei Kontakt mit der Membran prozessiert, worauf ein Teil des Proteins internalisiert wird. Das Toxin ToxA aus dem phytopathogenen Pilz *Pyrenophora tritici-repentis* beispielsweise löst nach der Internalisierung in Mesophyllzellen von Weizen Nekrosen aus (Manning und Ciuffetti, 2005). Bei NLPs scheint jedoch keine Internalisierung aufzutreten. Subzelluläre Lokalisationsstudien mit markiertem Protein zeigten, dass sich NLP_{Pp} ausschließlich an die Plasmamembran anlagert (siehe 3.2.2). Darüber hinaus folgt dieser Anlagerung die Zerstörung der Membran, jedoch keine in diesem experimentellen System nachweisbare Internalisierung des Proteins. Den endgültigen Beweis, dass die Plasmamembran dikotyler Pflanzen die biologische Zielstruktur von NLPs darstellt, lieferten Experimente mit hochreinen Plasmamembranvesikeln aus *Nicotiana tabacum* und *Commelina communis*. Auch hier führt NLP-Behandlung zum Integritätsverlust der Tabakmembranen, erkennbar durch die Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffes (siehe 3.2.3). Daraus ist zu schließen, dass keine zytosolischen oder anderen pflanzlichen Komponenten für die zytolytische Aktivität des Proteins nötig sind. Außerdem tritt eine strikte Korrelation zwischen der Permeabilität der Plasmamembranen und der Auslösung von Nekrosen auf. Nur NLP-Mutanten, welche Farbstofffreisetzung verursachen, sind fähig Zelltod zu vermitteln (vgl. 3.3.4 und 3.3.8). Weiterhin tritt eine solche Permeabilisierung nur in Membranen aus dikotylen Pflanzen auf. Es erfolgt weder eine Beeinträchtigung von Membranen aus Monokotyledonen oder Tieren noch von artifiziellen Membranen (Kapitel 3.2.3; Qutob *et al.*, 2006). Der NLP-vermittelte Zelltod wird demnach mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Zerstörung der Plasmamembran vermittelt. Das heißt, der Beitrag von NLPs zur nekrotrophen bzw. hemibiotrophen Lebensweise besteht in der Zytolyse der Wirtszellen durch Permeabilisierung der Plasmamembran.

Eine Beeinflussung der Membranintegrität durch mikrobielle zytolytische Toxine wird in der Regel durch Porenbildung oder eine detergentenähnliche Wirkung erreicht. Seltener ist ein enzymatischer Mechanismus zu beobachten, wie z. B. beim α -Toxin aus *Clostridium perfringens*. Hierbei handelt es sich um eine Phospholipase C mit hämolysierender Wirkung (Macfarlane und Knight, 1941; Titball *et al.*, 1993). Dieses Protein besteht im Gegensatz zu NLPs aus mehreren funktionellen Domänen (Naylor *et al.*, 1998). Dabei dient eine Domäne zur Bindung des Toxins an die biologische Zielmembran und eine andere weist katalytische Aktivität auf. Ein Verlust des zytolytischen Effekts nach Veränderung der Tertiärstruktur, z. B. durch Hitzeeinwirkung, ist eine Eigenschaft, die für Enzyme typisch ist. Obwohl die Aktivität einiger NLPs durch Erhitzen auf über 65 °C deutlich reduziert wird (Fellbrich *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2007), kann daraus nicht zwangsläufig geschlossen werden, dass NLPs Enzymaktivität aufweisen. Der Verlust der Tertiärstruktur durch Erhitzen könnte auch lediglich den Verlust der Bindungsspezifität an Interaktionsmoleküle bedeuten.

Eine Tertiärstruktur, die wie bei NLPs aus nur einer funktionellen Domäne besteht (Luberacki, 2007) ist unter porenbildenden Toxinen eher verbreitet. Dies ist z. B. bei den Cyt-Toxinen aus *Bacillus thuringiensis* (Li *et al.*, 1996) oder auch bei Aktinoporinen der Fall (Athanasiadis *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2002; Mancheno *et al.*, 2003). NLPs zeigen strukturelle Ähnlichkeiten zu Aktinoporinen, insbesondere besitzen sie auch eine N-terminale Helix, welche bei Aktinoporinen die Pore formt. Daher ist ein porenbildender Mechanismus als Basis für die Toxizität von NLPs wahrscheinlich.

Eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer Pore durch zytolytische Toxine ist die Oligomerisierung mehrerer Untereinheiten, solange nicht das Protein selbst einen Kanal darstellt (Parker und Feil, 2005). In der Regel setzen sich Poren aus bis zu 10 Monomeren zusammen. Beispielsweise werden Poren im Falle der Aktinoporine aus vier Monomeren gebildet (Mancheno *et al.*, 2003) und im Falle des Aerolysins aus sieben (Wilmsen *et al.*, 1992). Ausnahmen bilden cholesterolabhängige Porenbildner, deren riesige Poren aus bis zu 50 Untereinheiten aufgebaut sein können (Parker und Feil, 2005; Tweten, 2005). Oligomere Zustände konnten auch für NLPs in Lösung bereits beobachtet werden. So wurde NLP_{Py_a} aus dem Kulturüberstand von *Pythium aphanidermatum* per Gelfiltration bei einer Größe von 100 kDa eluiert, was der Größe eines Homotetramers ent-

spricht (Koch *et al.*, 1998). Außerdem wurde für NLP_{Pp} und NLP_{Mp}1 (NEP1 aus *Moniliophthora perniciosa*) in einer nichtdenaturierenden Gelelektrophorese eine Bande beobachtet, die einem Homodimer entsprechen könnte (Garcia *et al.*, 2007). Daten über Aggregationszustände in Anwesenheit von Membranen existieren jedoch bislang nicht.

Alternativ zur Porenbildung kann eine Desintegration von Membranen auch durch Moleküle mit detergenzähnlichen Eigenschaften ausgelöst werden. Hierbei tritt anstatt einer definierten Oligomerisierung die Aggregation einer variablen, größeren Anzahl von Monomeren auf. Im Gegensatz zum Porenmodell inseriert das Toxin dabei nicht in die Membran, sondern bildet mit den Lipiden Protein-Lipid-Komplexe. Durch ein Aufbrechen dieser Komplexe kommt es zu Defekten in der Lipidorganisation und zur Freisetzung intrazellulärer Moleküle. Mikrobielle Toxine, welche vermutlich durch diesen Mechanismus wirken, sind die zytolytischen Cyt-Toxine aus *Bacillus thuringiensis*. So wurden für Cyt1A in Anwesenheit von Lipiden Proteinaggregate mit verschiedenen Molekulargewichten nachgewiesen. Die Anzahl der Monomere ist hierbei weitaus größer als es bei einer Porenbildung normalerweise der Fall ist (Manceva *et al.*, 2005). Behandlung von Lipidvesikeln mit Cyt1A führt dem Detergenzmodell entsprechend zu einem Aufbrechen in kleinere Lipidkörper. Eine Zerkleinerung von Membrankörpern wurde auch nach elektronenmikroskopischer Untersuchung NLP_{Pp}-behandelter Plasmamembranen aus Tabak beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Unterscheidung zwischen einem Porenbildner und einem Detergenz ist nicht trivial und kann auch von der Toxin-konzentration abhängen. Möglicherweise kommt es auch bei Porenbildnern im Falle eines hohen Toxin-Lipid-Verhältnisses zu einem Aufbrechen der Membran und damit zu einer detergenzähnlichen Lyse. Studien zur Klärung des Oligomerisierungszustandes in Anwesenheit von Membranen sowie Insertionsanalysen von NLPs in Einzellipidschichten würden helfen, bessere Aussagen über den Mechanismus der NLP-vermittelten Zerstörung der Plasmamembran zu treffen.

4.2.3 NLP-Zielmoleküle sind nichtproteinöse Bestandteile der Plasmamembran

Einen erheblichen Beitrag zur Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus von NLPs und der Grundlagen der NLP-Sensitivität von Dikotyledonen könnte die Identifizierung von NLP-Zielmolekülen liefern. Zu diesem Zweck wurde im Rahmen dieser Arbeit nach NLP-insensitiven *Arabidopsis thaliana*-Mutanten gesucht. Unter ungefähr 1,8 Mio. M₂-Linien (50 000 M₁-Linien) befanden sich jedoch keine NLP-insensitiven Linien (siehe 3.2.1). Ein zweiter Screen wurde im Labor von Prof. Dr. Mark Gijzen (London, Ontario, Kanada) durchgeführt. EMS-mutagenisierte *Arabidopsis thaliana* wurden hierbei auf NLP-haltigem Medium kultiviert, was in einer verringerten Wachstumsrate resultierte. Auch in diesem Ansatz wurden aus 127 000 M₂-Linien (17 000 M₁-Linien) keine Pflanzen identifiziert, die in Gegenwart von NLP_{PS} normales Wachstum aufweisen (Prof. Dr. Mark Gijzen, persönliche Mitteilung). Es muss also davon ausgegangen werden, dass Pflanzen ohne funktionell aktives NLP-Zielmolekül letal sind oder dass mehrere Homologe dieses Zielmoleküls existieren und genetische Screens deshalb erfolglos sind. Zieht man die desintegrierende Aktivität von NLPs auf Plasmamembranen in Betracht, so ist zu vermuten, dass es sich bei dem Zielmolekül um einen essentiellen Membranbaustein handeln könnte und dessen Biosynthese ohne Vitalitätsverlust nicht vollständig auszuschalten ist.

Um zu untersuchen, ob an der Plasmamembran lokalisierte Proteine für die NLP-Wirkung eine wichtige Rolle spielen, wurde die Freisetzung von Calcein aus Plasmamembranvesikeln nach einem tryptischen Verdau analysiert. Die Aktivität von NLP_{Pp} blieb daraufhin unverändert (siehe 3.2.4). Dies führt zu dem Schluss, dass nichtproteinöse Membranmoleküle wie z. B. Lipide oder Glykolipide die Anfälligkeit für NLPs bestimmen könnten. Andere, unspezifische Proteasen sollten in Zukunft getestet werden, um diese Aussage zu verifizieren.

Interessanterweise interagieren zahlreiche porenbildende Toxine mit Lipiden, so z. B. cholesterolabhängige Toxine (Tweten, 2005) oder auch die zu NLPs strukturell ähnlichen Aktinoporine. Letztere binden spezifisch an die Phosphocholin-Gruppe von Sphingomyelin (Bakrač *et al.*, 2008). Diese Interaktion wird unter anderem durch eine spezifische, von aromatischen Aminosäuren geprägte Binde-tasche vermittelt (Mancheno *et al.*, 2003). In der dreidimensionalen Struktur von NLP_{PyA} befindet sich ebenfalls eine oberflächenexponierte Grube, die als Binde-

stelle für Zielmoleküle dienen könnte. Sie besitzt keine aromatischen Aminosäuren wie die Phosphocholinbindestelle der Aktinoporine, sondern ist stark negativ geladen und enthielt nach der Kristallisierung ein divalentes Kation (Luberacki, 2007; Prof. Dr. Claudia Oecking, persönliche Mitteilung).

Dass diese putative Bindestelle von essentieller Bedeutung für die Funktion von NLPs ist, zeigt die Tatsache, dass sie komplett aus hochkonservierten Aminosäuren gebildet wird. Diese finden sich in einer Vielzahl von NLPs, vor allem in den zytolytisch aktiven NLPs. All diese Aminosäuren wurden aufgrund der hohen Konservierung in dieser Arbeit zu Funktionsstudien nach gerichteter Mutagenese ausgewählt, so z. B. das Heptapeptid GHRHDWE₁₀₀₋₁₀₆. Allerdings führen Mutationen zu Alanin nur bei einigen dieser Aminosäuren zum kompletten Funktionsverlust des Proteins bezüglich Zytolyse, Auslösung von Nekrosen, Virulenz und Immunabwehr. Dabei handelt es sich interessanterweise genau um die für die Koordinierung des Kations wichtigen Aminosäuren D93, H101, D104 und E106. Experimente mit Chelatoren belegen zudem, dass dieses Kation wesentlich zur Aktivität der NLPs beiträgt. Die NLP-vermittelte Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln kann in Anwesenheit von EDTA, EGTA und BAPTA komplett unterbunden werden (siehe 3.3.9.1). Deshalb ist es wahrscheinlich, dass es bei der Kristallisation nicht nur den Platz eines natürlichen Liganden einnahm. Da EGTA eine hohe Affinität für Ca²⁺ zeigt und BAPTA als Ca²⁺-spezifischer Chelator gilt, handelt es sich bei dem in der Grube koordinierten Ion sehr wahrscheinlich um Ca²⁺. Die bei der Kristallisation festgestellte Koordinierung eines Mg²⁺-Ions war vermutlich eine Konsequenz aus der Verwendung eines Mg²⁺-reichen Kristallisationspuffers.

Die Interaktion in der Grube basiert auf elektrostatischer Anziehung, besonders vermittelt durch die saure Gruppe von D104, wie Experimente mit den Mutanten D104E, D104K und D104N zeigen. Wäre nicht die negative Ladung dieser Aminosäure wichtig, sondern nur eine bestimmte Größe der Seitenkette, so hätte auch Asparagin die Funktion des Aspartats übernehmen können. Jedoch ist nur Glutamat in der Lage, die Aufgabe des Aspartats 104 teilweise zu komplementieren (siehe 3.3.9.2). Außerdem scheint die Rolle des zweiwertigen Kations nicht durch die positive Ladung des Lysins ersetzt werden zu können.

Im Falle einer enzymatischen Aktivität der NLPs, welche trotz der Ähnlichkeit zu porenbildenden Toxinen nicht völlig ausgeschlossen werden kann, könnte das Kalzium eine Rolle bei einer katalytischen Funktion spielen. Dies ist beispielsweise

bei eukaryotischen Phospholipasen der Fall (Ellis *et al.*, 1998). Alternativ könnte das Kalzium an der Bindungsspezifität beteiligt sein und Wechselwirkungen mit negativ geladenen Membrankomponenten eingehen. Solche Bindemechanismen wurden bereits für einige Proteine beschrieben. Hierzu zählen unter anderem C2-Domänen, welche als Bindedomänen zahlreicher Enzyme mit Spezifität für Phosphatidylinositol oder dessen phosphorylierte Derivate dienen (Nalefski und Falke, 1996; Ponting und Parker, 1996). Auch beim α -Toxin aus *Clostridium perfringens*, einer Phosphatidylcholin-abhängigen Phospholipase C, wird eine Ca^{2+} -abhängige Bindung von einer C2-ähnlichen Domäne vermittelt (Guillouard *et al.*, 1997; Naylor *et al.*, 1998). Anders als C2-Domänen binden C-Typ-Lektine Ca^{2+} -abhängig an Kohlenhydrate (Drickamer, 1988). In dieser Familie existieren auch porenbildende Lektine wie das hämolytische CEL-III aus der Seegurke *Cucumaria echinata* (Hatakeyama *et al.*, 1995). Hier bildet das Ca^{2+} -Ion eine Brücke zu den OH-Gruppen von GalNAc-Resten an der Zelloberfläche (Uchida *et al.*, 2004; Hatakeyama *et al.*, 2007).

Dass die NLP_{pp}-Mutante D104 trotz ihrer Unfähigkeit Plasmamembranen zu permeabilisieren an die Plasmamembran von Protoplasten bindet (siehe 3.2.2), impliziert, dass D104 und damit auch das Ca^{2+} -Ion für die Membranbindung nicht essentiell sind. Allerdings existieren für viele membraninteragierende Proteine mehrphasige Bindungsmechanismen, wobei der spezifischen Bindung ein unspezifischer Initialkontakt vorausgeht oder nebeneinander unspezifische reversible und spezifische irreversible Bindungen auftreten (Rajamohan *et al.*, 1996; Hong *et al.*, 2002). Möglicherweise wird wie bei Aktinoporinen ein Initialkontakt mit der Membran durch hydrophobe Reste an den großen Loopstrukturen vermittelt. Sowohl Aktinoporine als auch NLPs enthalten beispielsweise ein exponiertes Tryptophan am Loop 3. Im Falle einer zweiphasigen Bindung könnte der Initialkontakt mit Membranen auch bei NLP-Proteinen mit defekter Kalziumkoordinierung erfolgen. Die Ca^{2+} -gefüllte Grube könnte dagegen speziell für die Bindung des Zielmoleküls wichtig sein. Dadurch wäre auch zu erklären, dass NLPs an artifiziale Membranen und Membranen aus Monokotyledonen binden, obwohl sie diese nicht permeabilisieren. In Bindungsstudien mit Silikakügelchen, die mit einer Phospholipiddoppelschicht aus Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin (POPC) und Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin (POPE) umhüllt waren, zeigte NLP_{pp} Affinität für diese Lipide, konnte aber farbstoffgefüllte Vesikel aus POPC und

Dipalmitoyl-Glycero-Phosphoglycerol (DPPG) nicht permeabilisieren (Qutob *et al.*, 2006). Ebenso zeigte NLP_{Py_a} sowohl Affinität für Plasmamembranen aus dikotylen Pflanzen als auch für Plasmamembranen der Monokotyledone *Commelina communis* (Luberacki, 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch keine Beeinflussung von calceingefüllten Plasmamembranvesikeln aus *C. communis* beobachtet werden (siehe 3.2.3).

Um genauere Hinweise auf die Art eines spezifischen NLP-Bindungspartners zu bekommen, wurden verschiedene Lipide auf die Fähigkeit überprüft, die NLP-vermittelte Zerstörung von calceingefüllten Plasmamembranvesikeln zu inhibieren. Dabei wurde eine leichte inhibitorische Wirkung durch Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin beobachtet sowie noch stärkere Effekte durch Phosphatidylinositolphosphate (PIPs) (siehe 3.2.4). PIPs mit ungesättigten Fettsäureresten waren hierbei am effektivsten (Tab. 3-1). Ob es sich dabei um natürliche Substrate handelt, ist jedoch offen. Erstens sind PIPs keine dikotyledonenspezifischen Membranbausteine und zweitens wurde bisher ausschließlich von einem Vorkommen auf der zytoplasmatischen Seite von Plasmamembranen berichtet (Drobak, 1993; Drobak *et al.*, 1999; Meijer und Munnik, 2003; Michell, 2008). Hier sind NLPs wiederum inaktiv wenn sie in lebenden Zellen exprimiert werden (siehe 3.2.2; Qutob *et al.*, 2006). Dies könnte jedoch auch durch verminderte Aktivität bei zytoplasmatischem pH-Wert begründet sein, denn Permeabilisierungsversuche mit Plasmamembranen zeigten eine verschwindend geringe NLP-Aktivität bei pH 7,0 und 7,5 (siehe 3.3.9.1), Werte die typisch für das Zytoplasma eukaryotischer Zellen sind. Als Zielmoleküle mit Phosphatidylinositolcharakter auf der äußeren Seite der Plasmamembran könnten lediglich Ceramid-Phosphorylinositole oder Glykosylphosphatidylinositol- (GPI)-verankerte Proteine dienen. Letztere können auch von bakteriellen Phospholipasen anstelle von PI und PIPs gebunden werden (Ikezawa, 1991). Es existieren außerdem Toxine, die abhängig von GPI-verankerten Proteinen wirken. Beispielsweise bindet das porenbildende Toxin Intermedilysin aus *Streptococcus intermedius* an das GPI-verankerte Protein CD59, was jedoch abhängig vom Protein und nicht vom GPI-Anker ist (Giddings *et al.*, 2004). Aerolysin aus *Aeromonas hydrophila* bindet hingegen an den Kohlenhydratteil von GPI-verankerten Proteinen (Abrami *et al.*, 1998; Abrami *et al.*, 2000). Weiterhin existieren bakterielle Phospholipasen wie die Phosphatidylinositol-abhängigen Phospholipasen C aus den Humanpathogenen *Bacillus cereus* und *Listeria monocyto-*

genes, welche Funktionen als Virulenzfaktoren besitzen und durch die Spaltung von GPI-verankerten Proteinen an der Lyse der Wirtszelle beteiligt sind (Camilli *et al.*, 1991; Stieger und Brodbeck, 1991; Smith *et al.*, 1995). Bemerkenswert ist, dass diese bakteriellen Phospholipasen im Gegensatz zu tierischen Phospholipasen nur aus einer Domäne bestehen (Heinz *et al.*, 1995; Moser *et al.*, 1997; Griffith und Ryan, 1999). Diese unter enzymatischen Proteinen unübliche strukturelle Organisation macht deutlich, dass eine solche enzymatische Aktivität der NLPs theoretisch nicht ausgeschlossen werden kann, auch wenn die nichtenzymatische Porenbildung als Toxinmechanismus aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu Aktinoporinen favorisiert wird.

Alternativ zu PI und dessen Derivaten könnten *in vivo* durch NLPs auch andere Membranbausteine gebunden werden, die vergleichbare oder sogar noch höhere Affinität zur Bindestelle haben. Unter der Annahme, dass das in der Grube koordinierte Ca^{2+} -Ion für die Bindung verantwortlich ist, kämen dafür in Anlehnung an die C-Typ-Lektine Lipide mit Kohlenhydratmodifikation in Frage. Hier existiert eine breite Vielfalt von Glykosphingolipiden bis Glykosyldiacylglycerol (zur Übersicht siehe <http://www.lipidlibrary.co.uk>). Die Beteiligung von Glykolipiden am Aufbau pflanzlicher Membranen ist nicht bis ins Detail bekannt. Aufgrund ihrer hohen Wasserlöslichkeit gehen sie bei konventionellen Extraktionsmethoden größtenteils verloren und wurden so in vergangenen Studien oft ignoriert. Lipide mit Kohlenhydratstruktur, welche bezüglich Inhibierung der NLP-vermittelten Calceinfreisetzung getestet wurden, waren nur N-Acetyl-Glukosamin und N-Acetyl-Galaktosamin. Diese zeigten keinen Effekt. Das Testen anderer Komponenten mit Kohlenhydratmodifikationen war aufgrund der hohen Diversität und der fehlenden kommerziellen Verfügbarkeit in diesem Rahmen nicht möglich.

Um solche pflanzlichen Strukturen zu identifizieren, könnten massenspektrometrische Analysen aufschlussreich sein, z. B. nach „Crosslinken“ von NLPs mit interagierenden Molekülen aus der Plasmamembran. Ebenfalls könnte eine Fraktionierung der Plasmamembran durchgeführt werden, um den Pool möglicher Rezeptormoleküle einzuschränken. Diese Fraktionen könnten im Hinblick auf die Fähigkeit analysiert werden, Calceinfreisetzung aus Plasmamembranvesikeln zu inhibieren beziehungsweise nach Rekonstitution in Plasmamembranen von Monokotyledonen Calceinfreisetzung zu ermöglichen. Nach einer Identifizierung von putativen Rezeptoren wären Bindungsstudien nötig. Für den Fall, dass NLPs

enzymatische Eigenschaften wie Phospholipaseaktivität besitzen, sollten diese Bindungsstudien auch mit inaktiven Mutanten durchgeführt werden.

4.2.4 Mögliche Ursachen für die NLP-Spezifität für Dikotyledonen

Die fehlende Anfälligkeit gegenüber NLPs in anderen Organismen als dikotylen Pflanzen könnte in der funktionellen Inaktivierung von NLPs, dem Vorkommen von kompetitiven Antagonisten oder dem Fehlen der biologischen Zielmoleküle begründet sein. Letzteres ist typisch für die Spezifität von Toxinen. Beispielsweise sind Seeanemonen gegenüber ihren eigenen Aktinoporinen insensitiv, da ihre Membranen anstelle von Sphingomyelin Phosphosphingolipide, also Sphingomyelin mit modifizierter Phosphocholingrouppe, enthalten (Meinardi *et al.*, 1995). Weiterhin binden die Cry-Toxine aus *Bacillus thuringiensis* (Bt-Toxine) an ein bestimmtes Glykosylierungsmuster von Glykosphingolipiden, das Tetrasaccharid GalNAc β 1-4GlcNAc β 1-3Man β 1-4Glc (Griffitts *et al.*, 2001; Griffitts *et al.*, 2003; Griffitts *et al.*, 2005). Diese Modifikation tritt ausschließlich an der Zelloberfläche von Invertebraten auf und begründet die Sensitivität von Insekten für Bt-Toxine. Da in Wirbeltieren diese Modifikation der Glykosphingolipide nicht vorkommt, ist die biotechnologische Anwendung der Bt-Toxine als Insektizid möglich (Betz *et al.*, 2000; de Maagd *et al.*, 2001).

Solche spezifischen Muster sind auch für Pflanzen denkbar. Einen Einblick in die riesige Vielfalt an Glykosylierungsmustern von Sphingolipiden gibt die Arbeit von Markham *et al.* (Markham *et al.*, 2006). In *Arabidopsis thaliana* bilden Glykosphingolipide mit dem Strukturgerüst Hexose-Hexuron-Inositolphosphoceramid die Hauptklasse der Sphingolipide. Dabei können hochvariable, speziesspezifische Modifikationen an den Glykosylresten auftreten. Beispielsweise fehlt in *Arabidopsis thaliana* eine N-Acetylierung an der terminalen Hexose im Vergleich zu Tomate und Sojabohne. Die Glykosylreste von Monokotyledonen im Vergleich zu Dikotyledonen wurden bisher nicht erforscht. Da alle bislang untersuchten dikotylen Pflanzen NLP-sensitiv sind (Bailey, 1995), können speziesspezifische Modifikationen nicht die Ursache für die NLP-Sensitivität sein. Ein genereller Unterschied solcher Strukturen von Monokotyledonen und Dikotyledonen ist aber nicht auszuschließen.

In Tieren sind Variationen auch bei GPI-verankerten Proteinen bekannt. So existieren GPI-Anker mit Palmitylsäure am 2'OH des *myo*-Inositols, welche zum Beispiel von Phosphatidylinositol-abhängigen Phospholipasen C nicht umgesetzt werden können (Guther *et al.*, 1994; Treumann *et al.*, 1995). Des Weiteren tritt eine hohe Variabilität in der Modifizierung des Glykankerns mit Seitenketten wie Phosphoethanolamin oder Zuckermolekülen auf (Paulick und Bertozzi, 2008). Eine solche Modifikation in Form eines β -N-Acetylglukosamin-Restes ist auch für die Bindung des porenbildenden Toxins Aerolysin nötig (Fukushima *et al.*, 2003). Ob und welche Unterschiede in der Struktur von GPI-Ankern zwischen Dikotyledonen und Monokotyledonen bestehen ist noch nicht bekannt. In Tieren und Hefen sind Defekte in der Biosynthese von GPI-Ankern letal (Leidich *et al.*, 1994; Kawagoe *et al.*, 1996) und auch in Pflanzen gibt es hierfür Hinweise (Gillmor *et al.*, 2005). Sollten GPI-Anker Zielmoleküle für NLPs darstellen, so könnte dies die fehlgeschlagene Identifizierung von NLP-insensitiven *Arabidopsis thaliana* in ungerichteten genetischen Screens erklären (vgl. 3.2.1).

4.3 Biologische Funktion von NLPs in biotrophen und Monokotyledonen befallenden Pathogenen

Die Zahl an NLPs und NLP-enhaltenden Organismen ist in den letzten Jahren ständig angestiegen. Dabei unterscheidet sich die Anzahl wahrscheinlicher NLP-Sequenzen zwischen Oomyzeten, Pilzen und Bakterien drastisch. Oomyzeten enthalten große NLP-Genfamilien, z. B. enthält das Genom von *Phytophthora sojae* 29 für NLPs kodierende Sequenzen und das von *Phytophthora ramorum* 40 (Tyler *et al.*, 2006). In Bakterien und Pilzen ist die Anzahl begrenzt auf bis zu vier für NLPs kodierende Sequenzen. So existiert nur ein NLP-kodierendes Gen in *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Mattinen *et al.*, 2004) und drei in *Moniliophthora perniciosa*, einem hemibiotrophen Basidiomyceten, welcher bei Kakao die Hexenbesenkrankheit auslöst (Garcia *et al.*, 2007). Welche Rolle die großen NLP-Familien in den *Phytophthora*-Spezies spielen bzw. ob alle Sequenzen für funktionelle Proteine kodieren ist unklar. Überprüft werden muss, ob diese Gene generell transkribiert werden und ob die Proteine ein funktionelles Signalpeptid zur Sekretion tragen. Darüber hinaus hilft die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung zur Relevanz hochkonservierter Aminosäuren für die Funktionalität

nekrotisierender NLPs, die zelltodauslösende Fähigkeit der bislang uncharakterisierten NLPs einzuschätzen.

Interessanterweise sind kodierende Sequenzen für NLPs auch in Monokotyledonen befallenden und in Dikotyledonen befallenden biotrophen Pathogenen zu finden. So existieren beispielsweise vier NLPs im Genom von *Magnaporthe grisea* (NLP_{Mg}1-4) (Dean *et al.*, 2005; Gijzen und Nürnberger, 2006) und eines in *Mycosphaerella graminicola* (NLP_{Myg}) (Dr. Jason Rudd, persönliche Mitteilung). Dies sind nekrotrophe bzw. hemibiotrophe Pathogene für Monokotyledonen. Sie besitzen alle in dieser Arbeit definierten Aminosäuren, die für die nekrotisierende Wirkung von NLPs wichtig sind. Über die nekrotisierende Aktivität der vier NLPs aus *Magnaporthe grisea* sind noch keine Daten bekannt. Für NLP_{Myg} konnte das Auslösen von Nekrosen zwar in Dikotyledonen, jedoch weder in dem *Mycosphaerella graminicola*-sensitiven *Triticum aestivum* cv. Riband noch in anderen Monokotyledonen festgestellt werden (eigene Daten, nicht gezeigt). So kann das Vorkommen von NLP_{Myg} und NLP_{Mg}1-4 nicht durch biologische Relevanz begründet werden. Analysen von Knockoutmutanten sind in Bearbeitung, um herauszufinden, ob für NLPs aus Monokotyledonen befallenden Pathogenen möglicherweise alternative biochemische Funktionen bestehen (Nick Talbot, Jason Rudd, persönliche Mitteilung). Da NLPs strukturelle Ähnlichkeiten zu Lektinen zeigen (siehe 4.2.1), wäre beispielsweise eine Funktion der NLPs als Lektine denkbar.

In dem auf *Arabidopsis* obligat biotrophen Oomyzeten *Hyaloperonospora arabidopsidis* (ehemals *Hyaloperonospora parasitica*) wurden 20 NLP-homologe Sequenzen gefunden, von denen nur fünf exprimiert werden (Guido van den Ackerveken, persönliche Mitteilung). Drei dieser NLPs (NLP_{Ha}1-3) wurden bislang heterolog exprimiert und bezüglich nekrotisierender Wirkung getestet. Keines der Proteine löste jedoch Nekrosen aus (eigene Daten, nicht gezeigt; Guido van den Ackerveken und Adriana Cabral, persönliche Mitteilung). Bei NLP_{Ha}1 lässt sich der Funktionalitätsverlust durch Änderungen der wichtigen Aminosäuren D93, G100, H101, und D104 erklären. Bei NLP_{Ha}2 und NLP_{Ha}3 sind dagegen alle in dieser Arbeit untersuchten, funktionell wichtigen Aminosäuren konserviert. NLP_{Ha}2 und NLP_{Ha}3 besitzen aber jeweils eine für funktionelle NLPs anormale Extension, für die inhibitorische Eigenschaften auf die Aktivität der Proteine vermutet wurden. NLP_{Ha}3 war jedoch auch nach Deletion dieser Q-reichen Extension inaktiv (eigene Daten, nicht gezeigt; Adriana Cabral, persönliche Mitteilung), für NLP_{Ha}2 steht die

Analyse noch aus. Somit können Aussagen über strukturelle Ursachen bezüglich der Inaktivität der NLPs aus *H. arabidopsidis* nur für NLP_{Ha1} getroffen werden, aber nicht für NLP_{Ha2} und NLP_{Ha3}.

Wichtig ist aber, dass keine nekrotisierende Wirkung dieser NLPs vorliegt. Denn diese ist zwar virulenzsteigernd für Pathogene mit nekrotropher Lebensweise, wäre aber nachteilig für einen biotrophen Organismus wie *H. arabidopsidis*. Wodurch die inaktiven NLPs ihre Funktion verloren haben oder ob sie durch strukturelle Änderungen gar andere Funktionen übernommen haben ist ein interessanter Ansatzpunkt für die zukünftige Forschung.

5 Zusammenfassung

NLPs können als generelle Virulenzfaktoren von Pilzen, Bakterien und Oomyzeten bezeichnet werden, da neben virulenzsteigernden Eigenschaften von NLPs aus Pilzen und Bakterien solche auch für NLPs aus Oomyzeten nachgewiesen werden konnten. Dies gelang durch Komplementation eines NLP-defizienten *Pectobacterium carotovorum*-Stammes mit NLPs aus Oomyzeten.

Die virulenzfördernde Eigenschaft von NLPs ist von der nekrotisierenden Aktivität der Proteine und damit von ihrer zytolytischen Aktivität abhängig, wie die Korrelation dieser Aktivitäten nach Analyse von NLP-Punktmutanten zeigt. NLP-induzierte Nekrosen sind daher sehr wahrscheinlich keine Abwehrreaktion, sondern ein durch NLPs verursachtes Krankheitssymptom. NLPs können deshalb als virulenzsteigernde, zytolytische Toxine bezeichnet werden, die den hemibiotrophen bzw. nekrotrophen Lebensstil unterstützen.

Die Induktion abwehrspezifischer Markergene ausschließlich durch zelltodvermittelnde NLP-Mutanten zeigt außerdem, dass die Toxinwirkung vermutlich die Grundlage für die Aktivierung pflanzlicher Immunreaktionen ist. Wie in Tieren scheint also auch in Pflanzen der Mechanismus der toxinvermittelten Immunität zu existieren, vermutlich durch die toxinbedingte Generierung von DAMPs.

Untersuchungen zum molekularen Mechanismus ergaben, dass NLPs die Integrität der Plasmamembran von Dikotyledonen nach Interaktion mit der äußeren Seite der Membran beeinflussen. Aufgrund der strukturellen Homologie zu Aktinoporinen wird vermutet, dass NLPs hier nach Kontakt mit spezifischen Strukturen Poren bilden und damit das Membranpotential oder die Stabilität der Plasmamembran stören. Biochemische Studien lieferten Hinweise, dass diese NLP-Zielmoleküle Lipidstrukturen sind.

Die funktionelle Charakterisierung hochkonservierter Aminosäuren im Vergleich mit der Kristallstruktur von NLP_{Py_a} ergab, dass für die Toxinaktivität der NLPs die in einer putativen Bindestelle befindlichen Aminosäuren D93, H101, D104 und E106 essentiell sind. Diese Aminosäuren sind an der Koordinierung eines divalenten Kations, vermutlich Ca²⁺, beteiligt. Dieses scheint demnach wichtig für die Aktivität von NLPs zu sein und könnte der spezifischen Bindung an NLP-Zielmoleküle dienen.

6 Summary

NLPs can be designated as general virulence factors since virulence promoting characteristics were demonstrated not only for fungal and bacterial NLPs but also for oomycete NLPs. This was achieved by complementation of a NLP-deficient *Pectobacterium carotovorum* strain with oomycete NLPs.

The virulence promoting property of NLPs is dependent on its necrotizing and cytolytic activity, shown by a correlation of these attributes after an analysis of mutated NLP versions. Hence, NLP-triggered necrosis is probably not a defense reaction, but a disease symptom. NLPs can be considered virulence-promoting cytolytic toxins supporting the hemibiotrophic or necrotrophic lifestyle of pathogens.

The induction of defense-related marker genes exclusively by cell death-inducing NLP mutants shows, that the toxin activity itself seems to cause the onset of plant immune responses. Thus, like in animals, a mechanism of toxin-induced immunity in plants can be assumed, probably by a toxin-mediated generation of DAMPs.

Research on the molecular mechanism of NLP action showed, that following a contact with the outer site of the plasma membrane of dicots, NLPs affect the membrane integrity. Due to structural homologies with actinoporins, a pore forming mechanism after contact with membrane-specific structures is hypothesized with a following disturbance of the membrane potential or the membrane stability. Biochemical studies pointed to lipid-like attributes of the target molecules.

The functional analysis of highly conserved amino acids compared to the crystal structure of NLP_{Py_a} emphasized the crucial functions of the amino acids D93, H101, D104 and E106, which are located in a putative binding pocket and are involved in the coordination of a bivalent cation, presumably calcium. A proper coordination of this cation seems to be important for the NLP activity and might provide the specificity for the NLP target.

7 Literatur

- Abrami, L., Fivaz, M., Glauser, P.E., Parton, R.G. and van der Goot, F.G.** (1998) A pore-forming toxin interacts with a GPI-anchored protein and causes vacuolation of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, **140**, 525-540.
- Abrami, L., Fivaz, M. and van der Goot, F.G.** (2000) Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. *Trends Microbiol*, **8**, 168-172.
- 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.
- Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B. and Martin, G.B.** (2003) Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *EMBO J*, **22**, 60-69.
- Abramovitch, R.B. and Martin, G.B.** (2004) Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 356-364.
- Aderem, A. and Hume, D.A.** (2000) How do you see CG? *Cell*, **103**, 993-996.
- Aderem, A. and Ulevitch, R.J.** (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, **406**, 782-787.
- Agrios, G.** (1997) Plant diseases caused by fungi. In *Plant Pathology*: 4th ed., San Diego, California: Academic Press, pp. 245–406.
- Akira, S.** (2006) TLR signaling. *Curr Top Microbiol Immunol*, **311**, 1-16.
- Akira, S. and Takeda, K.** (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, **4**, 499-511.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O.** (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, **124**, 783-801.
- Altenbach, D. and Robatzek, S.** (2007) Pattern recognition receptors: from the cell surface to intracellular dynamics. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 1031-1039.
- Amsellem, Z., Cohen, B.A. and Gressel, J.** (2002) Engineering hypervirulence in a mycoherbicidal fungus for efficient weed control. *Nat Biotechnol*, **20**, 1035-1039.
- Anderluh, G., Dalla Serra, M., Viero, G., Guella, G., Macek, P. and Menestrina, G.** (2003) Pore formation by equinatoxin II, a eukaryotic protein toxin, occurs by induction of nonlamellar lipid structures. *J Biol Chem*, **278**, 45216-45223.
- Anderluh, G., Krizaj, I., Strukelj, B., Gubensek, F., Macek, P. and Pungercar, J.** (1999) Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family. *Toxicon*, **37**, 1391-1401.
- Anderluh, G. and Macek, P.** (2003) Dissecting the actinoporin pore-forming mechanism. *Structure*, **11**, 1312-1313.

- Aoyama, T. and Chua, N.H.** (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J*, **11**, 605-612.
- Aroian, R. and van der Goot, F.G.** (2007) Pore-forming toxins and cellular non-immune defenses (CNIDs). *Curr Opin Microbiol*, **10**, 57-61.
- Asai, T., Stone, J.M., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., Sheen, J. and Ausubel, F.M.** (2000) Fumonisin B1-induced cell death in arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *Plant Cell*, **12**, 1823-1836.
- 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.
- Athanasiadis, A., Anderluh, G., Maček, P. and Turk, D.** (2001) Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*. *Structure*, **9**, 341-346.
- Ausubel, F.M.** (2005) Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*, **6**, 973-979.
- Axtell, M.J., Chisholm, S.T., Dahlbeck, D. and Staskawicz, B.J.** (2003) Genetic and molecular evidence that the *Pseudomonas syringae* type III effector protein AvrRpt2 is a cysteine protease. *Mol Microbiol*, **49**, 1537-1546.
- Axtell, M.J. and Staskawicz, B.J.** (2003) Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell*, **112**, 369-377.
- Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K. and Schulze-Lefert, P.** (2002) The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science*, **295**, 2073-2076.
- Aziz, A., Gauthier, A., Bezier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Heyraud, A. and Baillieul, F.** (2007) Elicitor and resistance-inducing activities of β -1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with β -1,3 glucans and α -1,4 oligogalacturonides. *J Exp Bot*, 1463-1472.
- Bae, H., Kim, M.S., Sicher, R.C., Bae, H.J. and Bailey, B.A.** (2006) Necrosis- and ethylene-inducing peptide from *Fusarium oxysporum* induces a complex cascade of transcripts associated with signal transduction and cell death in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **141**, 1056-1067.
- Bailey, B.** (1995) Purification of a protein from culture filtrates of *Fusarium oxysporum* that induces ethylene and necrosis in leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathol*, **85**, 1250-1255.
- Bakrač, B., Gutierrez-Aguirre, I., Podlesek, Z., Sonnen, A.F., Gilbert, R.J., Maček, P., Lakey, J.H. and Anderluh, G.** (2008) Molecular determinants of sphingomyelin specificity of a eukaryotic pore-forming toxin. *J Biol Chem*, **283**, 18665-18677.

- Ballance, G.M., Lamari, L. and Bernier, C.C.** (1989) Purification and characterization of a host-selective necrosis toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **35**, 203-213.
- Bender, C.L., Alarcon-Chaidez, F. and Gross, D.C.** (1999) *Pseudomonas syringae* phytotoxins: mode of action, regulation, and biosynthesis by peptide and polyketide synthetases. *Microbiol Mol Biol Rev*, **63**, 266-292.
- Betz, F.S., Hammond, B.G. and Fuchs, R.L.** (2000) Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests. *Regul Toxicol Pharmacol*, **32**, 156-173.
- Bhakdi, S., Muhly, M., Korom, S. and Hugo, F.** (1989) Release of interleukin-1 beta associated with potent cytotoxic action of staphylococcal alpha-toxin on human monocytes. *Infect Immun*, **57**, 3512-3519.
- Bianchi, M.E.** (2007) DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*, **81**, 1-5.
- Birch, P.R., Boevink, P.C., Gilroy, E.M., Hein, I., Pritchard, L. and Whisson, S.C.** (2008) Oomycete RXLR effectors: delivery, functional redundancy and durable disease resistance. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 373-379.
- Birck, C., Damian, L., Marty-Detraves, C., Lougarre, A., Schulze-Briese, C., Koehl, P., Fournier, D., Paquereau, L. and Samama, J.P.** (2004) A new lectin family with structure similarity to actinoporins revealed by the crystal structure of *Xerocomus chrysenteron* lectin XCL. *J Mol Biol*, **344**, 1409-1420.
- Bittel, P. and Robatzek, S.** (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Curr Opin Plant Biol*, **10**, 335-341.
- Block, A., Li, G., Fu, Z.Q. and Alfano, J.R.** (2008) Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 396-403.
- 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.
- Boller, T.** (1995) Chemoperception of Microbial Signals in Plant Cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 189-214.
- Bonev, B.B., Lam, Y.H., Anderluh, G., Watts, A., Norton, R.S. and Separovic, F.** (2003) Effects of the eukaryotic pore-forming cytolysin Equinatoxin II on lipid membranes and the role of sphingomyelin. *Biophys J*, **84**, 2382-2392.
- Borghesi, L. and Milcarek, C.** (2007) Innate versus Adaptive Immunity: A Paradigm Past Its Prime? *Cancer Res*, **67**, 3989-3993.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. and Lamb, C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21-30.

- Brisson, L.F., Tenhaken, R. and Lamb, C.** (1994) Function of Oxidative Cross-Linking of Cell Wall Structural Proteins in Plant Disease Resistance. *Plant Cell*, **6**, 1703-1712.
- Brooks, D.M., Bender, C.L. and Kunkel, B.N.** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol*, **6**, 629-639.
- 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.
- Camilli, A., Goldfine, H. and Portnoy, D.A.** (1991) *Listeria monocytogenes* mutants lacking phosphatidylinositol-specific phospholipase C are avirulent. *J Exp Med*, **173**, 751-754.
- Carrizo, M.E., Capaldi, S., Perduca, M., Irazoqui, F.J., Nores, G.A. and Monaco, H.L.** (2005) The antineoplastic lectin of the common edible mushroom (*Agaricus bisporus*) has two binding sites, each specific for a different configuration at a single epimeric hydroxyl. *J Biol Chem*, **280**, 10614-10623.
- 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*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2549-2554.
- 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., Felix, G. and Boller, T.** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, **448**, 497-500.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J.** (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, **124**, 803-814.
- Chisholm, S.T., Dahlbeck, D., Krishnamurthy, N., Day, B., Sjolander, K. and Staskawicz, B.J.** (2005) Molecular characterization of proteolytic cleavage sites of the *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 2087-2092.
- Cook, D.N., Pisetsky, D.S. and Schwartz, D.A.** (2004) Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, **5**, 975-979.
- Daly, J. and Deverall, B.J.** (1983) *Toxins and plant pathogenesis* / edited by J. M. Daly, B. J. Deverall: Sydney/Toronto : Academic Press.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826-833.

- de Maagd, R.A., Bravo, A. and Crickmore, N.** (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, **17**, 193-199.
- de Torres, M., Mansfield, J.W., Grabov, N., Brown, I.R., Ammouneh, H., Tsiamis, G., Forsyth, A., Robatzek, S., Grant, M. and Boch, J.** (2006) *Pseudomonas syringae* effector AvrPtoB suppresses basal defence in *Arabidopsis*. *Plant J*, **47**, 368-382.
- Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeier, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., Bohnert, H., Coughlan, S., Butler, J., Calvo, S., Ma, L.J., Nicol, R., Purcell, S., Nusbaum, C., Galagan, J.E. and Birren, B.W.** (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, **434**, 980-986.
- Dellagi, A., Brisset, M.N., Paulin, J.P. and Expert, D.** (1998) Dual role of desferrioxamine in *Erwinia amylovora* pathogenicity. *Mol Plant Microbe Interact*, **11**, 734-742.
- Dixon, R.A.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, **411**, 843-847.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 8888-8893.
- Donnelly, M.A. and Steiner, T.S.** (2002) Two nonadjacent regions in enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin are required for activation of toll-like receptor 5. *J Biol Chem*, **277**, 40456-40461.
- Dostert, C., Meylan, E. and Tschopp, J.** (2008a) Intracellular pattern-recognition receptors. *Adv Drug Deliv Rev*, **60**, 830-840.
- Dostert, C., Petrilli, V., Van Bruggen, R., Steele, C., Mossman, B.T. and Tschopp, J.** (2008b) Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science*, **320**, 674-677.
- 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.
- Drickamer, K.** (1988) Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *J Biol Chem*, **263**, 9557-9560.
- Drobak, B.K.** (1993) Plant Phosphoinositides and Intracellular Signaling. *Plant Physiol*, **102**, 705-709.
- Drobak, B.K., Dewey, R.E. and Boss, W.F.** (1999) Phosphoinositide kinases and the synthesis of polyphosphoinositides in higher plant cells. *Int Rev Cytol*, **189**, 95-130.

- Ellis, M.V., James, S.R., Perisic, O., Downes, C.P., Williams, R.L. and Katan, M.** (1998) Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of plcdelta1. *J Biol Chem*, **273**, 11650-11659.
- 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.
- Epple, P., Mack, A.A., Morris, V.R. and Dangl, J.L.** (2003) Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in Arabidopsis by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6831-6836.
- 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.
- Feys, B.J. and Parker, J.E.** (2000) Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends Genet*, **16**, 449-455.
- Foresi, N.P., Laxalt, A.M., Tonon, C.V., Casalongue, C.A. and Lamattina, L.** (2007) Extracellular ATP induces nitric oxide production in tomato cell suspensions. *Plant Physiol*, **145**, 589-592.
- Freche, B., Reig, N. and van der Goot, F.G.** (2007) The role of the inflammasome in cellular responses to toxins and bacterial effectors. *Semin Immunopathol*, **29**, 249-260.
- Fritz, J.H. and Girardin, S.E.** (2005) How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J Endotoxin Res*, **11**, 390-394.
- Fukushima, K., Ikehara, Y., Kanai, M., Kochibe, N., Kuroki, M. and Yamashita, K.** (2003) A beta-N-acetylglucosaminyl phosphate diester residue is attached to the glycosylphosphatidylinositol anchor of human placental alkaline phosphatase: a target of the channel-forming toxin aerolysin. *J Biol Chem*, **278**, 36296-36303.
- Furman-Matarasso, N., Cohen, E., Du, Q., Chejanovsky, N., Hanania, U. and Avni, A.** (1999) A point mutation in the ethylene-inducing xylanase elicitor inhibits the beta-1-4-endoxylanase activity but not the elicitation activity. *Plant Physiol*, **121**, 345-351.
- Gallucci, S. and Matzinger, P.** (2001) Danger signals: SOS to the immune system. *Curr Opin Immunol*, **13**, 114-119.

- Garcia, O., Macedo, J.A., Tiburcio, R., Zapparoli, G., Rincones, J., Bittencourt, L.M., Ceita, G.O., Micheli, F., Gesteira, A., Mariano, A.C., Schiavinato, M.A., Medrano, F.J., Meinhardt, L.W., Pereira, G.A. and Cascardo, J.C.** (2007) Characterization of necrosis and ethylene-inducing proteins (NEP) in the basidiomycete *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom in *Theobroma cacao*. *Mycol Res*, **111**, 443-455.
- Giddings, K.S., Zhao, J., Sims, P.J. and Tweten, R.K.** (2004) Human CD59 is a receptor for the cholesterol-dependent cytolysin intermedilysin. *Nat Struct Mol Biol*, **11**, 1173-1178.
- 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.
- Gillmor, C.S., Lukowitz, W., Brininstool, G., Sedbrook, J.C., Hamann, T., Poindexter, P. and Somerville, C.** (2005) Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins are required for cell wall synthesis and morphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **17**, 1128-1140.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J. and Philpott, D.J.** (2002) Intracellular vs extracellular recognition of pathogens--common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol*, **10**, 193-199.
- Glazebrook, J.** (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 205-227.
- 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.
- Govers, F. and Bouwmeester, K.** (2008) Effector Trafficking: RXLR-dEER as Extra Gear for Delivery into Plant Cells. *Plant Cell*, **20**, 1728-1730.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M. and Dangl, J.L.** (2006) Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol*, **60**, 425-449.
- Greenberg, J.T. and Yao, N.** (2004) The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol*, **6**, 201-211.
- Griffith, O.H. and Ryan, M.** (1999) Bacterial phosphatidylinositol-specific phospholipase C: structure, function, and interaction with lipids. *Biochim Biophys Acta*, **1441**, 237-254.
- Griffitts, J.S., Haslam, S.M., Yang, T., Garczynski, S.F., Mulloy, B., Morris, H., Cremer, P.S., Dell, A., Adang, M.J. and Aroian, R.V.** (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science*, **307**, 922-925.
- Griffitts, J.S., Huffman, D.L., Whitacre, J.L., Barrows, B.D., Marroquin, L.D., Muller, R., Brown, J.R., Hennet, T., Esko, J.D. and Aroian, R.V.** (2003) Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved

glycosylation pathway required for toxin-host interactions. *J Biol Chem*, **278**, 45594-45602.

Griffitts, J.S., Whitacre, J.L., Stevens, D.E. and Aroian, R.V. (2001) Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science*, **293**, 860-864.

Guillouard, I., Alzari, P.M., Saliou, B. and Cole, S.T. (1997) The carboxy-terminal C2-like domain of the alpha-toxin from *Clostridium perfringens* mediates calcium-dependent membrane recognition. *Mol Microbiol*, **26**, 867-876.

Gurcel, L., Abrami, L., Girardin, S., Tschopp, J. and van der Goot, F.G. (2006) Caspase-1 activation of lipid metabolic pathways in response to bacterial pore-forming toxins promotes cell survival. *Cell*, **126**, 1135-1145.

Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G. and Nürnberger, T. (2007) Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem*, **282**, 32338-32348.

Guther, M.L., de Almeida, M.L., Rosenberry, T.L. and Ferguson, M.A. (1994) The detection of phospholipase-resistant and -sensitive glycosylphosphatidylinositol membrane anchors by western blotting. *Anal Biochem*, **219**, 249-255.

Gutierrez-Aguirre, I., Barlič, A., Podlesek, Z., Maček, P., Anderluh, G. and Gonzalez-Manas, J.M. (2004) Membrane insertion of the N-terminal alpha-helix of equinatoxin II, a sea anemone cytolytic toxin. *Biochem J*, **384**, 421-428.

Halim, V.A., Hunger, A., Macioszek, V., Landgraf, P., Nürnberger, T., Scheel, D. and Rosahl, S. (2004) The oligopeptide elicitor Pep-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato. *Physiol Mol Plant Pathol*, **64**, 311-318.

Hatakeyama, T., Nagatomo, H. and Yamasaki, N. (1995) Interaction of the hemolytic lectin CEL-III from the marine invertebrate *Cucumaria echinata* with the erythrocyte membrane. *J Biol Chem*, **270**, 3560-3564.

Hatakeyama, T., Unno, H., Kouzuma, Y., Uchida, T., Eto, S., Hidemura, H., Kato, N., Yonekura, M. and Kusunoki, M. (2007) C-type lectin-like carbohydrate recognition of the hemolytic lectin CEL-III containing ricin-type -trefoil folds. *J Biol Chem*, **282**, 37826-37835.

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. (2000a) Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, **44**, 321-334.

Heath, M.C. (2000b) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 315-319.

- Heinz, D.W., Ryan, M., Bullock, T.L. and Griffith, O.H.** (1995) Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus* in complex with myo-inositol. *EMBO J*, **14**, 3855-3863.
- Hinds, M.G., Zhang, W., Anderluh, G., Hansen, P.E. and Norton, R.S.** (2002) Solution structure of the eukaryotic pore-forming cytotoxin equinatoxin II: implications for pore formation. *J Mol Biol*, **315**, 1219-1229.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. and Ezekowitz, R.A.** (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, **284**, 1313-1318.
- Holm, L. and Sander, C.** (1996) Mapping the protein universe. *Science*, **273**, 595-603.
- Holt, B.F., 3rd, Belkadir, Y. and Dangl, J.L.** (2005) Antagonistic control of disease resistance protein stability in the plant immune system. *Science*, **309**, 929-932.
- Hong, Q., Gutierrez-Aguirre, I., Barlic, A., Malovrh, P., Kristan, K., Podlesek, Z., Macek, P., Turk, D., Gonzalez-Manas, J.M., Lakey, J.H. and Anderluh, G.** (2002) Two-step membrane binding by Equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone, involves an exposed aromatic cluster and a flexible helix. *J Biol Chem*, **277**, 41916-41924.
- Huffaker, A., Pearce, G. and Ryan, C.A.** (2006) An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10098-10103.
- Huffaker, A. and Ryan, C.A.** (2007) Endogenous peptide defense signals in *Arabidopsis* differentially amplify signaling for the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10732-10736.
- Ikezawa, H.** (1991) Bacterial PIPLCs-unique properties and usefulness in studies on GPI anchors. *Cell Biol Int Rep*, **15**, 1115-1131.
- Inohara, N., Chamillard, M., McDonald, C. and Nunez, G.** (2005) NOD-LRR PROTEINS: Role in Host-Microbial Interactions and Inflammatory Disease. *Annu Rev Biochem*, **74**, 355-383.
- Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K. and Scheel, D.** (1997) Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 4800-4805.
- Janeway, C.A., Jr.** (1989) Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **54 Pt 1**, 1-13.
- Janeway, C.A., Jr.** (1992) The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, **13**, 11-16.
- 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.
- Jennings, J.C., Apel-Birkhold, P.C., Mock, N.M., Baker, C.J., Anderson, J.D. and Bailey, B.A.** (2001) Induction of defense responses in tobacco by the protein Nep1 from *Fusarium oxysporum*. *Plant Sci*, **161**, 891-899.
- Jeter, C.R., Tang, W., Henaff, E., Butterfield, T. and Roux, S.J.** (2004) Evidence of a novel cell signaling role for extracellular adenosine triphosphates and diphosphates in Arabidopsis. *Plant Cell*, **16**, 2652-2664.
- Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M. and Larsson, C.** (1995) Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J*, **7**, 165-173.
- Jonak, C., Okresz, L., Bogre, L. and Hirt, H.** (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 415-424.
- Jones, J.D. and Dangl, J.L.** (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N.** (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **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.
- Kanneganti, T.D., Lamkanfi, M. and Nunez, G.** (2007) Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. *Immunity*, **27**, 549-559.
- Karin, M.** (2006) NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog*, **45**, 355-361.
- Katsir, L., Schillmiller, A.L., Staswick, P.E., He, S.Y. and Howe, G.A.** (2008) COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 7100-7105.
- Kawagoe, K., Kitamura, D., Okabe, M., Taniuchi, I., Ikawa, M., Watanabe, T., Kinoshita, T. and Takeda, J.** (1996) Glycosylphosphatidylinositol-anchor-deficient mice: implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*, **87**, 3600-3606.
- 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.

- Kim, H.S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J. and Dangl, J.L.** (2005) The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 6496-6501.
- Kimura, M., Anzai, H. and Yamaguchi, I.** (2001) Microbial toxins in plant-pathogen interactions: Biosynthesis, resistance mechanisms, and significance. *J Gen Appl Microbiol*, **47**, 149-160.
- Koch, W., Wagner, C. and Seitz, H.U.** (1998) Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. *Planta*, **206**, 523-532.
- Kono, H. and Rock, K.L.** (2008) How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol*, **8**, 279-289.
- Kunkel, B.N. and Brooks, D.M.** (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 325-331.
- 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.
- Kurosaki, F., Tsurusawa, Y. and Nishi, A.** (1987) Breakdown of Phosphatidylinositol during the Elicitation of Phytoalexin Production in Cultured Carrot Cells. *Plant Physiol*, **85**, 601-604.
- Lamb, C. and Dixon, R.A.** (1997) The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 251-275.
- Larsson, C., Widell, S., Kjellbom, P., Lester, P. and Roland, D.** (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. In *Methods in Enzymology*: Academic Press, pp. 558-568.
- Leidich, S.D., Drapp, D.A. and Orlean, P.** (1994) A conditionally lethal yeast mutant blocked at the first step in glycosyl phosphatidylinositol anchor synthesis. *J Biol Chem*, **269**, 10193-10196.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A.** (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, **86**, 973-983.
- Li, J., Koni, P.A. and Ellar, D.J.** (1996) Structure of the mosquitocidal delta-endotoxin CytB from *Bacillus thuringiensis* sp. *kyushuensis* and implications for membrane pore formation. *J Mol Biol*, **257**, 129-152.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Luberacki, B.** (2007) Struktur- und Funktionsanalyse eines "Nep1-like-Proteins" aus *Pythium aphanidermatum*: Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.

- Maček, P.** (1992) Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria). *FEMS Microbiol Immunol*, **5**, 121-129.
- Macfarlane, M.G. and Knight, B.C.** (1941) The biochemistry of bacterial toxins: The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxins. *Biochem J*, **35**, 884-902.
- Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R. and Dangl, J.L.** (2003) Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, **112**, 379-389.
- Mackey, D., Holt, B.F., 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.
- Malovrh, P., Viero, G., Serra, M.D., Podlesek, Z., Lakey, J.H., Maček, P., Menestrina, G. and Anderluh, G.** (2003) A novel mechanism of pore formation: membrane penetration by the N-terminal amphipathic region of equinatoxin. *J Biol Chem*, **278**, 22678-22685.
- Manceva, S.D., Pusztai-Carey, M., Russo, P.S. and Butko, P.** (2005) A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry*, **44**, 589-597.
- Mancheno, J.M., Martin-Benito, J., Martinez-Ripoll, M., Gavilanes, J.G. and Hermoso, J.A.** (2003) Crystal and electron microscopy structures of sticholysin II actinoporin reveal insights into the mechanism of membrane pore formation. *Structure*, **11**, 1319-1328.
- Manning, V.A. and Ciuffetti, L.M.** (2005) Localization of Ptr ToxA Produced by *Pyrenophora tritici-repentis* Reveals Protein Import into Wheat Mesophyll Cells. *Plant Cell*, **17**, 3203-3212.
- Manning, V.A., Hardison, L.K. and Ciuffetti, L.M.** (2007) Ptr ToxA interacts with a chloroplast-localized protein. *Mol Plant Microbe Interact*, **20**, 168-177.
- Mariathasan, S. and Monack, D.M.** (2007) Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*, **7**, 31-40.
- Mariathasan, S., Weiss, D.S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W.P., Weinrauch, Y., Monack, D.M. and Dixit, V.M.** (2006) Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, **440**, 228-232.
- Markham, J.E., Li, J., Cahoon, E.B. and Jaworski, J.G.** (2006) Separation and identification of major plant sphingolipid classes from leaves. *J Biol Chem*, **281**, 22684-22694.
- Martinon, F., Burns, K. and Tschopp, J.** (2002) The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*, **10**, 417-426.

- Marty-Detraves, C., Francis, F., Baricault, L., Fournier, D. and Paquereau, L.** (2004) Inhibitory action of a new lectin from *Xerocomus chrysenteron* on cell-substrate adhesion. *Mol Cell Biochem*, **258**, 49-55.
- 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.
- Matzinger, P.** (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, **12**, 991-1045.
- Matzinger, P.** (2002) The danger model: a renewed sense of self. *Science*, **296**, 301-305.
- Matzinger, P.** (2007) Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat Immunol*, **8**, 11-13.
- 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.
- Medzhitov, R.** (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*, **1**, 135-145.
- Medzhitov, R.** (2007) Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, **449**, 819-826.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.** (2000a) Innate Immunity. *N Engl J Med*, **343**, 338-344.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (1998a) An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol*, **10**, 12-15.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (1998b) Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol*, **10**, 351-353.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (2000b) How does the immune system distinguish self from nonself? *Semin Immunol*, **12**, 185-188; discussion 257-344.
- Medzhitov, R. and Janeway, C.A., Jr.** (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science*, **296**, 298-300.
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. and Janeway, C.A., Jr.** (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, **388**, 394-397.
- Meijer, H.J. and Munnik, T.** (2003) Phospholipid-based signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 265-306.
- Meinardi, E., Florin-Christensen, M., Paratcha, G., Azcurra, J.M. and Florin-Christensen, J.** (1995) The molecular basis of the self/nonself selectivity of a coelenterate toxin. *Biochem Biophys Res Commun*, **216**, 348-354.

- Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K. and He, S.Y.** (2006) Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell*, **126**, 969-980.
- Meylan, E. and Tschopp, J.** (2006) Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. *Mol Cell*, **22**, 561-569.
- Meylan, E., Tschopp, J. and Karin, M.** (2006) Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature*, **442**, 39-44.
- Michell, R.H.** (2008) Inositol derivatives: evolution and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **9**, 151-161.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H. and Shibuya, N.** (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 19613-19618.
- Morgan, W. and Kamoun, S.** (2007) RXLR effectors of plant pathogenic oomycetes. *Curr Opin Microbiol*, **10**, 332-338.
- Moscatiello, R., Mariani, P., Sanders, D. and Maathuis, F.J.** (2006) Transcriptional analysis of calcium-dependent and calcium-independent signalling pathways induced by oligogalacturonides. *J Exp Bot*, **57**, 2847-2865.
- Moser, J., Gerstel, B., Meyer, J.E., Chakraborty, T., Wehland, J. and Heinz, D.W.** (1997) Crystal structure of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C from the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *J Mol Biol*, **273**, 269-282.
- Mudgett, M.B.** (2005) New insights to the function of phytopathogenic bacterial type III effectors in plants. *Annu Rev Plant Biol*, **56**, 509-531.
- Nalefski, E.A. and Falke, J.J.** (1996) The C2 domain calcium-binding motif: structural and functional diversity. *Protein Sci*, **5**, 2375-2390.
- Naylor, C.E., Eaton, J.T., Howells, A., Justin, N., Moss, D.S., Titball, R.W. and Basak, A.K.** (1998) Structure of the key toxin in gas gangrene. *Nat Struct Biol*, **5**, 738-746.
- 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.
- Nürnberger, 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.
- Nürnberger, 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.
- Nürnberger, T. and Scheel, D.** (2001) Signal transmission in the plant immune response. *Trends Plant Sci*, **6**, 372-379.

- Oecking, C., Piotrowski, M., Hagemeyer, J. and Hagemann, K.** (1997) Topology and target interaction of the fusicoccin-binding 14-3-3 homologs of *Commelina communis*. *Plant J*, **12**, 441-453.
- Ogura, Y., Sutterwala, F.S. and Flavell, R.A.** (2006) The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell*, **126**, 659-662.
- Oppenheim, J.J. and Yang, D.** (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol*, **17**, 359-365.
- Osorio, S., Castillejo, C., Quesada, M.A., Medina-Escobar, N., Brownsey, G.J., Suau, R., Heredia, A., Botella, M.A. and Valpuesta, V.** (2008) Partial demethylation of oligogalacturonides by pectin methyl esterase 1 is required for eliciting defence responses in wild strawberry (*Fragaria vesca*). *Plant J*, **54**, 43-55.
- Palmgren, M.G., Sommarin, M., Serrano, R. and Larsson, C.** (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *J Biol Chem*, **266**, 20470-20475.
- Parker, M.W. and Feil, S.C.** (2005) Pore-forming protein toxins: from structure to function. *Prog Biophys Mol Biol*, **88**, 91-142.
- Paulick, M.G. and Bertozzi, C.R.** (2008) The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins. *Biochemistry*, **47**, 6991-7000.
- 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**, 353-350.
- Petrilli, V., Dostert, C., Muruve, D.A. and Tschopp, J.** (2007) The inflammasome: a danger sensing complex triggering innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **19**, 615-622.
- Petrilli, V., Papin, S. and Tschopp, J.** (2005) The inflammasome. *Curr Biol*, **15**, R581.
- Pieterse, C.M. and van Loon, L.C.** (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci*, **4**, 52-58.
- Pieterse, C.M. and Van Loon, L.C.** (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 456-464.
- Ponting, C.P. and Parker, P.J.** (1996) Extending the C2 domain family: C2s in PKCs delta, epsilon, eta, theta, phospholipases, GAPs, and perforin. *Protein Sci*, **5**, 162-166.
- 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., Kufner, 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 Nürnberger, T.** (2006) Phytotoxicity and innate immune responses induced by Nep1-like proteins. *Plant Cell*, **18**, 3721-3744.
- Rajamohan, F., Cotrill, J.A., Gould, F. and Dean, D.H.** (1996) Role of domain II, loop 2 residues of *Bacillus thuringiensis* CryIAb delta-endotoxin in reversible and irreversible binding to *Manduca sexta* and *Heliothis virescens*. *J Biol Chem*, **271**, 2390-2396.
- Reymond, P., Grünberger, S., Paul, K., Müller, M. and Farmer, E.E.** (1995) Oligogalacturonide defense signals in plants: large fragments interact with the plasma membrane in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4145-4149.
- Rivas, S. and Thomas, C.M.** (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol*, **43**, 395-436.
- Roberts, M.R. and Bowles, D.J.** (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol*, **119**, 1243-1250.
- Romeis, T., Piedras, P. and Jones, J.D.** (2000) Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. *Plant Cell*, **12**, 803-816.
- 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.
- Rosenstiel, P., Jacobs, G., Till, A. and Schreiber, S.** (2008) NOD-like receptors: ancient sentinels of the innate immune system. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 1361-1377.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaller, A. and Oecking, C.** (1999) Modulation of plasma membrane H⁺-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell*, **11**, 263-272.
- Schouten, A., van Baarlen, P. and van Kan, J.A.** (2008) Phytotoxic Nep1-like proteins from the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* associate with membranes and the nucleus of plant cells. *New Phytol*, **177**, 493-505.
- Schulze-Lefert, P.** (2004) Plant immunity: the origami of receptor activation. *Curr Biol*, **14**, R22-24.
- Schwessinger, B. and Zipfel, C.** (2008) News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **11**, 389-395.
- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W. and Staskawicz, B.J.** (1996) Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science*, **274**, 2063-2065.

- Senčič, L. and Maček, P.** (1990) New method for isolation of venom from the sea anemone *Actinia cari*. Purification and characterization of cytolytic toxins. *Comp Biochem Physiol B*, **97**, 687-693.
- Seong, S.Y. and Matzinger, P.** (2004) Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, **4**, 469-478.
- Shan, L., He, P., Li, J., Heese, A., Peck, S.C., Nürnberger, T., Martin, G.B. and Sheen, J.** (2008) Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell Host Microbe*, **4**, 17-27.
- Smith, G.A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N.C., Portnoy, D.A. and Goldfine, H.** (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun*, **63**, 4231-4237.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L., Cookson, B.T. and Aderem, A.** (2003) Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol*, **4**, 1247-1253.
- Song, C.J., Steinebrunner, I., Wang, X., Stout, S.C. and Roux, S.J.** (2006) Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **140**, 1222-1232.
- Staal, J. and Dixelius, C.** (2007) Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends Plant Sci*, **12**, 334-342.
- Stäb, M.R. and Ebel, J.** (1987) Effects of Ca²⁺ on phytoalexin induction by fungal elicitor in soybean cells. *Arch Biochem Biophys*, **257**, 416-423.
- Stieger, S. and Brodbeck, U.** (1991) Glycosyl-phosphatidylinositol anchored acetylcholinesterase as substrate for phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus cereus*. *Biochimie*, **73**, 1179-1186.
- Sutterwala, F.S., Ogura, Y. and Flavell, R.A.** (2007) The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. *J Leukoc Biol*, **82**, 259-264.
- Suzuki, K., Fukuda, Y. and Shinshi, H.** (1995) Studies on Elicitor-Signal Transduction Leading to Differential Expression of Defense Genes in Cultured Tobacco Cells. *Plant Cell Physiol.*, **36**, 281-289.
- Taguchi, F., Shimizu, R., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y.** (2003) Post-translational modification of flagellin determines the specificity of HR induction. *Plant Cell Physiol*, **44**, 342-349.
- Taguchi, F., Takeuchi, K., Katoh, E., Murata, K., Suzuki, T., Marutani, M., Kawasaki, T., Eguchi, M., Katoh, S., Kaku, H., Yasuda, C., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. and Ichinose, Y.** (2006) Identification of glycosylation genes and glycosylated amino acids of flagellin in *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Cell Microbiol*, **8**, 923-938.

- Takezawa, D.** (1999) Elicitor- and A23187-induced expression of WCK-1, a gene encoding mitogen-activated protein kinase in wheat. *Plant Mol Biol*, **40**, 921-933.
- Takken, F.L., Albrecht, M. and Tameling, W.I.** (2006) Resistance proteins: molecular switches of plant defence. *Curr Opin Plant Biol*, **9**, 383-390.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y. and Martin, G.B.** (1996) Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science*, **274**, 2060-2063.
- Ting, J.P., Willingham, S.B. and Bergstralh, D.T.** (2008) NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol*, **8**, 372-379.
- Titball, R.W., Fearn, A.M. and Williamson, E.D.** (1993) Biochemical and immunological properties of the C-terminal domain of the alpha-toxin of *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett*, **110**, 45-50.
- Tomas, A., Feng, G.H. and Reeck, G.R.** (1990) Purification of a cultivar-specific toxin from *Pyrenophora tritici-repentis*, causal agent of tan spot of wheat. *Mol Plant Microbe Interact*, **3**, 221-224.
- Tournier, J.N. and Quesnel-Hellmann, A.** (2006) Host-pathogen interactions: a biological rendez-vous of the infectious nonself and danger models? *PLoS Pathog*, **2**, 341-345.
- Treumann, A., Lively, M.R., Schneider, P. and Ferguson, M.A.** (1995) Primary structure of CD52. *J Biol Chem*, **270**, 6088-6099.
- Tuori, R.P., Wolpert, T.J. and Ciuffetti, L.M.** (1995) Purification and immunological characterization of toxic components from cultures of *Pyrenophora tritici-repentis*. *Mol Plant Microbe Interact*, **8**, 41-48.
- Tuori, R.P., Wolpert, T.J. and Ciuffetti, L.M.** (2000) Heterologous expression of functional Ptr ToxA. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 456-464.
- Tweten, R.K.** (2005) Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect Immun*, **73**, 6199-6209.
- Tyler, B.M., Tripathy, S., Zhang, X., Dehal, P., Jiang, R.H., Aerts, A., Arredondo, F.D., Baxter, L., Bensasson, D., Beynon, J.L., Chapman, J., Damasceno, C.M., Dorrance, A.E., Dou, D., Dickerman, A.W., Dubchak, I.L., Garbelotto, M., Gijzen, M., Gordon, S.G., Govers, F., Grunwald, N.J., Huang, W., Ivors, K.L., Jones, R.W., Kamoun, S., Krampis, K., Lamour, K.H., Lee, M.K., McDonald, W.H., Medina, M., Meijer, H.J., Nordberg, E.K., Maclean, D.J., Ospina-Giraldo, M.D., Morris, P.F., Phuntumart, V., Putnam, N.H., Rash, S., Rose, J.K., Sakihama, Y., Salamov, A.A., Savidor, A., Scheuring, C.F., Smith, B.M., Sobral, B.W., Terry, A., Torto-Alalibo, T.A., Win, J., Xu, Z., Zhang, H., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. and Boore, J.L.** (2006) Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science*, **313**, 1261-1266.
- Uchida, T., Yamasaki, T., Eto, S., Sugawara, H., Kurisu, G., Nakagawa, A., Kusunoki, M. and Hatakeyama, T.** (2004) Crystal structure of the hemolytic lectin

CEL-III isolated from the marine invertebrate *Cucumaria echinata*: implications of domain structure for its membrane pore-formation mechanism. *J Biol Chem*, **279**, 37133-37141.

Underhill, D.M. and Ozinsky, A. (2002) Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*, **14**, 103-110.

Valcarcel, C.A., Dalla Serra, M., Potrich, C., Bernhart, I., Tejuca, M., Martinez, D., Pazos, F., Lanio, M.E. and Menestrina, G. (2001) Effects of Lipid Composition on Membrane Permeabilization by Sticholysin I and II, Two Cytolysins of the Sea Anemone *Stichodactyla helianthus*. *Biophys J*, **80**, 2761-2774.

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

Veit, S., Wörle, 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.

Walev, I., Reske, K., Palmer, M., Valeva, A. and Bhakdi, S. (1995) Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J*, **14**, 1607-1614.

Walton, J.D. (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *Plant Cell*, **8**, 1723-1733.

Wilmsen, H.U., Leonard, K.R., Tichelaar, W., Buckley, J.T. and Pattus, F. (1992) The aerolysin membrane channel is formed by heptamerization of the monomer. *EMBO J*, **11**, 2457-2463.

Xiang, T., Zong, N., Zou, Y., Wu, Y., Zhang, J., Xing, W., Li, Y., Tang, X., Zhu, L., Chai, J. and Zhou, J.M. (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol*, **18**, 74-80.

Yamaguchi, Y., Pearce, G. and Ryan, C.A. (2006) The cell surface leucine-rich repeat receptor for AtPep1, an endogenous peptide elicitor in Arabidopsis, is functional in transgenic tobacco cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10104-10109.

Ye, Z. and Ting, J.P. (2008) NLR, the nucleotide-binding domain leucine-rich repeat containing gene family. *Curr Opin Immunol*, **20**, 3-9.

Yu, L., Fernig, D.G., Smith, J.A., Milton, J.D. and Rhodes, J.M. (1993) Reversible inhibition of proliferation of epithelial cell lines by *Agaricus bisporus* (edible mushroom) lectin. *Cancer Res*, **53**, 4627-4632.

Zeidler, D., Zahringer, 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 U S A*, **101**, 15811-15816.

Zhang, S. and Klessig, D.F. (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends Plant Sci*, **6**, 520-527.

Zimmermann, S., Nürnberger, T., Frachisse, J.M., Wirtz, W., Guern, J., Hedrich, R. and Scheel, D. (1997) Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 2751-2755.

Zipfel, C. (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*, **20**, 10-16.

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.

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

ABL	<i>Agaricus bisporus</i> Lektin
ATP	Adenosin tr iphosphat
BAK1	brassinosteroid insensitive 1-associated receptor k inase 1
BIR	baculovirus inhibitor r epeat
CARD	c aspase r ecruitment d omain
CEBiP	Chitin e licitor- b inding p rotein
CERK1	Chitin e licitor r ecceptor k inase 1
CDPK	c alcium- d ependent p rotein k inase
COI1-JAZ-Komplex	C oronatine-insensitive 1- j asmonate Z IM-domain protein-Komplex
DAMP	d amage- a ssociated m olecular p atterns
DEX	D examethason
DPPG	D ipalmitoyl-Glycero- P hosphoglycerol
DTT	D ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethyleneglykoltetraessigsäure
EFR	EF -Tu- R ezeptor
EF-Tu	E longationsfaktor Tu
EIX	ethylene biosynthesis-inducing x ylanase
EMS	E thyl m ethansulfonat
ETI	E ffector- t riggered i mmunity
ETS	E ffector- t riggered s usceptibility
FLS2	f lagellin s ensing 2
GPI	G lykosyl p hosphatidylinositol
GUS	β -Glukuronidase
HIN1	h arpin- i nduced 1
HMGB1	h igh- m obility g roup b ox 1 protein
HR	h ypersensitive r esponse
INS	infectious n on- s elf
IRAK	I nterleukin- r ecceptor- a ssociated k inase
JA	Jasmonat
KO	K nockout
LPS	L ipop p olysaccharid
LRR	L eucin r ich r epeat
MAMP	m icrobe- a ssociated m olecular p atterns
MAPK	m itogen a ctivated p rotein k inase
MyD88	M yeloid d ifferentiation primary response gene 88
NBS	n uclear b inding s ite
NEP1	n ecrosis- and e thylene-inducing peptide
NIP	n ecrosis-inducing p rotein
NLP	NEP 1-like p rotein
NLP _{Ha}	NLP aus <i>Hyaloperonospora arabidopsidis</i>
NLP _{Mg}	NLP aus <i>Magnaporthe grisea</i>
NLP _{Myg}	NLP aus <i>Mycosphaerella graminicola</i>

NLP _{Pcc}	NLP aus <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>
NLP _{Pp}	NLP aus <i>Phytophthora parasitica</i>
NLP _{Ps}	NLP aus <i>Phytophthora sojae</i>
NLP _{Py}	NLP aus <i>Pythium aphanidermatum</i>
NLR	NOD-like receptors
NO	Stickstoffmonoxid
NOD	nucleotide binding and oligomerisation domain
NPP1	necrosis-inducing Phytophthora protein 1
PAD3	phytoalexin deficient 3
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PaNIE	<i>Pythium aphanidermatum</i> necrosis inducing elicitor
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PI(4)P	Phosphatidylinositol-4-Phosphat
PI(3,5)P ₂ 8:0	1,2-Dioctanoyl-<i>sn</i>-glycero-3-[phosphoinositol-3,5-bisphosphat]
PI(3,5)P ₂ 18:1	1,2-Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-[phosphoinositol-3,5-bisphosphat]
PI(3,4,5)P ₃ 8:0	1,2-Dioctanoyl-<i>sn</i>-glycero-3-[phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat]
PI(3,4,5)P ₃ 18:1	1,2-Dioleoyl-<i>sn</i>-glycero-3-[phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat]
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POPC	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholin
POPE	Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylethanolamin
PR	pathogenesis related
PRR	pattern recognition receptor
PTI	PAMP-triggered immunity
PYD	pyrin domain
RIG	retinoic-acid-inducible gene
RIN4	RPM1-interacting protein 4
RLK	receptor-like kinase
RLP	receptor-like protein
RLR	RIG-like receptors
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SA	Salicylsäure
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel elektrophoresis
TIR	Toll/Interleukin 1 Rezeptordomäne
TLR	Toll-like receptor
WT	Wildtyp
XCL	<i>Xerocomus chrysenteron</i> Lektin

8.2 Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
H	Histidin	T	Threonin
I	Isoleucin	V	Valin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

8.3 Oligonukleotide

8.3.1 Klonierung in pPIC9K

NLP _{Pp} forEco:	TTTGAATTCGACGTGATCTCGCACGATG
NLP _{Pp} revNot:	TTTGCGGCCGCCTAAGCGTAGTAAGCGTTGC
NLP _{Pya} forEco:	TTTGAATTCGCCGTGATCAACCATGATGCTG
NLP _{Pya} revNot:	AAAGCGGCCGCTTACTGGAAAAACGCCTTCAC
NLP _{Pcc} forAvrII:	CCCCCTAGGGATACTTTCCCAAATTAACCAATCC
NLP _{Pcc} revNot:	TTTGCGGCCGCTTATTTTCGATGTCGTTAGACTGG

8.3.2 Klonierung in pBluescript KS(-)

ESPforKpn:	AAAGGTACCTCGCAGGCTAAATATATTCGTGTTC
ESP-NLP _{Pp} for:	ATTCAAGGAGTTAATATGGACGTGATCTCGCACGAT
ESP-NLP _{Pp} rev:	ATCGTGCGAGATCACGTCCATATTAACCTCCTTGAAT
NLP _{Pp} revSac:	AAAGAGCTCCTAAGCGTAGTAAGCGTTGCCTACC
ESP-NLP _{Pya} for:	CACTACGTTTTCTTCACATGCAGCCGTGATCAACCATGATGCTG
ESP-NLP _{Pya} rev:	AGCATCATGGTTGATCACGGCTGCATGTGAAGAAAACGTAGTG
NLP _{Pya} revSac:	AAAGAGCTCTTACTGGAAAAACGCCTTCAC

8.3.3 Echtzeit-PCR-Analyse

Actinfor:	ATGGCAGACGGTGAGGATATTCA
Actinrev:	GCCTTTGCAATCCACATCTGTTG
HIN1for:	TACATGCGTATTAGGCTTAAGG
HIN1rev:	CATGTATATCAATGAACACTAAACG

PAD3for: CAGGGAAGATACGGATATAAAC
PAD3rev: AGTGGCATTTAAGTAAAGGCC

8.3.4 Zielgerichtete Mutagenese auf NLP_{pp}

Y86Afor: ACGCTATCATGGCTTCGTGGTATTTCCCTAAGG
Y86Arev: GAAATACCACGAAGCCATGATAGCGTAGACGCCATTG
Y89Afor: TGTACTCGTGGGCTTTCCCTAAGGACTCGCCAG
Y89Arev: TCCTTAGGGAAAGCCCACGAGTACATGATAGCGTAG
K92Afor: GTATTTCCCTGCTGACTCGCCAGTCACTGGAC
K92Arev: CTGGCGAGTCAGCAGGGAAATACCACGAGTAC
D93Afor: GTATTTCCCTAAGGCTTCGCCAGTCACTGGACTGG
D93Arev: GACTGGCGAAGCCTTAGGGAAATACCACGAGTAC
G100Afor: CACTGGACTGGCTCATCGCCACGACTGGGAGC
G100Arev: GTGGCGATGAGCCAGTCCAGTACTGGCGAG
H101Afor: CTGGACTGGGGGCTCGCCACGACTGGGAGCACG
H101Arev: AGTCGTGGCGAGCCCCAGTCCAGTACTGG
R102Afor: ACTGGGGCATGCTCACGACTGGGAGCACGTGG
R102Arev: TCCCAGTCGTGAGCATGCCCCAGTCCAGTACTGG
H103Afor: TGGGGCATCGCGCTGACTGGGAGCACGTGGTCCG
H103Arev: TGCTCCCAGTCAGCGCGATGCCCCAGTCCAGTG
D104Afor: CATCGCCACGCTTGGGAGCACGTGGTCTGTCTGG
D104Arev: ACGTGCTCCCAAGCGTGGCGATGCCCCAGTCCAG
W105Afor: TCGCCACGACGCTGAGCACGTGGTCTGTCTGGGTCCG
W105Arev: CACGTGCTCAGCGTTCGTGGCGATGCCCCAGTCC
E106Afor: CACGACTGGGCTCACGTGGTCTGTCTGGGTCCGACG
E106Arev: GACCACGTGAGCCCAGTTCGTGGCGATGCCCCAG
S126Afor: GTGTCGCCTGCTGCCACAGTGGCTACAACATC
S126Arev: ACTGTGGGCAGCAGGCGACACAGCGATGATCG
H128Afor: CCTTCTGCCGCTAGTGGCTACAACATCTACTATCC
H128Arev: TGTAGCCACTAGCGGCAGAAGGCGACACAGCGATG
Y151Afor: CAAGGTGGACGCTTCGTCCAGTTGGGTGGTGATC
Y151Arev: CAACTGGACGAAGCGTCCACCTTGGCACTGTAGC
H159Afor: GTGATCAATGCTGCGCTGGACAGCACGACGGAC
H159Arev: CTGTCCAGCGCAGCATTGATCACCACCCAACTGG
W176Afor: TCTGATCATGGCTGATCAACTCACGGACGCAGC
W176Arev: GTGAGTTGATCAGCCATGATCAGATCCTGGGTTTC

F203Afor: AGGACGGCAATGCTCTAACCAAGGTAGGCAACG
 F203Arev: ACCTTGGTTAGAGCATTGCCGTCCTTCATGGGGAC
 Δ7for: CTAAGGACTCGCCAGTCACTGGACTGCACGTGGTCGTCTGGGTGCGAC
 Δ7rev: GATATCGTCGACCCAGACGACCACGTGCAGTCCAGTGACTIONGGCGAGT

8.3.5 Zielgerichtete Mutagenese auf NLP_{Pcc}

K92Afor: CACTCTATTTTTAGCTGATCAGATACTGAATGGAGTAAATTCAG
 TTCAGG
 K92Arev: CATTAGTATCTGATCAGCTAAAAAATAGAGTGAATAGAACTACC
 D93Afor: GTGGTAGTTTCTATTCAGTCTATTTTTTAAAGCTCAGATACTG
 AATGGAGTAAATTCAGGCCACC
 D93Arev: GGTGGCCTGAATTTACTCCATTCAGTATCTGAGCTTTTAAAAAA
 TAGAGTGAATAGAACTACCAC
 G100Afor: GAGTAAATTCAGCTCACCGCCATGATTGGGAAC
 G100Arev: TCATGGCGGTGAGCTGAATTTACTCCATTCAG
 H101Afor: GTAAATTCAGGCGCTCGCCATGATTGGGAACATG
 H101Arev: CAATCATGGCGAGCGCCTGAATTTACTCCATTC
 R102Afor: GTAAATTCAGGCCACGCTCATGATTGGGAAC
 R102Arev: TCCAATCATGAGCGTGGCCTGAATTTACTCC
 H103Afor: CAGGCCACCGCGCTGATTGGGAACATGTTGC
 H103Arev: GTTCCAATCAGCGCGGTGGCCTGAATTTACTC
 D104Afor: CCACCGCCATGCTTGGGAACATGTTGCAATCTG
 D104Arev: CATGTTCCCAAGCATGGCGGTGGCCTGAATTTAC
 D104Efor: CCACCGCCATGAATGGGAACATGTTGCAATCTG
 D104Erev: CATGTTCCCATTCATGGCGGTGGCCTGAATTTAC
 D104Kfor: CCACCGCCATAAATGGGAACATGTTGCAATCTG
 D104Krev: CATGTTCCCATTTATGGCGGTGGCCTGAATTTAC
 D104Nfor: CCACCGCCATAATTGGGAACATGTTGCAATCTG
 D104Nrev: CATGTTCCCATTAATGGCGGTGGCCTGAATTTAC
 W105Afor: CACCGCCATGATGCTGAACATGTTGCAATCTG
 W105Arev: CAACATGTTGAGCATCATGGCGGTGGCCTGA
 E106Afor: CCATGATTGGGCTCATGTTGCAATCTGGACT
 E106Arev: GATTGCAACATGAGCCCAATCATGGCGGTGG
 S126Afor: TGGTAGCTACGCTGCGCATGGAAAATTGACGAC
 S126Arev: TTTCCATGCGCAGCGTAGCTACCATGCGTTACC
 H128Afor: AGCTACAGTGCTCATGGAAAATTGACGACTAAAG
 H128Arev: CAATTTTCCATGAGCACTGTAGCTACCATGC

Danksagung

Mein Dank gilt ...

- ... Prof. Dr. Thorsten Nürnberger für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut für Pflanzenbiochemie unter optimalen Arbeitsbedingungen anzufertigen sowie für die Bereitstellung des interessanten Themas.
- ... Prof. Dr. Thorsten Nürnberger und Dr. Frédéric Brunner für die Betreuung, Hilfe und Unterstützung bei meiner Arbeit sowie die konstruktive Kritik, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen wertvollen Anregungen.
- ... Prof. Dr. Claudia Oecking für die Bereitschaft, das Zweitgutachten dieser Arbeit zu übernehmen.
- ... Prof. Dr. Claudia Oecking und Christian Ottmann für die Zusammenarbeit betreffend der Strukturanalysen der NLPs und für die in dieser Arbeit gezeigten Strukturabbildungen.
- ... Prof. Dr. Minna Pirhonen für den *Pectobacterium carotovorum nlp⁺* und *nlp⁻* Stamm.
- ... Prof. Dr. Gregor Anderluh für die Hilfe bei der Optimierung des Calcein-Release-Assays sowie die Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in Ljubljana.
- ... Dr. Dinah Qutob und Dr. Frédéric Brunner für die Zusammenarbeit bei den Vitalitätsanalysen mittels GUS-NLP-Kotransformation und FDA-Färbung.
- ... Prof. Dr. Sophien Kamoun für die Bereitstellung der induzierbaren NLP_{PS}-Linien und Dr. Frédéric Brunner für die Durchführung der EMS-Mutagenese.
- ... allen Mitarbeitern der Pflanzenbiochemie für die gute Arbeitsatmosphäre, besonders meinen unmittelbaren Kollegen aus N4: Fritz, Birgit, Zana und Eric. Die Zusammenarbeit mit Euch hat mir stets viel Freude bereitet.
- ... meinen Eltern, meiner Schwester und Markus für den Rückhalt und die moralische Unterstützung. Besonders danke ich Markus für den Beistand in den schwierigen letzten Monaten dieser Arbeit. Schön, dass es Dich gibt.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Isabell Küfner
Geburtsdatum und -ort: 30.05.1980 in Kronach

Studium

Januar 2009: Promotion
Thema: Physiologische und molekulare
Charakterisierung der Wirkung von NEP1-ähnlichen
Proteinen (NLPs) auf Pflanzen

2004-2009: Promotion an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Promotionsstudiengang: Biologie

Juni 2004: Diplom
Thema: Molekulare Charakterisierung putativer
organischer Ionentransporter in *Arabidopsis thaliana*

1999 bis 2004: Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Studiengang: Diplom Biologie
Hauptfach: Pflanzenphysiologie
Biologisches Nebenfach: Genetik
Nichtbiologisches Nebenfach: Biochemie

Schulische Laufbahn

Juni 1999: Abitur

1990 bis 1999: Frankenwald-Gymnasium Kronach

1986 bis 1990: Grundschule Steinwiesen