

**Charakterisierung eines neuen bakteriellen
Elicitors von *Ralstonia solanacearum* in
*Arabidopsis thaliana***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Eric Melzer
aus Wittenberg

Tübingen
2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

19.07.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Thorsten Nürnberger

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Georg Felix

Inhalt

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Immunsystem der Pflanzen.....	1
1.1.1	MAMPs und MAMP-vermittelte Immunität.....	3
1.1.2	Effektoren und Effektor-vermittelte Immunität	6
1.1.3	DAMPs	9
1.2	<i>Ralstonia solanacearum</i> (Smith) Yabuuchi et al.....	10
1.3	Ziel der Arbeit	12
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	Material.....	13
2.1.1	Chemikalien.....	13
2.1.2	Pflanzen und Kultivierungsbedingungen	13
2.1.3	Bakterien und Kultivierungsbedingungen	14
2.2	Methoden.....	16
2.2.1	Aufreinigung von Proteinen aus <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
2.2.1.1	Herstellung der Proteinextrakte von <i>R. solanacearum</i>	16
2.2.1.2	Säulenchromatographie.....	17
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.2.1	Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	19
2.2.2.2	Coomassiefärbung nach SDS-PAGE.....	20
2.2.2.3	Silberfärbung nach SDS-PAGE	20
2.2.2.4	Proteinbestimmung nach Bradford	21
2.2.2.5	Dialyse von Proteinlösungen	21
2.2.2.6	Proteinverdau mit Proteinase K, selten schneidenden Proteasen oder Cyanogenbromid	22

2.2.2.7	Immunoblot	22
2.2.2.8	Extraktion genomischer DNA aus <i>R. solanacearum</i>	23
2.2.2.9	Konzentrationsbestimmung von DNA	23
2.2.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
2.2.2.11	Agarosegelelektrophorese	25
2.2.2.12	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	25
2.2.2.13	Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	25
2.2.2.14	Expressionskonstrukte für <i>E. coli</i>	25
2.2.2.15	Transformation von <i>E. coli</i>	26
2.2.2.16	DNA-Sequenzierung	26
2.2.3	Biologische Studien	27
2.2.3.1	Messung der Ethyleninduktion in <i>A. thaliana</i>	27
2.2.3.2	Histochemischer Nachweis der Bildung von β -Glukuronidase in <i>pPR1::GUS</i> transgenen <i>A. thaliana</i>	27
2.2.3.3	Messung der Medienalkalisierung pflanzlicher Zellkulturen	28
2.2.3.4	MAP-Kinasen	28
2.2.3.5	Bestimmung von Kallosebildung	28
2.2.3.6	Detektierung reaktiver Sauerstoffspezies	29
3.	ERGEBNISSE	30
3.1	<i>Ralstonia solanacearum</i> enthält einen hitzestabilen, proteinogenen Elicitor	31
3.1.1	Säulenchromatographische Reinigung der Proteine des hitzebehandelten Zellextraktes	34
3.1.2	Säulenchromatographische Reinigung der Proteine des Kulturextraktes	45
3.1.3	Quantitative Auswertung der Reinigung	53

3.2	Potentielle MAMPs von <i>Ralstonia solanacearum</i>	56
3.2.1	Sequenzierung vorgereinigter Proteine des Zellextraktes	56
3.2.2	Sequenzierung vorgereinigter Proteine des Kulturextraktes	58
3.2.3	Klonierung potenzieller MAMPs	60
3.2.4	Test abgeleiteter Peptide	62
3.3	Charakterisierung des <i>R. solanacearum</i> Elicitors (RsE)	69
3.3.1	Der Zellextrakt induziert Medienalkalisierung und Expression von PR1	69
3.3.2	Der gereinigte <i>R. solanacearum</i> Elicitor induziert Immunantworten im nanomolaren Bereich	71
3.3.3	Cyanogenbromid und selten schneidende Proteasen spalten aktive Peptide aus RsE-A und RsE-B ab	80
4.	DISKUSSION	82
4.1	Die Aufreinigung von RsE aus <i>R. solanacearum</i>	82
4.1.1	Feintrennende, säulenchromatographische Reinigung des hitzebehandelten Zellextraktes	84
4.1.2	Feintrennende, säulenchromatographische Reinigung des Kulturextraktes	86
4.2	Fügt sich RsE in das MAMP-Konzept ein?	89
4.3	Welches Protein repräsentiert RsE?	91
4.4	Enthält RsE ein Minimalmotiv für die Erkennung durch einen korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor?	94
4.5	Sind RsE-A und RsE-B auf dasselbe Protein zurückzuführen?	96
5.	ZUSAMMENFASSUNG	98
6.	LITERATURVERZEICHNIS	99
7.	ANHANG	112

Abbildungen

Abbildung 1-1: Sequenzvergleich der flg22-Peptide von <i>P. aeruginosa</i> und <i>R. solanacearum</i>	12
Abbildung 3-1: Ethyleninduktion durch ansteigende Konzentrationen der Extrakte von <i>R. solanacearum</i>	31
Abbildung 3-2: Proteinprofil der Extrakte von <i>R. solanacearum</i>	33
Abbildung 3-3: Reduzierung der Elicitor-Aktivität durch Proteinase K	34
Abbildung 3-4: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie	36
Abbildung 3-5: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie	37
Abbildung 3-6: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Kationenaustausches mit hochauflösender Säule.....	39
Abbildung 3-7: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen des Anionenaustausches bei pH 11,1.....	40
Abbildung 3-8: Chromatogramm der Gelfiltration	41
Abbildung 3-9: Ethyleninduktion und Proteinprofil nach Gelfiltration	42
Abbildung 3-10: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der HIC..	44
Abbildung 3-11: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Anionenaustauschchromatographie	46
Abbildung 3-12: Ethyleninduktion und Proteinprofil nach hochauflösendem Kationenaustausch.....	47
Abbildung 3-13: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Rechromatographie von Pool A und Pool B	49
Abbildung 3-14: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Anionenaustausches A	51
Abbildung 3-15: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Anionenaustausches B	52
Abbildung 3-16: Zur Massenfingerabdruck-Analyse ausgeschnittene Gelbanden der Fraktion 12 der AAC bei pH 11,1 und der Fraktion 52 der Gelfiltration.....	56

Abbildung 3-17: Zur Massenfingerringdruck-Analyse ausgeschnittene Gelbanden der Fraktionen A11 und B10 der Anionenaustauschchromatographie bei pH 11,1.....	58
Abbildung 3-18: Expression potentieller MAMPs von <i>R. solanacearum</i>	60
Abbildung 3-19: Ethyleninduktion der exprimierten <i>R.solanacearum</i> -Proteine	61
Abbildung 3-20: Ethyleninduktion der synthetisierten <i>R.solanacearum</i> -Peptide	63
Abbildung 3-21: Ethyleninduktion der synthetisierten SPP-Peptide.....	65
Abbildung 3-22: Ethyleninduktion der synthetisierten ARS-Peptide	66
Abbildung 3-23: Test der synthetisierten Peptide auf Induktion einer Medienalkalisierung in pflanzlichen Zellkulturen	67
Abbildung 3-24: Medienalkalisierung von <i>A. thaliana fls2 x efr</i> durch RsE	70
Abbildung 3-25: RsE induziert PR1	71
Abbildung 3-26: Ethyleninduktion durch ansteigende Konzentrationen von RsE-A und RsE-B	72
Abbildung 3-27: Medienalkalisierung von <i>A. thaliana Col-0</i> durch RsE-A und RsE-B.....	74
Abbildung 3-28: Test auf Induktion einer Medien-alkalisierung in pflanzlichen Zellkulturen.....	75
Abbildung 3-29: Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in <i>A. thaliana</i>	76
Abbildung 3-30: Kallosebildung durch RsE A und RsE B	77
Abbildung 3-31: RsE-A und RsE-B induzieren die Aktivierung von MAPKs ..	78
Abbildung 3-32: Behandlung von RsE-A und RsE-B mit PNGase F reduziert nicht die Ethylen induzierende Aktivität.....	79
Abbildung 3-33: Ethylen induzierende Aktivität von mit Proteasen und Cyanogenbromid behandeltem RsE-A und RsE-B.....	81
Abbildung 3-34: Proteinprofil der verdauten Aliquots von RsE-A und RsE-B	81
Abbildung 7-1: Proteinsequenzalignment von <i>R. solanacearum</i> LSP.....	113
Abbildung 7-2: Proteinsequenz von SPP und Lage der abgeleiteten Peptide	114
Abbildung 7-3: Ableitung der sich überlappenden Peptide von <i>R. solanacearum</i> SPP	115

Abbildung 7-4: Ableitung der sich überlappenden Peptide von <i>R. solanacearum</i> ARS	116
Abbildung 7-5: Vektorkarte für den Zwischenvektor pJET1.2/blunt	117
Abbildung 7-6: Vektorkarte für den Expressionsvektor pET22b(+)	118

Tabellen

Tabelle 1-1: Übersicht bisher identifizierter MAMPs	4
Tabelle 2-1: Für FPLC verwendete Puffersysteme	17
Tabelle 2-2: Für FPLC verwendete Säulen.....	18
Tabelle 2-3: Standardansatz einer PCR	24
Tabelle 2-4: Standardprotokoll einer PCR-Reaktion	24
Tabelle 3-1: EC ₅₀ -Werte der Extrakte von <i>R. solanacearum</i>	32
Tabelle 3-2: Übersicht über die für den Referenzlauf verwendeten Proteine. 41	
Tabelle 3-3: Proteingehalte in aktiven und nicht aktiven Fraktionen des Zellextraktes nach einzelnen Reinigungsschritten	54
Tabelle 3-4: Proteingehalte in aktiven und nicht aktiven Fraktionen des Kulturextraktes nach einzelnen Reinigungsschritten	55
Tabelle 3-5: Auswahl potentieller MAMPs des hitzebehandelten Zellextraktes	57
Tabelle 3-6: Auswahl potentieller MAMPs des Kulturextraktes.....	59
Tabelle 3-7: Sequenzen der von LSP und SPP abgeleiteten Peptide	62
Tabelle 3-8: Sequenzen der von SPP und ARS abgeleiteten Peptide.....	64
Tabelle 3-9: EC ₂₀ - und EC ₅₀ -Werte von RsE-A und RsE-B für die Induktion von Ethylen	72
Tabelle 3-10: molare EC ₅₀ -Werte der Ethyleninduktion von RsE-A und RsE-B für Molekulargewichte von 30, 20 und 10 kDa	73
Tabelle 7-1: Primerliste.....	112
Tabelle 7-2: Sequenzierungsdaten der Proteinbanden aus Gelfiltration und Anionenaustausch des Zellextraktes (Abbildung 3-16)	119
Tabelle 7-3: Sequenzierungsdaten der Proteinbanden der Anionenaustauschchromatographien A und B (Abbildung 3-17).....	119

Abkürzungen

AAC	Anionenaustauschchromatographie
Avr	Avirulenzfaktor
BAK1	BRI1-associated kinase 1 (BRI1-assoziierte Kinase 1)
bp	Basenpaar
BRI1	brassinosteroid insensitive 1
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia-0
DAMP	Danger-associated molecular pattern (Gefahrenassoziiertes molekulares Muster)
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoxyribonukleinsäure)
EC	effective concentration (effektive Konzentration)
EFR	EF-Tu-Rezeptor
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
elf18	Peptid von EF-Tu (Sequenz: SKEKFERTKPHVNVGTIG)
ETI	Effector-triggered immunity (durch Effektoren ausgelöste Immunität)
ETS	Effector-triggered susceptibility (durch Effektoren ausgelöste Suszeptibilität)
flg22	Peptid von Flagellin (Sequenz QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA)
FLS2	Flagellin-sensitive 2
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography (Schnelle Proteinflüssigkeitschromatographie)
HIC	Hydrophobe Interaktionschromatographie
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
kDa	KiloDalton
KEC	Kationenaustauschchromatographie
Ler	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Landsberg erecta
LRR	Leucine-rich repeat (Leucinreiche Wiederholung)
LPS	Lipopolysaccharid
MAMP	Microbe-associated molecular pattern (Mikrobenassoziiertes

	molekulares Muster)
MAPK/MPK	Mitogen-activated protein kinase (Mitogenaktivierte Proteinkinase)
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern (Pathogenassoziiertes molekulares Muster)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PNGase F	Peptid-N-Glykosidase F
PR	Pathogenesis-related (Pathogenitätsassoziiert)
PRR	Pattern recognition receptor (Mustererkennungsrezeptor)
PTI	PAMP-triggered immunity (durch PAMPs ausgelöste Immunität)
R-Gen	Resistenzgen
RLU	relative light units (relative Lichteinheiten)
R-Protein	Resistenzprotein
RLK	Receptor-like kinase (Rezeptorähnliche Kinase)
ROS	Reactive oxygen species (Reaktive sauerstoffspezies)
SA	Salicylic acid (Salicylsäure)
TLR	Toll-like receptor
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Jedes Lebewesen steht mit seiner belebten und unbelebten Umwelt in ständiger Wechselwirkung. Diese biotischen und abiotischen Interaktionen prägen das Leben auf unserem Planeten seit Anbeginn und sind wichtige Triebfedern der Evolution. So war die Kolonisierung des Landes durch Pflanzen vor etwa 700 Millionen Jahren wohl nur durch die Interaktion phototropher Organismen mit Pilzen möglich (Heckman et al., 2001).

Bei den biotischen Interaktionen unterscheidet man zwischen symbiontischen, kommensalen und parasitären Wechselwirkungen, das heißt sie können für einen Organismus von Vorteil, ohne Auswirkung oder von Nachteil sein. Für alle diese Beziehungen ist die Erkennung des jeweils anderen Interaktors von besonderer Bedeutung. Voraussetzung dafür ist ein Perzeptionssystem, das es dem Lebewesen zum einen ermöglicht zwischen „Selbst“ und „Nicht-Selbst“ zu unterscheiden und zum anderen diese Erkenntnis den oben genannten Interaktionstypen zuzuordnen, um in der Folge entsprechend reagieren zu können.

Das Prinzip der Immunität lässt sich schon bei Bakterien und Archäen finden, bei denen einige beispielweise in der Lage sind, das Anheften von Viren und die Injektion viralen Erbguts enzymatisch zu blockieren (Horvath and Barrangou, 2010).

1.1 Das Immunsystem der Pflanzen

Im Gegensatz zu den Wirbeltieren besitzen Pflanzen keine mobilen Abwehrzellen und kein adaptives Immunsystem. Zudem sind Pflanzen sessile Organismen, die vor einem Feind nicht fliehen können. Dennoch oder gerade deshalb haben Pflanzen im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, die es ihnen ermöglichen, sich erfolgreich gegen Schadorganismen zur Wehr zu setzen. Pflanzenpathogene Mikroorganismen finden sich bei den Viren, den Bakterien, den Oomyceten und den Echten Pilzen. Sind Pflanzen in der Lage, bestimmte

Vertreter dieser Gruppen zu erkennen und in der Folge Abwehrreaktionen einzuleiten, die geeignet sind, das Wachstum und somit die Ausbreitung des Pathogens zu unterbinden, so spricht man von Resistenz bzw. inkompatibler Interaktion. Im Gegensatz dazu ist eine Pflanze gegenüber einem bestimmten Pathogen suszeptibel, wenn es ihr nicht möglich ist, dieses zu erkennen oder abzuwehren. Das heißt, der Schadorganismus kann sich in oder an der Pflanze etablieren und sie somit schädigen, was auch als kompatible Interaktion bezeichnet wird.

Die Grundlage der pflanzlichen Immunität ist das Vermögen „Selbst“ von „Nicht-Selbst“ oder „verändertem Selbst“ unterscheiden zu können. Die angeborene Immunität von Pflanzen besteht aus zwei, sich ergänzenden Ebenen: Die erste Ebene bildet die MAMP-vermittelte Immunität (engl. MAMP-triggered immunity, MTI), die in älteren Abhandlungen als basale Resistenz bezeichnet wird. Im Laufe der Evolution entwickelten einige Mikroorganismen jedoch Mechanismen, die MAMP-vermittelte Immunität mittels Effektoren auszuschalten. Das Umgehen der MAMP-vermittelten Immunität durch Effektoren wird als Effektor-vermittelte Suszeptibilität bezeichnet (engl. effector triggered susceptibility, ETS). Auf diese Herausforderung reagierten Pflanzen mit der Entwicklung einer zweiten Ebene angeborener Immunität, die es ihnen ermöglicht Effektoren oder Produkte ihrer Aktivität zu erkennen. Sind Pflanzen dann noch in der Lage geeignete Abwehrmaßnahmen einzuleiten, so spricht man von Effektor-vermittelter Resistenz (engl. effector triggered immunity, ETI), früher als R-Gen-basierte Resistenz bezeichnet (Abramovitch et al., 2006; Chisholm et al., 2006; Jones and Dangl, 2006).

1.1.1 MAMPs und MAMP-vermittelte Immunität

Die erste Stufe der pflanzlichen Immunität, die MAMP-vermittelte Immunität basiert auf der rezeptorvermittelten Erkennung mikrobeassoziiertes molekularer Muster (engl. microbe-associated molecular patterns, MAMPs). MAMPs sind molekulare Strukturen, die in einer großen Gruppe von Mikroorganismen, nicht aber in den jeweiligen Wirtspflanzen vorkommen. Sie sind desweiteren von physiologischer Bedeutung für den mikrobiellen Organismus, das heißt, sie sind konserviert und können vom Pathogen nicht ohne Verluste in Fitness, Pathogenität oder Virulenz verändert werden (Medzhitov and Janeway, 1997; Nürnberger and Brunner, 2002; Thomma et al., 2011). Bisher identifizierte MAMPs, eine Auswahl gibt die Tabelle 1-1, gehören verschiedenen Stoffgruppen an. Bakteriellies Flagellin, der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu) und Pep-13, das nur 13 Aminosäuren lange Fragment aus der *Phytophthora* Transglutaminase sind gut untersuchte proteinogene MAMPs (Nürnberger et al., 1994; Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004). Desweiteren bekannt und gut untersucht sind Chitin, der Grundbestandteil pilzlicher Zellwände, Heptaglukan aus Oomyceten sowie bakterielle Zellwandkomponenten wie Lipopolysaccharide und Peptidoglykan (Cosio et al., 1990; Felix et al., 1993; Dow et al., 2000; Gust et al., 2007; Erbs et al., 2008).

Zur Erkennung dieser MAMPs nutzen Pflanzen Mustererkennungsrezeptoren (engl. pattern recognition receptors, PRRs), die an der Zelloberfläche lokalisiert sind. Viele der bisher identifizierten, pflanzlichen Mustererkennungsrezeptoren gehören zur Genfamilie der Rezeptor-ähnlichen Kinasen (engl. receptor like kinases, RLKs), die allein in *Arabidopsis thaliana* über 600 Mitglieder zählt (Shiu and Bleecker, 2001; Ronald and Beutler, 2010). Vertreter dieser Gruppe sind Transmembranproteine mit einer extrazellulären Bindedomäne am N-Terminus und einer intrazellulären Kinasedomäne am C-Terminus. Die extrazelluläre Domäne kann verschieden strukturierte Motive enthalten. Bei den bislang bekannten Rezeptoren besteht diese Domäne aus einer unterschiedlichen Anzahl Leucin-reicher Wiederholungen (engl. leucin-rich repeat, LRR).

Tabelle 1-1: Übersicht bisher identifizierter MAMPs

<i>MAMP</i>	<i>Organismus</i>	<i>Erkanntes Minimalmotiv</i>
Lipopolysaccharide ¹	Gram-negative Bakterien	Lipid A
Flagellin ²	Gram-negative Bakterien	Peptid flg22
Elongationsfaktor Tu ³	Gram-negative und Gram-positive Bakterien	Peptid elf18
Harpin ⁴	Gram-negative Bakterien	unbekannt
Cold-shock Protein ⁵	Gram-negative und Gram-positive Bakterien	RNP-1 Motiv
Nekrose induzierende Proteine ⁶	Bakterien, Echte Pilze und Oomyceten	unbekannt
Transglutaminase ⁷	Oomyceten	Pep-13 Motiv
Lipid-Transferproteine ⁸	Oomyceten	unbekannt
Xylanase ⁹	Echte Pilze	TKLGE Pentapeptid
Invertase ¹⁰	Hefe	N-mannosylierte Peptide
β -Glukane ¹¹	Echte Pilze, Oomyceten und Braunalgen	Hepta-b-glucoside (Tetraglukosylsorbitol-verzweigt) und lineare oligo-b-glukoside
Sulfatierte Fukane ¹²	Braunalgen	Fukanoligosaccharide
Chitin ¹³	Echte Pilze	Chitinoligosaccharide
Ergosterol ¹⁴	Echte Pilze	
Cerebroside A, C ¹⁵	Echte Pilze	Sphingoidrückgrad

¹ Meyer et al., 2001; Zeidler et al., 2004; ² Felix et al., 1999; ³ Kunze et al., 2004; ⁴ Wei et al., 1992; He et al., 1993; Lee et al., 2001; ⁵ Felix and Boller, 2003; ⁶ Bailey, 1995; Fellbrich et al., 2002; Qutob et al., 2002; Mattinen et al., 2004; Pemberton and Salmond, 2004; ⁷ Nürnberger et al., 1994; Brunner et al., 2002; ⁸ Osman et al., 2001; ⁹ Enkerli et al., 1999; Ron and Avni, 2004; ¹⁰ Basse et al., 1993; ¹¹ Klarzynski et al., 2000; Yamaguchi et al., 2000; Fliegmann et al., 2004; ¹² Baureithel et al., 1994; ¹³ Baureithel et al., 1994; Ito et al., 1997; ¹⁴ Granada et al., 1995; ¹⁵ Koga et al., 1998

Prominente und gut untersuchte Vertreter dieser LRR-RLKs sind FLS2 (FLAGELLIN-SENSING 2) und EFR (EF-Tu-Rezeptor), die Rezeptoren für bakterielles Flagellin bzw. EF-Tu (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Zipfel et al., 2006). Leucin-reiche Wiederholungen finden sich auch in tierischen Mustererkennungsrezeptoren, wie zum Beispiel die *Drosophila* Toll-Rezeptoren und die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) der Säugetiere, was auf eine sehr frühe Entwicklung von LRR-RLKs innerhalb der Evolution hindeutet (Ronald and Beutler, 2010). Die Entwicklung des Flagellinrezeptors scheint jedoch in Pflanzen und Tieren konvergent verlaufen zu sein, da sich sowohl die Strukturen von FLS2 und dem tierischen Flagellinrezeptor TLR5, als auch das durch sie erkannte Flagellin epitop voneinander unterscheiden (Gomez-Gomez and Boller, 2000; Hayashi et al., 2001; Donnelly and Steiner, 2002).

Dass Mustererkennungsrezeptoren zur Resistenz gegenüber Pathogenen beitragen zeigen Experimente mit Pflanzen, bei denen FLS2 deletiert wurde. Diese KO-Mutanten waren gegenüber Bakterien wesentlich anfälliger als Wildtyppflanzen (Zipfel et al., 2004). Desweiteren zeigten Pflanzen ohne funktionelle Kinasedomäne der LysM-Rezeptorkinase CERK1 (Chitin-Elicitor-Rezeptor-Kinase 1) erhöhte Suszeptibilität gegenüber pilzlichen Pathogenen (Miya et al., 2007).

Die Erkennung eines MAMPs führt zu einer Reihe zellulärer Antworten. So ist als eine der frühesten Reaktionen eine Änderung der Ionenströme über die Plasmamembran detektierbar. Der Influx von Ca^{2+} und H^+ steigt ebenso wie der Efflux von Cl^- , K^+ und NO_3^- (Boller and Felix, 2009). Der Anstieg des cytoplasmatischen Calciumspiegels hat wiederum die Aktivierung von Proteinkinasen zur Folge, Ca^{2+} wirkt hier also als *second messenger* (Blume et al., 2000; Garcia-Brugger et al., 2006; Zhang and Zhou, 2010). Zu diesen Proteinkinasen gehören auch die mitogenaktivierten Proteinkinasen (engl. Mitogen-activated protein kinases, MAPKs), deren Aktivierung bereits kurze Zeit nach der Detektion eines MAMPs nachgewiesen werden kann. Am Ende einer ganzen Kaskade von mitogenaktivierten Proteinkinasen steht die transkriptionelle Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren der WRKY-Familie (Asai et al., 2002; Colcombet and Hirt, 2008). Diese Transkriptionsfaktoren induzieren zum einen die Transkription von abwehrspezifischen PR-Genen (engl. *Pathogenesis*

Related), die beispielsweise für lytische Enzyme, Defensine (antimikrobielle Proteine) oder Enzyme für die Synthese verschiedener Phytoalexine (antimikrobielle Sekundärmetabolite) kodieren (Eulgem and Somssich, 2007). Zum anderen wird aber auch die Transkription von Genen mit einer indirekten Rolle bei der Immunantwort induziert, wie beispielsweise Gene für die Biosynthese von Callose, einem β -1,3-Glukan zur Verstärkung der Zellwand (Hardham et al., 2007). Weitere typische Immunantworten sind die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und die Bildung des Stresshormons Ethylen. Reaktive Sauerstoffspezies sind zum einen toxisch für das Pathogen, zum anderen stärken sie die Zellwand der Pflanze durch das Einfügen zusätzlicher Quervernetzungen (Apel and Hirt, 2004). Die Synthese von Ethylen hingegen wird bei vielen biotischen und abiotischen Stresssituationen ausgelöst. Im Fall der angeborenen Immunität von Pflanzen erfüllt das Phytohormon Ethylen eine Reihe wichtiger Aufgaben (Robert-Seilaniantz et al., 2011; Zhao and Guo, 2011). So induziert Ethylen als Antwort auf verschiedene Pathogene zusammen mit Jasmonsäure die Transkription wichtiger Abwehrgene wie *EDR1*, *PR1b*, *PR5* oder *PDF1.2* (Lorenzo et al., 2003) und Ethylen-insensitive Mutanten zeigen eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber pilzlichen Pathogenen (Thomma et al., 1999). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass der Immunrezeptor FLS2 in *A. thaliana* unter direkter transkriptioneller Kontrolle von ethylenabhängigen Transkriptionsfaktoren steht und dass ethyleninsensitive Mutanten in der Perzeption von Flagellin beeinträchtigt sind (Boutrot et al., 2010).

1.1.2 Effektoren und Effektor-vermittelte Immunität

Im Laufe der Evolution haben phytopathogene Mikroorganismen Strategien entwickelt, die durch MAMPs ausgelöste Immunantwort der Pflanzen mittels Effektoren zu unterdrücken, was in der Folge zur Effektor-vermittelten Suszeptibilität der Pflanze führt (Jones and Dangl, 2006; Hann et al., 2010). Effektoren sind üblicherweise Proteine, die vom Pathogen in den Apoplasten

oder in das Cytoplasma einer Wirtszelle injiziert werden, um zelluläre Prozesse des Wirtes zum eigenen Vorteil zu verändern.

Bakterielle Effektoren werden üblicherweise mittels des Typ-III-Sekretionssystems in die Pflanzenzelle transportiert. In der Zelle können diese Effektoren an verschiedenen Stellen in die MAMP-vermittelte Immunantwort eingreifen (Abramovitch et al., 2006; Jones and Dangl, 2006; Da Cunha et al., 2007). So besitzt das Gram-negative Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* beispielsweise die Effektoren AvrPto und AvrPtoB, welche an die Kinasedomänen von FLS2 und BAK1 binden und somit die Signalweiterleitung der Mustererkennung dieser Rezeptoren inhibieren können (Shan et al., 2008; Cheng et al., 2011). Diese Effektoren blockieren also bereits die Grundlage der MAMP-vermittelten Immunität, die Perzeption. Eine zweite Domäne von AvrPtoB inhibiert die mit der MAMP-vermittelten Immunität assoziierte Kinase Bti9 aus *Lycopersicon esculentum* (Cheng et al., 2011; Zeng et al., 2012). Darüber hinaus besitzt AvrPtoB am C-Terminus eine E3-Ligaseaktivität, die in *A. thaliana* die LysM-Rezeptorkinase CERK1, von der kürzlich gezeigt werden konnte, dass sie nicht nur für die Chitinperzeption sondern auch für die Erkennung von Peptidoglykan essentiell ist (Willmann et al., 2011), für den Abbau markiert (Gimenez-Ibanez et al., 2009). In *L. esculentum* inhibiert diese E3-Ligaseaktivität den programmierten Zelltod als Abwehrreaktion gegen *P. syringae* (Janjusevic et al., 2006).

Einen anderen Ansatzpunkt zur Unterdrückung von Immunantworten zeigen die Effektoren HopM und AvrE aus *P. syringae*, die in den Vesikeltransport der Zelle eingreifen und in der Folge salicylsäureabhängige Immunantworten wie Calloseeinlagerungen in die Zellwand unterbinden (DebRoy et al., 2004; Nomura et al., 2006). In die Signaltransduktion der MAP-Kinasekaskaden greift der Effektor YopJ aus *Yersinia* ein. Er modifiziert wichtige Serin-/Threoninreste von MAPKK6, was zu einer Blockierung der Phosphorylierung und somit zum Ausfall der Kinase führt (Mukherjee et al., 2006).

Sind bakterielle Effektoren und ihr Wirkmechanismus bereits gut verstanden, so weiß man über Effektoren phytopathogener Pilze und Oomyceten noch recht wenig. Oft sind sie Virulenzfaktoren für das jeweilige Pathogen, das heißt, ein Ausschalten dieser Effektoren geht mit einer Verringerung der Virulenz oder gar

dem Verlust der Pathogenität einher. Die genauen Funktionen sind aber oftmals noch unbekannt (De Wit et al., 2009; Stergiopoulos and de Wit, 2009).

Gut untersucht ist das Pathosystem *Cladosporium fulvum* – *Lycopersicon esculentum* (Rivas and Thomas, 2005). Der Effektor Avr2 aus *C. fulvum* wird während der Infektion in den Apoplasten sekretiert und inhibiert dort für die Immunität von *L. esculentum* wichtige Cystein-Proteasen (Rooney et al., 2005; Shabab et al., 2008). Ein weiterer Effektor dieses Pathogens, Avr4, ist ein chitinbindendes Protein der Lectinfamilie und schützt die pilzliche Zellwand vor der Hydrolyse durch pflanzliche Chitinasen (van den Burg et al., 2006). Eine ganze Gruppe von Effektoren bilden die Ecps (engl. extracellular proteins) von *Cladosporium fulvum*, jedoch ist ihre Funktion noch nicht abschließend geklärt. Von Ecp6 weiß man, dass es drei LysM-Domänen besitzt, die in der Bindung von Kohlenhydraten eine Rolle spielen. Derzeit geht man davon aus, dass Ecp6 Chitin bindet, also eine funktional homologe Rolle wie Avr4 übernimmt. Desweiteren könnte Ecp6 Chitinfragmente des Pilzes abfangen und diese somit der Detektion durch die Pflanze entziehen (Bolton et al., 2008; de Jonge et al., 2010).

Oomyceten besitzen Effektoren, die je nach Vorhandensein konservierter Bereiche nahe des N-Terminus in zwei Klassen eingeteilt werden können: RXLR- und CRN-Proteine (Bozkurt et al., 2012). Die Zuordnung dieser konservierten Motive zu Effektoren führte durch *in silico*-Analysen zu einer großen Anzahl neuer potentieller Effektoren, deren Funktion derzeit Gegenstand intensiver Forschung ist. Bereits bekannt ist der Effektor Avr3a aus *Phytophthora infestans*, der den durch INF1 aus *P. infestans* ausgelösten Zelltod inhibiert (Bos et al., 2006).

Um dem Ausschalten der MAMP-vermittelten Immunität durch mikrobielle Effektoren zu begegnen, haben einige Pflanzen Erkennungsmechanismen für Effektoren oder die durch sie verursachten zellulären Veränderungen entwickelt. Führen diese Erkennungsmechanismen wieder zu einer Immunität gegenüber einem Pathogen so spricht man von Effektor-vermittelter Immunität (engl. Effector triggered immunity, ETI) (Jones and Dangl, 2006). Produkte mikrobieller Avirulenzgene werden von entsprechenden Produkten pflanzlicher Resistenz-(R)-Gene erkannt. Die meisten R-Proteine gehören zur Klasse der NB-LRR-Proteine,

sie besitzen Nukleotidbinde- und LRR-Domänen und sind im Cytoplasma lokalisiert (Martin et al., 2003; Meyers et al., 2003). Die Erkennung mikrobieller Effektoren kann direkt erfolgen, wie im Fall des YopJ/Avrxv-Effektors PopP2 von *Ralstonia solanacearum*, der mit dem *A. thaliana* R-Protein RRS1-R interagiert (Deslandes et al., 2003). Häufiger jedoch überwachen R-Proteine den Zustand potenzieller Effektorziele (Guard-Hypothese) (Dangl and Jones, 2001; Van der Hoorn et al., 2002). So kommt es in *A. thaliana* zur Effektor-vermittelten Immunität, wenn das R-Protein RPS2 den durch den bakteriellen Effektor AvrRpt2 vermittelten Abbau von RIN4 erkennt (Mackey et al., 2003).

1.1.3 DAMPs

Gefahrenassoziierte molekulare Muster (engl. danger-associated molecular patterns, DAMPs) stammen vom Wirtsorganismus selbst, weswegen sie ursprünglich als endogene Elicitoren bezeichnet wurden (Darvill and Albersheim, 1984). Sie werden bei Verwundungen, seien sie makro- oder mikroskopischer Natur, freigesetzt und können von der Pflanze detektiert werden. So setzen beispielsweise mikrobielle Enzyme pflanzliche Zellwandfragmente frei, sogenannte Oligogalakturonide (OGAs), die immunogene Aktivität zeigen (D'Ovidio et al., 2004). Ein möglicher Rezeptor für OGAs in *A. thaliana* ist die Zellwand-assoziierte Kinase WAK1, für die eine Bindung von OGAs und eine darauf basierende Medienalkalisierung gezeigt werden konnte (Cabrera et al., 2008). Cutinmonomere, die durch Cutinasen einiger phytopathogener Pilze freigesetzt werden, wirken in ähnlicher Weise als DAMPs, wenngleich hierbei der Perzeptionsmechanismus noch unbekannt ist (Schweizer et al., 1996; Kauss et al., 1999).

Eine weitere Gruppe von DAMPs bilden cytoplasmatische Proteine und Peptide, die bei Verwundung freigesetzt und von Nachbarzellen perzipiert werden und somit dem umliegenden Gewebe Gefahr signalisieren. Zwei gut untersuchte Beispiele dafür sind das 18 Aminosäuren lange Peptid Systemin, das in *L. esculentum* Abwehrreaktionen auslöst (Boller, 2005; Lotze et al., 2007) und

AtPep1, ein 23 Aminosäuren langes Peptid, welches in *A. thaliana* vom Protein PROPEP1 abgespalten wird und nach Perzeption durch den LRR-RLK-Rezeptor PEPR1 ähnlich wie Systemin zu einer Immunantwort führt (Huffaker et al., 2006; Yamaguchi et al., 2006).

1.2 ***Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.**

Ralstonia solanacearum (synonyme Bezeichnungen: *Pseudomonas solanacearum*, *Burkholderia solanacearum*) ist ein Gram-negatives, aerobes, Bodenbakterium aus der Klasse der Betaproteobakterien. Als Pflanzenpathogen besitzt es mit über 200 Arten aus mehr als 50 Pflanzenfamilien einen ungewöhnlich großen Wirtspflanzenkreis (Denny, 2006; Genin and Denny, 2012). *R. solanacearum* infiziert Pflanzen meist über die Wurzel durch kleinere Wunden oder mittels tierischer Vektoren wie Nematoden oder Blattläuse. Einmal in eine Pflanze eingedrungen, vermehrt es sich sehr schnell und kolonisiert das vaskuläre System der Pflanze. Die Schadsymptome reichen von unscheinbaren, an Trockenstress erinnernde Symptome, die sich sogar in den Abendstunden wieder mildern können, bis zu typischen Welkerscheinungen mit vergilbten Blättern (Tahat and Sijam, 2010). In nahezu allen Fällen endet die Krankheit mit dem Tod der Pflanze. Die bekanntesten von *R. solanacearum* erzeugten Krankheiten sind die Braunfäule an Kartoffel, die Bakterienwelke an Tomate, Tabak oder Aubergine und die Moko-Krankheit an Banane.

R. solanacearum produziert eine Menge extrazellulärer Polysaccharide (EPS), die zum einen den Wassertransport der Pflanze behindern und zum anderen das Bakterium vor der Entdeckung durch die Pflanze abschirmen. In resistenten Tomatensorten wird EPS aber auch als Elicitor erkannt und führt zu einer starken Immunantwort (Milling et al., 2011).

Die Bedeutung von *R. solanacearum* als Pathogen und Gegenstand der Forschung zeigt sich auch in der relativ frühen Sequenzierung seines Erbguts im Jahr 2002 im Vergleich zu anderen Pathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa* (Stover et al., 2000), *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 (Buell et al., 2003) oder

P. infestans (Haas et al., 2009). Das Genom mit 5129 proteinkodierenden Genen hat eine Größe von 5,8 Megabasen (Mb) und liegt in Form eines Chromosoms (3,7 Mb) und eines Megaplasmids (2,1 Mb) vor (Salanoubat et al., 2002). Weitere Analysen und Vergleiche der Genome verschiedener *R. solanacearum*-Stämme führte zu der Hypothese, dass es sich nicht um eine einzelne Art sondern um einen ganzen Spezieskomplex handelt, worauf zuvor bereits geographische Verbreitung und Wirtspräferenz der verschiedenen Stämme hindeuteten (Remenant et al., 2010; Genin and Denny, 2012).

1.3 Ziel der Arbeit

Dass mikrobe-assoziierte molekulare Muster von Pflanzen erkannt werden und zu einer Immunreaktion führen, hat sich in den letzten Jahren der Forschung auf dem Gebiet der Pflanzen-Pathogen-Interaktion von einer Theorie zu einer Tatsache entwickelt. Wenngleich bereits viele MAMPs und ihre korrespondierenden Rezeptoren identifiziert und charakterisiert sind, so gibt es Hinweise auf die Existenz einer Vielzahl weiterer MAMP-Rezeptor-Paare. Die Identifikation und Charakterisierung neuer MAMPs und ihrer Rezeptoren wird zu einem erweiterten Verständnis der angeborenen Immunität von Pflanzen beitragen. Desweiteren kann der Transfer neuer Rezeptoren in Wirtspflanzen dabei helfen, zum Beispiel neue resistente Nutzpflanzen zu erzeugen.

Der oben bereits beschriebene große Wirtspflanzenkreis macht *R. solanacearum* zu einem für die Pflanze-Pathogen-Interaktion interessanten und für die vorliegende Arbeit geeigneten Studienobjekt. Neben EPS sind keine weiteren MAMPs aus *R. solanacearum* bekannt. Man weiß jedoch, dass das zu *P. aeruginosa* korrespondierende Flagellinpeptid flg22 aus *R. solanacearum* in *A. thaliana* keine Immunantwort auslöst. Eine ClustalW-Analyse beider Peptide offenbart Sequenzunterschiede besonders im C-Terminus, die für die Nichterkennung verantwortlich sein könnten (Abbildung 1-1, rote Buchstaben).

```

P. aeruginosa (flg22)      QRLSTGSRINSAKDDAAGLQIA 22
R. solanacearum (flg22)  QRLSTGLRVNSAQDDSAAYAAS 22
***** *:***:***:* .   :
```

Abbildung 1-1: Sequenzvergleich der flg22-Peptide von *P. aeruginosa* und *R. solanacearum*

Allerdings konnte gezeigt werden, dass *R. solanacearum* proteinogene Elicitoren enthält. Diese konnten aber bislang nicht identifiziert werden (Pfund et al., 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, proteinogene MAMPs aus *R. solanacearum* GMI1000 aufzureinigen, zu identifizieren und ihre immunogene Aktivität in *A. thaliana* zu charakterisieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Qiagen (Hilden), Invitrogen (Karlsruhe) Duchefa /Haarlem, Niederlande), Molecular Probes (Leiden, Niederlande), Fluka (Buchs, Schweiz) und BD (Sparks, USA) erworben. Enzyme wurden von NEB (Beverly, USA), Fermentas (St. Leon-Rot) beschafft. Oligonukleotide wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) gekauft. Alle Lösungen und Medien wurden mit doppelt deionisiertem Wasser aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Schwalbach) angesetzt.

2.1.2 Pflanzen und Kultivierungsbedingungen

Zur Analyse immunogener Aktivität wurden *Arabidopsis thaliana* Col-0, *A. thaliana fls2 x efr*, *A. thaliana bak1-5*, *A.thaliana pPR1::GUS*, *Nicotiana benthamiana*, Tomate Msk8 (Koornneef et al., 1987; Felix et al., 1991) sowie *Oryza sativa* verwendet.

A. thaliana wurde unter Kurztagsbedingungen von 8 Stunden Licht und 16 Stunden Dunkelheit bei 21°C und einer Lichtmenge von 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ kultiviert. Die Aussaat erfolgte auf dampfsterilisierter GS90-Erde, die mit Vermikulit gemischt wurde. Nach einer zweitägigen Stratifikation in Dunkelheit bei 4°C wurden die Samen den obigen Kulturbedingungen ausgesetzt.

N. benthamiana und Tomate MsK8 wurden im Gewächshaus unter Langtagsbedingungen von 15 Stunden Licht und 9 Stunden Dunkelheit bei 22 °C angezogen.

Zellkulturen von *A. thaliana* (Land und *fls2 x efr*), *N. benthamiana*, Tomate MsK8 und *O. sativa*, gewonnen aus Gewebe, wurden kultiviert wie beschrieben (May and Leaver, 1993). Wöchentlich wurden aus Stammkulturen neue Zellkulturen angesetzt, welche 5 – 7 Tage nach dem Ansetzen für Alkalisierungsexperimente genutzt wurden.

Zellkulturmedium: 1 x MS
 3 % Saccharose
 500 ng/ml Naphtalenessigsäure
 5 ng/ml Kinetin (6-Furfurylaminopurin)
 pH 5,6

2.1.3 Bakterien und Kultivierungsbedingungen

R. solanacearum wurde für 42 h bei 28°C und 180 upm in Kelmans Medium kultiviert.

Escherichia coli XL1-Blue MRF' (Stratagene, Amsterdam, Niederlande; *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac* [F' *proAB*, *lacIqZΔM15*, Tn10 (Tet^r)] und *E. coli* 'Rosetta' wurden auf LB-Agar bei 37°C oder in flüssigem LB-Medium bei 37°C und 180 upm über Nacht inkubiert, wenn nicht anders angegeben. Den Medien wurden Antibiotika entsprechend der auf den Plasmiden kodierten Resistenzen zugefügt.

Glycerolstocks der Bakterien wurden durch Mischen mit Gefriermedium im Verhältnis 1:1 hergestellt und bei -80 °C eingefroren und aufbewahrt.

Kelmans Medium: 10 g/l Glukose
10g /l Pepton
1 g/l Caseinhydrolysat
pH 6,5

LB-Medium: 1 % (m/v) Trypton
0,5 % (m/v) Hefeextrakt
1 % (m/v) NaCl
pH 7,0
1,5 % (m/v) Agar für Festmedien

Gefriermedium: 24,6 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3,027 g/L Tris
650 ml/L Glycerin
pH 8

2.2 Methoden

2.2.1 Aufreinigung von Proteinen aus *Ralstonia solanacearum*

2.2.1.1 Herstellung der Proteinextrakte von *R. solanacearum*

R. solanacearum wurde in flüssigem Kelmans-Medium 42 h bei 28 °C kultiviert. Für die Herstellung von Proteinextrakten aus diesen Kulturen wurden zwei verschiedene Vorgehensweisen gewählt. In einem ersten Ansatz wurden die durch Zentrifugation bei 5000g pelletierten Zellen mittels French-Press aufgeschlossen. Nach Resuspension der aufgeschlossenen Zellen in 50 mM MES, pH 5,2 wurden die Zellbruchstücke abzentrifugiert (10.000g). Der Überstand ergab einen ersten Rohextrakt von *R. solanacearum*-Zellproteinen (als Zellextrakt bezeichnet). Um proteolytische Aktivität zu eliminieren, wurde ein Teil dieses Rohextraktes für 10 Minuten auf 90 °C erhitzt und danach in Eiswasser abgekühlt. Der nach Pelletierung denaturierter Proteine erhaltene Überstand ergab den ersten hitzebehandelten Proteinrohextrakt aus *R. solanacearum* Zellen (als hitzebehandelter Zellextrakt bezeichnet).

In einem zweiten Ansatz wurden die wie oben beschrieben kultivierten Zellkulturen vor der eigentlichen Ernte aufgeköcht und im Anschluss in Eiswasser abgekühlt. Alle unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert. Aus dem so gewonnenen Kulturextrakt wurden die Proteine durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 90 % ausgefällt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Zentrifugation bei 10.000g pelletiert und anschließend in 50 mM MES, pH 5,2 wieder gelöst. Zur Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration wurde dieser zweite Proteinrohextrakt (als Kulturextrakt bezeichnet) zusätzlich über Nacht gegen 50 mM MES, pH 5,2 dialysiert.

2.2.1.2 Säulenchromatographie

Alle FPLC-Läufe wurden mit dem Äkta Explorer System mit Fraktionssammler Frac-950 (GE Healthcare, München) durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden die Proteine gegen den für die jeweilige Chromatographie verwendeten Puffer A dialysiert. Die für die jeweiligen Chromatographieläufe verwendeten Puffersysteme sind in der Tabelle 2-1 zusammen gefasst. Nach dem Ansetzen wurden die Puffer durch einen 45 µm Filter zur Beseitigung unlöslicher Bestandteile vakuumfiltriert.

Tabelle 2-1: Für FPLC verwendete Puffersysteme

Puffer A	Puffer B	pH-Bereich	Anwendung
25 – 50 mM MES	A + 0,5 M KCl	5,2 – 6	Kationenaustausch
25 – 50 mM Tris	A + 0,5 M KCl	8 – 9	Anionenaustausch
20 mM 1,3-Diamino- propan	A + 0,5 M KCl	10,8 – 11,5	Anionenaustausch
50mM MES, 150 mM KCl	–	6,0	Gelfiltration
50 mM MES, 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM MES	6,5	Hydrophobe Interaktion

Die jeweils verwendeten Säulen wurden mit dem dreifachen Säulenvolumen doppelt deionisierten Wassers gespült und anschließend mit dem dreifachen Säulenvolumen Puffer A äquilibriert. Nach dem Laden der Proteinprobe mit 1 ml/min wurde die Säule mit 5 – 15 Säulenvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte wahlweise mit 100 % Puffer B oder mit einem linearen Gradienten von 0 – 100 % Puffer B über eine Länge von 7 – 10 Säulenvolumina. Eluierte Proteine wurden in jeweils geeigneten Volumina wie angegeben mit dem Fraktionssammler aufgefangen.

Die für die Läufe verwendeten Säulen sind in Tabelle 2-2 zusammengefasst.

Tabelle 2-2: Für FPLC verwendete Säulen

Name	Typ	Hersteller
HiTrap SP FF	starker Kationentauscher	GE Healthcare
HiTrap Q FF	starker Anionentauscher	GE Healthcare
Source15S 4,6/100	starker Kationentauscher	GE Healthcare
Source15Q 4,6/100	starker Anionentauscher	GE Healthcare
ReSourceQ 1ml	Starker Anionentauscher	GE Healthcare
ReSourcePhe 1 ml	Hydrophobe Interaktion	GE Healthcare
HiLoad Superdex 75 16/60	Gelfiltration	GE Healthcare

Die verwendeten Säulen wurden in regelmäßigen Abständen einer Reinigung nach Protokoll des Herstellers unterzogen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse ihrer Zusammensetzung wurden Proteine von Extrakten oder Chromatographiefraktionen nach ihrer Größe mittels 12 – 14 %igen Tricinpolyacrylamidgelen bei 20 mA pro Gel aufgetrennt. Zur Vorbereitung wurden die Proben mit Laufpuffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler-Prestained (Fermentas, St.Leon-Rot) bei jedem Lauf in geeigneter Konzentration mitgeführt.

Polyacrylamidgele:

Sammelgel (5 %):

- 1,67 ml Acrylamidmix
- 2,5 ml Gelpuffer
- 5,78 ml H₂O
- 0,05 ml 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 20 µl of TEMED

Trenngel (12 – 14 %):

- 12 - 14 ml 30 % Acrylamidmix
- 10 ml Gelpuffer
- 3,1 ml Glycerin
- 2,8 – 4,8 ml H₂O
- 0,1 ml 10% Ammoniumpersulfat (APS)
- 40 µl TEMED

Gelpuffer:

- 181,7 g Tris
- 1,5 g SDS
- H₂O add 500 ml
- pH 8,45

Anodenpuffer:	12,11 g Tris H ₂ O add 500 ml pH 8,9
Kathodenpuffer:	6,055 g Tris 8,96 g Tricin 0,5 g SDS H ₂ O add 500 ml
2 x Ladepuffer:	3 ml 3 M Tris-HCl, pH 8,45 2,4 ml Glycerin 0,8 g SDS 1,5 ml 0,1 % Coomassie Blue G 0,5 ml 0,1 % Phenol Red H ₂ O add 10 ml

2.2.2.2 Coomassiefärbung nach SDS-PAGE

Zur Anfärbung der Proteine nach SDS-PAGE wurden die Gele kurz in Coomassie-Färbelösung (0,125 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 50 % (v/v) Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure) aufgekocht und danach 5 min unter Schütteln inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit 10 % (v/v) Essigsäure entfernt.

2.2.2.3 Silberfärbung nach SDS-PAGE

Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Proteingele min. 1 h in einer Lösung aus 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure und 0,02 % (v/v) Formaldehyd unter Schütteln im Gel fixiert. Im Anschluss wurden die Gele dreimal für jeweils 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend 1 min in

Sensibilisierungspuffer (0,2 mg/ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser für jeweils 20 s wurden die Gele 1 h in Imprägnierlösung (2 mg/ml AgNO_3 , 0,03 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert. Danach wurde zweimal mit Wasser für je 20 s gewaschen. Zum Entwickeln wurden die Gele in einer Lösung aus 60 g/l Na_2CO_3 , 4 mg/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, 0,02 % (v/v) Formaldehyd solange inkubiert bis eine ausreichende Färbung eingetreten war. Nach erneutem Waschen mit Wasser wurde die Färbung durch Zugabe von 50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure gestoppt.

2.2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford-Lösung wurde durch Mischen von 1 Volumen Roti-Nanoquant (Carl Roth, Karlsruhe) und 4 Volumina Wasser hergestellt. In einer 96-Well Mikrotiterplatte wurden je Well 200 μl Lösung und 1 μl Proteinlösung gemischt. Die Absorption bei 595 nm wurde in einem Sirius HT Injector (MWG Biotech) mit Hilfe der Software KC4 (BIO-TEK, Bad Friedrichshall) gemessen. Durch eine mitgeführte Konzentrationsreihe von 1 – 5 mg/ml BSA wurde eine Eichgerade erstellt, anhand deren Formel die Proteinkonzentration in den Proteinlösungen errechnet werden konnte.

2.2.2.5 Dialyse von Proteinlösungen

Je nach Volumen der zu dialysierenden Proteinlösung wurden Dialyseschläuche (ZelluTrans, Karl Roth, Karlsruhe) oder Dialysekassetten (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, Thermo Scientific) mit einer Molekülausschlussgröße von 3,5 kDa verwendet. Nach Befüllen der Dialyseeinheiten wurde über Nacht bei 4 °C dialysiert.

2.2.2.6 Proteinverdau mit Proteinase K, selten schneidenden Proteasen oder Cyanogenbromid

Proteine wurden mit einer finalen Konzentration von 0,2 mg/ml Proteinase K und 5 mM CaCl₂ für 1 – 2 h bei 37 °C verdaut. Der Verdau mit den Endopeptidasen AspN und GluC (beide New England Biolabs, Frankfurt am Main) wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Anschluss an den Verdau wurden die Proteasen bei 80 °C für 10 Minuten hitzeinaktiviert. Zur Kontrolle wurden jeweils sowohl Ansätze ohne Proteasen als auch ohne Proteinlösung angesetzt und den gleichen Inkubationsbedingungen unterworfen.

Cyanogenbromid wurde in 80 % (v/v) TFA gelöst. Für den Verdau wurden 12,5 µl Proteinlösung zu 87,5 µl Cyanogenbromid/TFA-Lösung gegeben, gut gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Zur Kontrolle wurden wie oben beschrieben auch Ansätze ohne Cyanogenbromid und Ansätze ohne Proteinlösung mitgeführt. Zum Entfernen von TFA und Cyanogenbromid wurden die Ansätze in einem Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Die verdauten Proteine wurden anschließend wieder in Aqua dest. gelöst.

2.2.2.7 Immunoblot

Zur Detektion phosphorylierter Proteine mit spezifischen Antikörpern wurden die Proteine nach Größentrennung durch SDS-PAGE mittels Elektrophoretischer Transfer (BioRad) bei 250 mA für 1 h auf eine Hybond Nitrozellulosemembran (Amersham) transferiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen der Membran mit 5 % (w/v) Milchpulver in TBS (20 mM Tris pH 7,6, 150 mM NaCl) für 1 h bei RT unter Schütteln geblockt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBST (TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20) wurde der primäre Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST auf die Membran aufgetragen. Nach min. 1 h Inkubation wurde erneut mit TBST gewaschen und die Membran im Anschluss mit dem sekundären Antikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase, in einer

Verdünnung von 1:3000 in TBST für 2 h inkubiert. Die Farbreaktion wurde nach Äquilibration der Membran mit Tris pH 9.5-Puffer (150mM Tris pH9.5, 5mM MgCl₂, 100mM NaCl) mit je 250 µg/ml BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyolphosphat) und NBT (Nitrobluetetrazoliumchlorid) durchgeführt.

2.2.2.8 Extraktion genomischer DNA aus *R. solanacearum*

Zellen einer 5 ml *R. solanacearum* Flüssigkultur wurden mittels Zentrifugation geerntet und das erhaltene Zellpellet in 567 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe von 30 µl 10 % (w/v) SDS und 3 µl 20 mg/ml Proteinase K wurde der Extraktionsansatz für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 100 µl 5 M NaCl zugegeben und gemischt. Nach Zugabe von 80 µl CTAB/NaCl-Lösung (10 % (w/v) Cetyl-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB) in 0,7 M NaCl) wurde der Extraktionsansatz weitere 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Im Anschluss wurden 800 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) hinzugefügt und bei 13 000 upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, ein gleicher Teil Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) dazugegeben und der Ansatz bei 13 000 upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 2/3 Volumen Isopropanol ausgefällt und mittels Zentrifugation pelletiert. Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 70 % (v/v) Ethanol wurde die DNA bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und im Anschluss in Aqua dest. gelöst.

2.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Mit einem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher) wurden DNA-Spektren von 220 nm bis 340 nm gemessen und im Anschluss mit der NanoDrop Software ausgewertet.

2.2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

PCR-Reaktionen wurden, sofern nicht anders angegeben, in einem Volumen von insgesamt 20 µl angesetzt. Der Inhalt eines Standardansatzes ist in Tabelle 2-3 aufgelistet.

Tabelle 2-3: Standardansatz einer PCR

Substanz	Volumen
10 x PCR-Puffer ¹	2 µl
2,5 mM dNTPs	2 µl
10 µM <i>forward</i> -Primer	1 µl
10 µM <i>reverse</i> -Primer	1 µl
2 U/µl DNA-Polymerase	0,5 µl
DNA	1 µl
Wasser	12,5 µl

¹ 10X Taq-Puffer (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris/HCl pH 8,8, 25 mM MgCl₂, 0,1 % (v/v) Tween 20)

Die Reaktion wurde mit einem DNA Engine PTC-200-Thermocycler (MJ Research, Biozym Diagnostic GmbH, Oldendorf) durchgeführt. Als DNA-Matrize diente dabei Plasmid-DNA oder genomische DNA aus *R. solanacearum* (2.2.2.13 und 2.2.2.8). Das Reaktionsprotokoll der PCR ist in Tabelle 2-4 aufgeführt.

Tabelle 2-4: Standardprotokoll einer PCR-Reaktion

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	98 °C	3 Min
2. Denaturierung	98 °C	30 s
3. Primeranlagerung	T _m der Primer	30 s
4. Elongation	72 °C	1 Min/kb
5. 30 x Schritte 2 – 4		
6. finale Elongation	72 °C	5 Min

2.2.2.11 Agarosegelelektrophorese

In Agarosegelen wurden mit Ladepuffer (5 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1 mM Tris/HCl; pH 7,5 und 0,025 % (w/v) Orange G) versetzte DNA-Proben aufgetrennt. Dabei wurde eine Agarosekonzentration in 1x TAE-Puffer (4 mM Tris/Acetat; 1 mM EDTA pH 8,0) entsprechend der Anwendung gewählt.

Die Elektrophorese erfolgte bei einer elektrischen Feldstärke von 5 V/cm. Der Marker 1 kb Gene Ruler (Fermentas) wurde jeweils als Größenstandard mitgeführt. Zur Detektion wurde in die Gele Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml eingegossen. Die Visualisierung selbst erfolgte mittels UV-Transilluminator (Infinity-3026WL/26 MX, PeqLab) und der Software InfinityCapt 14.2 (PeqLab).

2.2.2.12 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA aus Agarosegelen wurde mit Hilfe des GenJet Gel Extraction Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.2.13 Isolation von Plasmiden aus *E. coli*

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des GenJet Plasmid Miniprep Kits (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.2.14 Expressionskonstrukte für *E. coli*

Zur Herstellung der Expressionskonstrukte der His6-Fusionsproteine wurden mit den entsprechenden Primern Fragmente von den jeweiligen kodierenden Sequenzen amplifiziert. Im Anschluss wurden diese dann mittels CloneJet PCR

Cloning Kit (Fermentas) in den Vektor pJET 1.2 kloniert, entsprechend den Angaben des Herstellers. Nach Anzucht positiver Klone und Isolierung ihrer Plasmide wurden die Konstrukte mit den Endonukleasen Nde I und Not I (beide Fermentas) verdaut und anschließend in Agarosegelen aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Banden wurden aus dem Gel geschnitten, isoliert (2.2.2.9) und in den Expressionsvektor pET22b subkloniert.

2.2.2.15 Transformation von *E. coli*

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* DH5 α oder *E. coli* Rosetta wurden wie beschrieben hergestellt (Inoue et al., 1990). Zur Transformation wurden 20 μ l des Ligationsansatzes oder 1 μ l gereinigtes Plasmid zu 200 μ l chemo-kompetenten Zellen gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz 90 Sekunden auf 42°C erwärmt. Unmittelbar im Anschluss wurden 600 μ l LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz 1 Stunde bei 37°C und 180 upm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten oder von Plasmid-DNA wurde von GATC (Konstanz) durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend den Anforderungen des Anbieters aufbereitet. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Programme EditSeq 5.00 und SeqMan 5.00 (StarDNA) sowie der Genome Workbench (National Center for Biotechnology Information) analysiert.

2.2.3 Biologische Studien

2.2.3.1 Messung der Ethyleninduktion in *A. thaliana*

Die Blätter sechs Wochen alter *A. thaliana* Pflanzen wurden in ~ 0,3 x 0,3 cm große Stücke geschnitten und über Nacht in Aqua dest. bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden 6 ml Inkubationsgläschen mit 400 µl Aqua dest. befüllt und je drei Blattstückchen (~ 12 mg Frischgewicht) dazugegeben. Nach Zugabe ausgewählter Volumina der zu testenden Lösungen wurden die Inkubationsgläschen mit einem Gummistopfen verschlossen. Nach drei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (170 upm) wurde mit einer Spritze 1 ml Luft aus dem Gasraum des Röhrchens entnommen und der darin befindliche Ethylengehalt mit einem Gaschromatographen (Shimadzu GC-14A mit Shimadzu C-R4AX Chromatopac; Shimadzu, Kyoto, Japan) bestimmt.

2.2.3.2 Histochemischer Nachweis der Bildung von β -Glukuronidase in *pPR1::GUS* transgenen *A. thaliana*

GUS-Aktivität in *pPR1::GUS* transgenen *A. thaliana* Pflanzen (Shapiro and Zhang, 2001) wurde histochemisch 24 h nach Infiltration von 5 – 6 Wochen alten Blättern bestimmt. Dazu wurden die Blätter geerntet und in Reaktionsgefäßen mit je 1 ml X-Gluc-Puffer [50 mM Na_3PO_4 pH 7,0; 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat (II) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 0,5 mM Kaliumhexacyanidoferrat (III) $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$; 10 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % (v/v) Triton X-100; 0,05 % (w/v) 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glukuronsäure (X-Gluc, Carl Roth, Karlsruhe)] überschichtet und nach Vakuuminfiltration über Nacht bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Blätter durch mehrmaliges Waschen mit 80 % (v/v) Ethanol entfärbt.

2.2.3.3 Messung der Medienalkalisierung pflanzlicher Zellkulturen

Zur Messung der extrazellulären Alkalisierung wurden 0,5 ml Aliquots pflanzlicher Zellkulturen (5 bis 8 Tage nach Subkultivierung) in offenen 24-Well Platten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) auf einem Schüttler bei 120 upm und Raumtemperatur inkubiert. Der extrazelluläre pH-Wert wurde in Abständen von 10 Minuten mit einer Glas-pH-Elektrode gemessen.

2.2.3.4 MAP-Kinasen

Nach Infiltration zu testender Substanzen in fünf bis sechs Wochen alte *A. thaliana* Pflanzen wurden die Blätter in flüssigem Stickstoff eingefroren und in 100 µl Extraktionspuffer [50 mM Tris/HCl pH 7,5, Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche), PhosStop Phosphatase Inhibitor Cocktail (Roche)] homogenisiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation bei 10.000g bei 4°C für 20 min abgetrennt. Der Proteingehalt des Überstandes wurde bestimmt (2.2.2.4) und 10 – 15 µg Protein mittels SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.2.1). Anschließend wurden aktivierte *A. thaliana* MAP Kinasen MPK3 und MPK6 durch Immunoblot (2.2.2.7) mit Hilfe von anti-phospho-p24/p44 MAP Kinase Antikörpern (Cell Signaling Technology) entsprechend den Angaben des Herstellers als primäre Antikörper detektiert.

2.2.3.5 Bestimmung von Kallosebildung

Von fünf bis sechs Wochen alten *A. thaliana* Pflanzen wurden die Blätter halbseitig mit den zu testenden Substanzen infiltriert. Die uninfiltrierte Blatthälfte diente zur späteren Kontrolle des Grundzustandes der Blätter. Nach 24 h wurden die Blätter geerntet und über Nacht in Fixierlösung (1% (v/v) Glutaraldehyd, 5 mM Zitronensäure, 90 mM Na₂HPO₄, pH7.4) inkubiert. Danach wurden die Blätter

durch mehrmaliges Inkubieren in Ethanol entfärbt. Vor der eigentlichen Färbung wurden die Blätter für 15 – 30 Minuten in 50 % (v/v) Ethanol und anschließend für 15 – 30 Minuten 67 mM K_2HPO_4 , pH 12 inkubiert. Kalloseauflagerungen wurden dann mit 0,1 % (w/v) Anilin-Blau in 67 mM K_2HPO_4 , pH12 für 1 h bei Raumtemperatur angefärbt. Nach dem Überführen der gefärbten Blätter wurde eventuelle Kallosebildung mit dem Epifluoreszenzmikroskop Eclipse 80i (Nikon) bei UV-Licht überprüft. (Protokol adaptiert nach Gomez-Gomez et al., 1999, Veit et al., 2001, Sohn et al., 2007)

2.2.3.6 Detektierung reaktiver Sauerstoffspezies

Die Blätter fünf bis sechs Wochen alter *A. thaliana*-Pflanzen wurden in ~ 0,2 x 0,2 cm große Stücke geschnitten und über Nacht in Aqua dest. bei Raumtemperatur inkubiert. Am folgenden Tag wurden pro Well einer weißen Mikrotiterplatte 10 μ l des Luminol/Peroxidase-Mastermix (0,2 mM Luminol L-012; 0,02 mg/ml Meerrettich-Peroxidase) mit 90 μ l Aqua dest. gemischt und jeweils ein Blattstück dazugegeben. Nach Zugabe der zu testenden Substanzen wurden die Ansätze mit einem Centro LB 960 (Berthold Technologies) und der Software MikroWin analysiert. Die Lichtemmission wurde als relative Lichteinheiten (RLU – *relative light units*) gemessen.

3. Ergebnisse

Die angeborene Immunität der Pflanzen beruht partiell auf der Erkennung mikrobe-assoziierten molekularer Muster (microbe associated molecular patterns, MAMPs) durch pflanzliche Mustererkennungsrezeptoren (pattern recognition receptors, PRRs). Zum besseren Verständnis der pflanzlichen Immunität ist es wichtig, viele dieser molekularen Muster und ihre Rezeptoren zu identifizieren und die Rezeptor-Ligand-Paare zu charakterisieren. Chitin ist bereits seit längerem als MAMP in Pflanzen bekannt (Felix et al., 1993). Vor kurzem konnte zudem durch Kristallisationsexperimente gezeigt werden, dass der Chitinrezeptor in *A. thaliana* AtCERK1 durch die Bindung von Chitin homodimerisiert und dass diese Dimerisierung essentiell für die Weiterleitung des Signals ist (Liu et al., 2012). Desweiteren bilden Flagellin zusammen mit seinem Rezeptor FLAGELLIN-SENSING 2 (FLS2) und der bakterielle Elongationsfaktor Tu, EF-Tu, zusammen mit dem EF-Tu-Rezeptor EFR gut untersuchte Paare mikrobe-assoziierten molekularer Muster und ihrer Erkennungsrezeptoren.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung eines proteinogenen MAMPs. Quelle der Untersuchungen war das Gram-negative Bakterium *Ralstonia solanacearum* [GMI 1000]. Aufgrund seines großen Wirtspflanzenkreises bei gleichzeitiger Spezifität der einzelnen Kultivare in Bezug auf Wirte und geographische Verbreitung war es geeignet für die Identifizierung neuer immunogener Proteine (Salanoubat et al., 2002). Zudem konnte in *R. solanacearum* bereits eine proteinbasierte Elicitoraktivität nachgewiesen werden, die nicht auf Flagellin zurückzuführen ist (Pfund et al., 2004).

Zur Identifizierung und Charakterisierung eines immunstimulierenden Proteins wurden Proteinextrakte aus *Ralstonia solanacearum* hergestellt und mittels verschiedener säulenchromatographischer Methoden aufgereinigt.

3.1 *Ralstonia solanacearum* enthält einen hitzestabilen, proteinogenen Elicitor

Als Ausgangsmaterial für die Suche nach einem Elicitor von *R. solanacearum* dienten zum einen ein aus pelletierten Zellen hergestellter Extrakt (Zellextrakt) und zum anderen die präzipitierten Proteine aus aufgekochten Kulturen von *R. solanacearum* (Kulturextrakt). Ein Teil des Zellextraktes wurde nach seiner Herstellung ebenfalls einer Hitzebehandlung unterzogen mit anschließender Abtrennung ausgefallener Proteine (hitzebehandelter Zellextrakt (siehe 2.2.1.1)).

Um das immunogene Potenzial dieser Grundextrakte ermitteln zu können, wurde anhand einer Konzentrationsreihe die Ethylen induzierende Aktivität bestimmt. Dabei wurden eventuelle kontaminierende Aktivitäten von Flagellin oder dem EF-Tu durch die Verwendung von *A. thaliana fls2 x efr*-Doppelmutanten, die keine Rezeptoren mehr für diese MAMPs besitzen, ausgeschlossen.

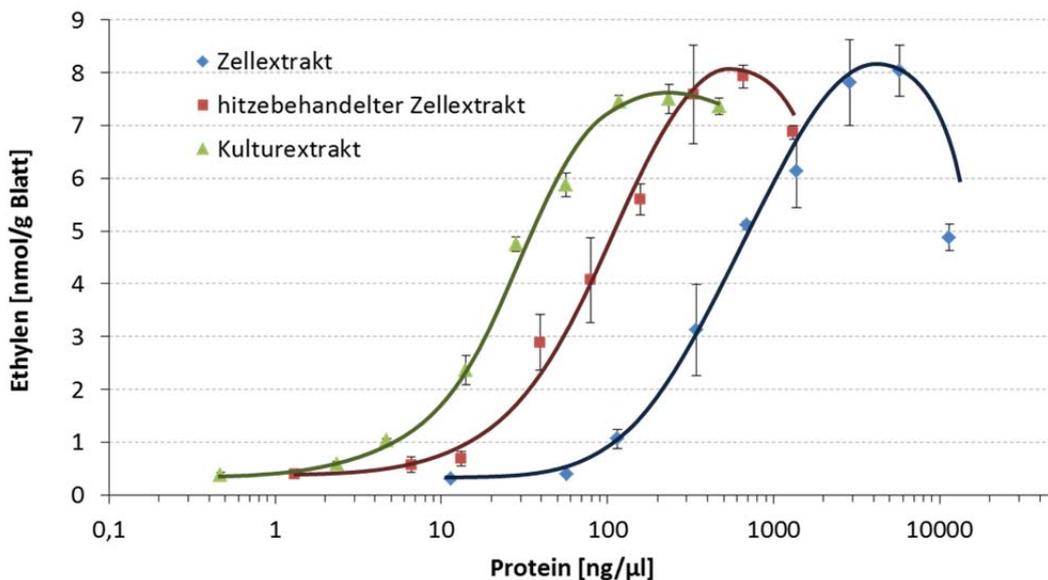


Abbildung 3-1: Ethyleninduktion durch ansteigende Konzentrationen der Extrakte von *R. solanacearum*

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr*-Doppelmutanten wurden mit jeweils ansteigenden Konzentrationen der Extrakte von *R. solanacearum* 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen.

Es zeigte sich, dass die Hitzebehandlung des Zellextraktes im Vergleich zum unbehandelten Extrakt keine Reduktion der Ethyleninduktion nach sich zieht. Desweiteren zeigte der Kulturextrakt ein ebenso großes Potential zur Induktion von Ethylen wie unbehandelter und hitzebehandelter Zellextrakt (Abbildung 3-1). *R. solanacearum* enthält also einen hitzestabilen Elicitor, der in der Folge mit R_{sE} (*R. solanacearum* Elicitor) bezeichnet wird.

Auf der Grundlage dieser Daten konnten zudem die EC₅₀-Werte für die Ethyleninduktion bestimmt werden (Tabelle 3-1). Diese Werte geben die Konzentration an, die nötig ist, um eine 50%-ige Aktivität zu erzielen. Ein Vergleich dieser Werte zeigt, dass durch die Hitzebehandlung des Zellextraktes bereits ein Großteil nichtaktiver Proteine von aktiven getrennt werden kann. Um eine 50%-ige Ethyleninduktion zu erreichen, sind nur noch etwa ein Sechstel der Proteinmenge nötig. Der Kulturextrakt zeigte den niedrigsten EC₅₀-Wert. Hierbei induzieren bereits 4% der Proteinmenge des Zellextraktes bzw. 28% der Proteinmenge des hitzebehandelten Zellextraktes eine 50%ige Ethyleninduktion. Das Verhältnis von aktiven zu nicht aktiven Proteinen sollte bei ihm deshalb noch weiter zu Gunsten aktiver Proteine verschoben sein.

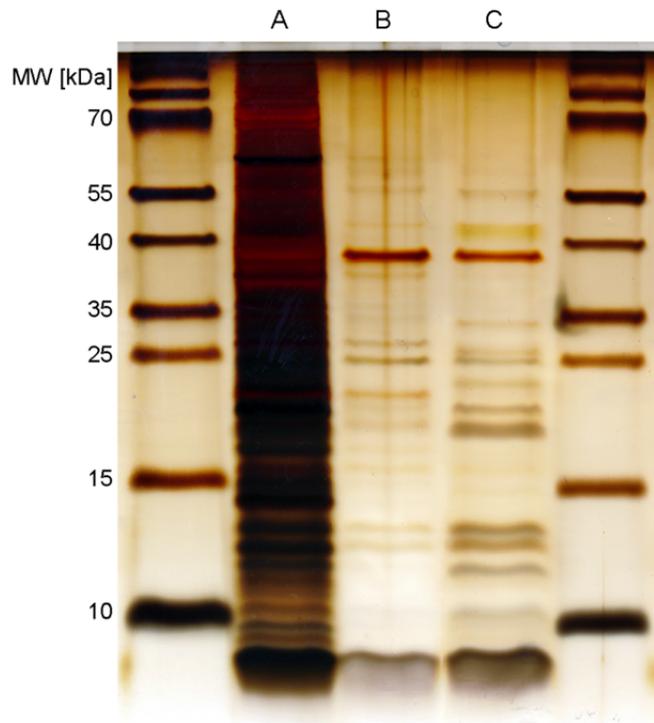
Tabelle 3-1: EC₅₀-Werte der Extrakte von *R. solanacearum*

Extrakt	EC ₅₀ -Wert
unbehandelter Zellextrakt	520 ng/μl
hitzebehandelter Zellextrakt	83 ng/μl
Kulturextrakt	23 ng/μl

Zur Bestimmung der Komplexität der Proteinzusammensetzung wurden die Bestandteile der Extrakte mittels Tricin-SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt und durch anschließende Silberfärbung sichtbar gemacht. Die Proteinprofile des hitzebehandelten Zellextraktes sowie des Kulturextraktes zeigen eine vergleichbare, gegenüber dem unbehandelten Zellextrakt stark herabgesetzte Komplexität (Abbildung 3-2), so wie es die EC_{50} -Werte bereits erwarten ließen.

Abbildung 3-2: Proteinprofil der Extrakte von *R. solanacearum*

Die Proteine von je 2 μ l unbehandeltem (A) sowie hitzebehandeltem Zellextrakt (B) und Kulturextrakt (C) wurden in einer 14%igen Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Silbernitrat angefärbt.



Um zu bestimmen, ob die Elicitor-Aktivität auf ein Protein zurückzuführen ist, wurden der hitzebehandelte Zellextrakt und der Kulturextrakt mit Proteinase K behandelt. Andere Einflüsse auf die Ethylen induzierende Aktivität während des Proteinase K-Verdau wurden durch paralleles Mitführen der jeweiligen Extrakte ohne die Protease bei gleichen Inkubationsbedingungen überprüft.

Wie der Abbildung 3-3 zu entnehmen ist, führte die Behandlung der Extrakte mit Proteinase K zu einer Reduktion der immunogenen Aktivität nahezu auf das Niveau des Hintergrundes. Das Flagellinpeptid flg22, Wasser und Wasser mit Proteinase K zeigten keine Ethyleninduktion in *A. thaliana fls2 x efr*. Die Elicitor-Aktivität in beiden *R. solanacearum* Extrakten ist demnach auf mindestens ein Protein zurückzuführen.

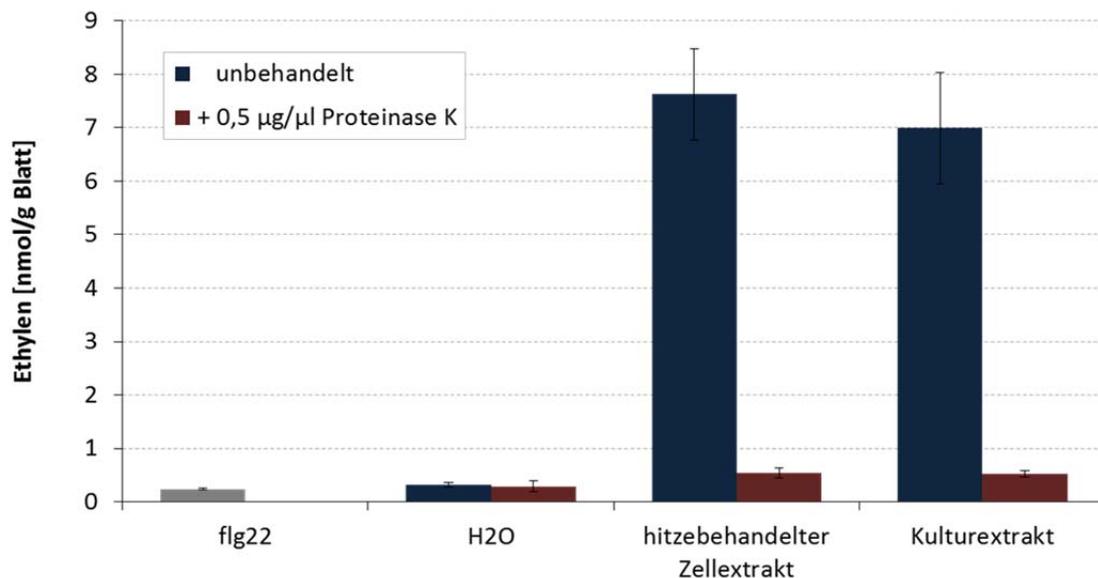


Abbildung 3-3: Reduzierung der Elicitor-Aktivität durch Proteinase K

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit Proteinase K behandelten und unbehandelten Extrakten von *R. solanacearum* 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden das Flagellinpeptid flg22 (1 µM), Wasser, sowie Proteinase K in Wasser mitgeführt.

3.1.1 Säulenchromatographische Reinigung der Proteine des hitzebehandelten Zellextraktes

Alle in der Folge beschriebenen Reinigungsschritte von *R. solanacearum* Proteinen wurden, soweit nicht anders angegeben, mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) durchgeführt. Zur Reinigung und Trennung verschiedener Proteine stellt diese Art der Säulenchromatographie ein besonders gut geeignetes Werkzeug dar. Dabei macht man sich die jeweiligen biochemischen Eigenschaften unterschiedlicher Proteine wie zum Beispiel ihre Ladung bei verschiedenen pH-Werten, ihre Hydrophobizität bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen oder ihre Molekülgröße zunutze. Grundlage der Ionenaustauschchromatographie beispielsweise ist die Häufigkeit und Verteilung der Ladungen der Aminosäureseitenketten der Proteine.

Als ein erster Reinigungsschritt für die Proteine des hitzebehandelten Zellextraktes wurde ein Kationenaustausch bei pH 5,2 gepuffert in 50 mM MES (Puffer A) durchgeführt. Die dazu verwendete Säule war ein starker Kationentauscher vom Typ HiTrap SP FF mit einem Säulenvolumen von 5 ml. Dabei war das primäre Ziel den Grundextrakt von allen neutralen oder negativ geladenen Bestandteilen – in der Mehrheit nicht-proteinogene Moleküle – zu reinigen, da unter den gewählten Chromatographiebedingungen nur positiv geladenen Moleküle, nicht aber neutrale oder negativ geladene an die Kationenaustauschsäule binden. Die Trennung einzelner Proteine war bei dieser ersten Reinigung von untergeordneter Bedeutung. Nach dem Laden der Säule wurden gebundene Proteine durch einen 10 Säulenvolumen (50 ml) langen, linearen Gradienten von 0 bis 100% 50 mM MES, 500 mM KCl, pH 5,2 als Elutionspuffer (Puffer B) eluiert und mit Hilfe eines Fraktionskollektors in 5 ml großen Fraktionen gesammelt. Die erhaltenen Fraktionen wurden dann auf ihre immunogene Aktivität hin untersucht, und die in ihnen enthaltenen Proteine wurden mittels Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und anschließend durch Silberfärbung analysiert. Ethylen induzierende Aktivität war über die Fraktionen 4 bis 10 verteilt, wobei die Fraktionen 7 und 8 die höchste Ethyleninduktion zeigten. In den aktiven Fraktionen wurden die Proteine im Vergleich zum Input deutlich konzentriert, jedoch wurde die Komplexität der Proteinzusammensetzung nicht maßgeblich verringert. Die Trennschärfe der Säule unter den gewählten Laufbedingungen war sehr gering, da sich die eluierten Proteine über die Fraktionen sehr stark überlappen (Abbildung 3-4).

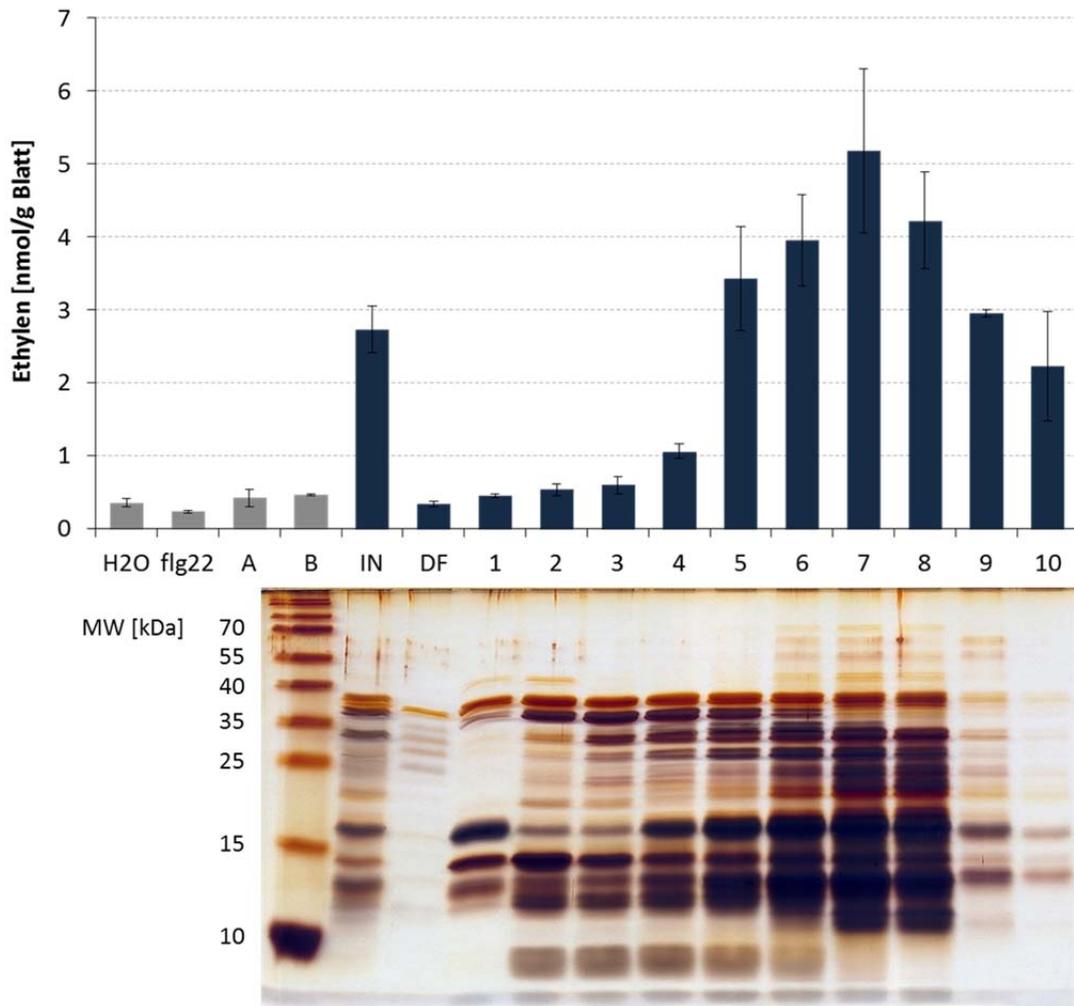


Abbildung 3-4: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der Kationenaustauschchromatographie

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 10 μ l der Kationenaustauschfraktionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M flg22, sowie Lauf- (A) und Elutionspuffer (B) mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 2 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu Input (IN), Durchfluss (DF) und getesteten Fraktionen.

Für einen zweiten säulenchromatographischen Reinigungsschritt wurde mit der Fraktionen 7 ein Anionenaustausch gepuffert mit 50 mM Tris bei pH 8,5 (Puffer A) durchgeführt. Dazu wurde eine HiTrap Q FF-Säule verwendet, ein starker Anionentauscher (Säulenvolumen = 5 ml). Zur Elution des gebundenen Materials wurde ein linearer Gradient mit 50 mM Tris, 500 mM KCl, pH 8,5 (Puffer

B) gewählt, die Länge des Gradienten betrug 35 ml (7 Säulenvolumen). Das Eluat wurde in 1 ml Fraktionen gesammelt.

Die jeweils gewonnenen Fraktionen wurden wieder auf ihre Ethylen-induzierende Aktivität und auf ihre Proteinzusammensetzung hin untersucht. Das Proteinprofil der Fraktionen zeigte erneut eine nur grobe Trennung einzelner Proteine. In der nachfolgenden Aktivitätsüberprüfung konnte jedoch Ethyleninduktion nur im Durchfluss, nicht aber in den gesammelten Fraktionen festgestellt werden (Abbildung 3-5). Der *R. solanacearum* Elicitor (RsE) war bei pH 8,5 nicht negativ geladen, besitzt also einen isoelektrischen Punkt $>$ pH 8,5.

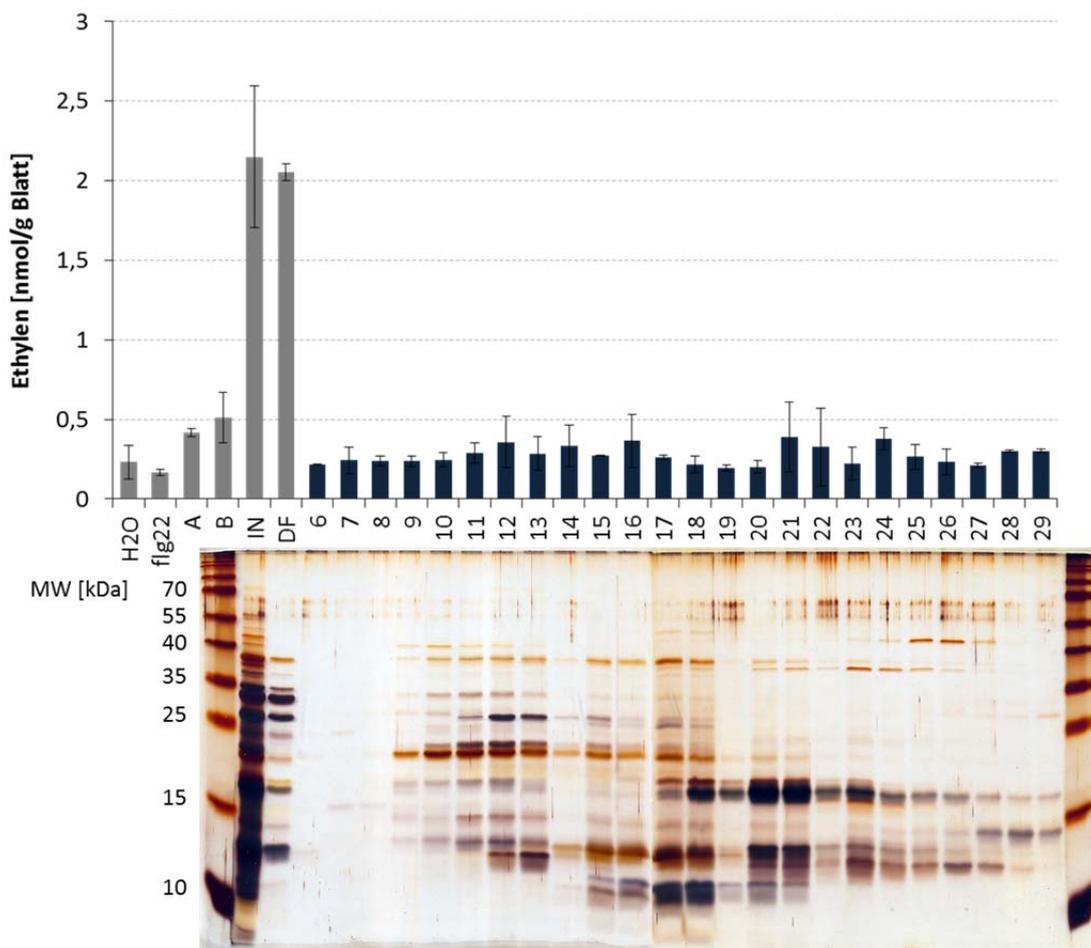


Abbildung 3-5: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 5 μ l der Anionenaustauschfraktionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M flg22, sowie Lauf- (A) und Elutionspuffer (B) mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 2 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu Input (IN), Durchfluss (DF) und getesteten Fraktionen.

Wenngleich Ethylen induzierende Proteine unter den gewählten Chromatographiebedingungen nicht an den Anionentauscher gebunden wurden, so zeigt der Vergleich der Proteinzusammensetzung von geladenem Material und Durchfluss eine deutliche Verringerung der Komplexität. Der Anionenaustausch bei pH 8,5 ist demnach ein gut geeignetes Mittel für die Trennung nicht aktiver Proteine vom gesuchten Elicitor. Für die Reinigung weiteren Materials wurden die oben beschriebenen Methoden der ersten und zweiten chromatographischen Reinigung beibehalten, aber dahingehend geändert, dass nicht mehr mit einem Gradienten sondern jeweils mit einem 100%-Schritt eluiert wurde.

Um die Proteine im Durchfluss des Anionenaustausches bei pH 8,5 weiter aufzureinigen, wurde erneut ein Kationenaustausch bei pH 5,2 durchgeführt. Die dazu verwendete Säule war hierbei jedoch eine im Vergleich zu HiTrap-Säulen besser trennende Kationenaustauschsäule vom Typ Source15S 4,6/100 (GE Healthcare). Die für eine feinere Trennung nötige geringere Beladung der Säule mit Proteinen machte mehrere parallele Läufe notwendig. Die Elutionsprofile aller Läufe zeigte jedoch eine sehr gute Reproduzierbarkeit der einzelnen Chromatographien. Die Elution erfolgte bei allen Durchgängen mittels eines linearen Gradienten von 12 Säulenvolumina Länge (~ 20 ml), und eluiertes Material wurde in 1 ml großen Fraktionen gesammelt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden auf ihre Ethylen induzierende Wirkung hin untersucht und ihre Proteinzusammensetzung mittels SDS-Page mit anschließender Silberfärbung überprüft. Dabei zeigte sich ein breiter Aktivitätsbereich in den Fraktionen 6 bis 11. Das Proteinprofil zeigt bereits eine bessere Trennung einzelner Proteine, wenngleich die Zusammensetzung innerhalb der Fraktionen noch immer komplex ist (Abbildung 3-6). Aus diesem Grund wurden die Fraktion 6 bis 11 einzelner paralleler Kationenaustauschchromatographien für weitere chromatographische Reinigungen miteinander vereint (Abbildung 3-6, roter Rahmen).

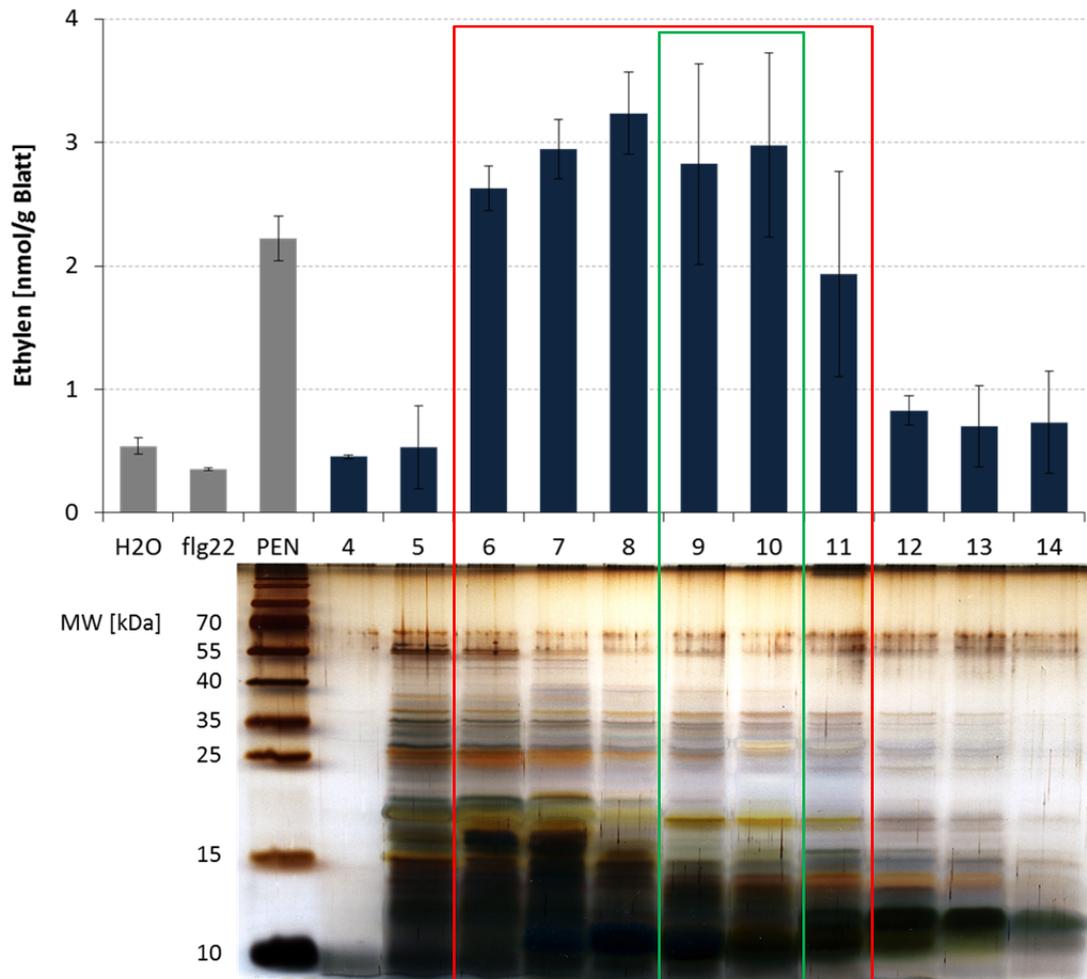


Abbildung 3-6: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Kationenaustausches mit hochauflösender Säule

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 1 μ l der Kationenaustauschfraktionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M elf18 und 90 μ g/ml des Penicillium-Extraktes PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 0,5 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fraktionen. Die Rahmen kennzeichnen die Fraktionen, die für weitere Reinigungen mittels Anionenaustausch und Gelfiltration (roter Rahmen) sowie hydrophober Interaktionschromatographie (grüner Rahmen) miteinander vereint wurden.

Mit einem Teil dieses hochaktiven Pools wurde ein Anionenaustausch bei pH 11,1 gepuffert durch 20 mM 1,3-Diaminopropan (Puffer A) durchgeführt. Die verwendete Säule war eine ResourceQ (GE Healthcare), die ebenfalls eine bessere Trennungskapazität als HiTrap-Säulen besitzt. Gebundenes Material wurde mit einem linearen Gradienten von 30 ml Länge mit 20 mM 1,3-Diaminopropan, 0,5 M KCl, pH 11,1 (Puffer B) eluiert und in Fraktionen von 1 ml gesammelt.

Ein erster Test der Fraktionen zeigte interessanterweise weder in den erhaltenen Fraktionen noch im Durchfluss immunogene Aktivität. Da das geladene Material ebenfalls eine gegenüber dem Pool aus den ursprünglichen Kationenaustauschfraktionen 6 – 11 stark herabgesetzte Aktivität aufwies, wurden alle Fraktionen gegen 25 mM MES, pH 5,2 dialysiert, um die Proteine in einen dem pflanzlichen Milieu näheren pH-Bereich zu überführen. Bei diesem pH zeigten nun sowohl die Anionenaustauschfraktionen als auch das Ausgangsmaterial eine starke Ethyleninduktion. Es kann also festgehalten werden, dass RsE bei pH 11,1 keine oder nur geringe Aktivität besitzt (Abbildung 3-7).

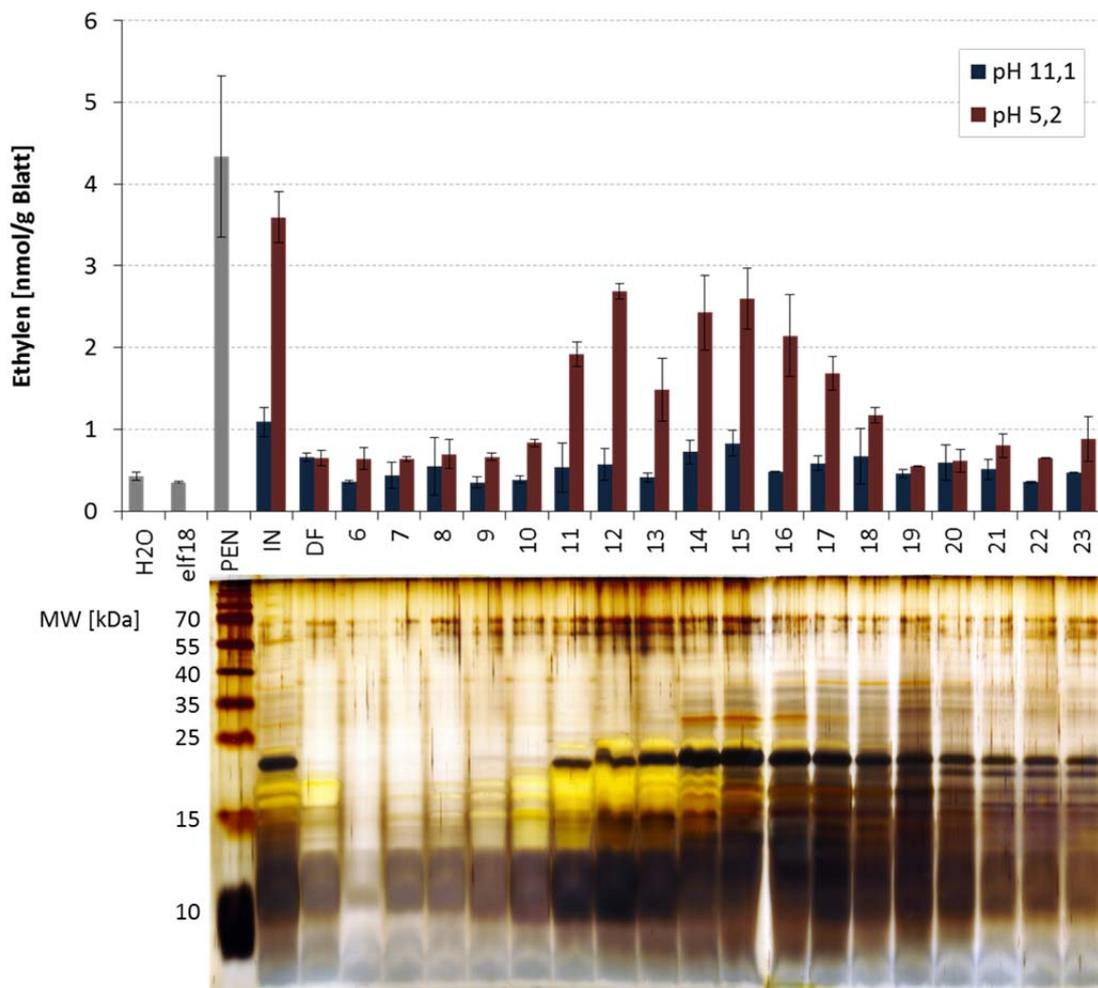


Abbildung 3-7: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen des Anionenaustausches bei pH 11,1

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 10 µl der Fraktionen vor und nach der Dialyse gegen 25 mM MES (pH 5,2) 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM elf18 und 90 µg/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 1 µl durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu Input (IN), Durchfluss (DF) und getesteten Fraktionen.

Mit einem zweiten Teil des Kationenaustauschpools wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Anhand eines Referenzlaufes (nicht gezeigt) mit Molekülen bekannter Größe war es möglich, die Elutionszeit eines Moleküls mit dessen Größe zu korrelieren. Die für den Referenzlauf verwendeten Proteine sowie ihre Retentionszeit sind in der Tabelle 3-2 aufgeführt.

Tabelle 3-2: Übersicht über die für den Referenzlauf verwendeten Proteine

Protein	Größe [kDa]	Elutionspeak [ml]
Dextranblau	2000	45,2
Albumin	66	56,8
Ovalbumin	45	63,8
Chymotrypsin	25	72,6
Ribonuklease A	13,7	80,3

Die Gelfiltration wurde in 50mM MES, pH 6,0, 150 mM KCl als Laufpuffer durchgeführt. Das Chromatogramm zeigt einander überlappende Proteinpeaks, was eine saubere Trennung einzelner Proteine nicht erwarten ließ (Abbildung 3-8).

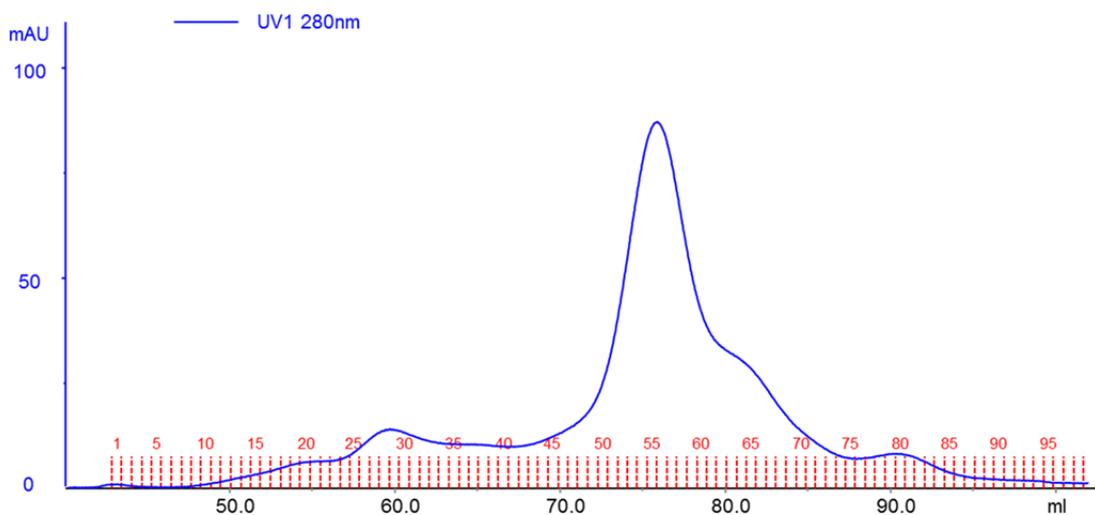


Abbildung 3-8: Chromatogramm der Gelfiltration

Ein Aliquot des Kationenaustauschpools wurde auf eine Gelfiltrationssäule vom Typ HiLoad 16/60-Säule mit Superdex 75 geladen. Eluierte Proteine wurde in 0,6 ml Fraktionen gesammelt.

Die Untersuchung der Fraktionen mittels SDS-Page mit anschließender Silberfärbung zeigte prinzipiell eine gute Trennung von Proteinen nach ihrer Größe. Desweiteren konnte die Komplexität der Proteinzusammensetzung gegenüber dem Ausgangsmaterial nochmals herabgesetzt werden. Bei näherer Betrachtung jedoch wurde die Erwartung aus dem Chromatogramm, dass sich die eluierten Proteine überschneiden, bestätigt (Abbildung 3-9). Unter den gewählten Laufbedingungen und mit der verwendeten Säule konnte also die Methode der Gelfiltration Proteine nur dann gut voneinander trennen, wenn sie einen Unterschied im Molekulargewicht von > 10 kDa aufwiesen, Größenunterschiede < 10 kDa konnten hingegen nur unzureichend voneinander getrennt werden.

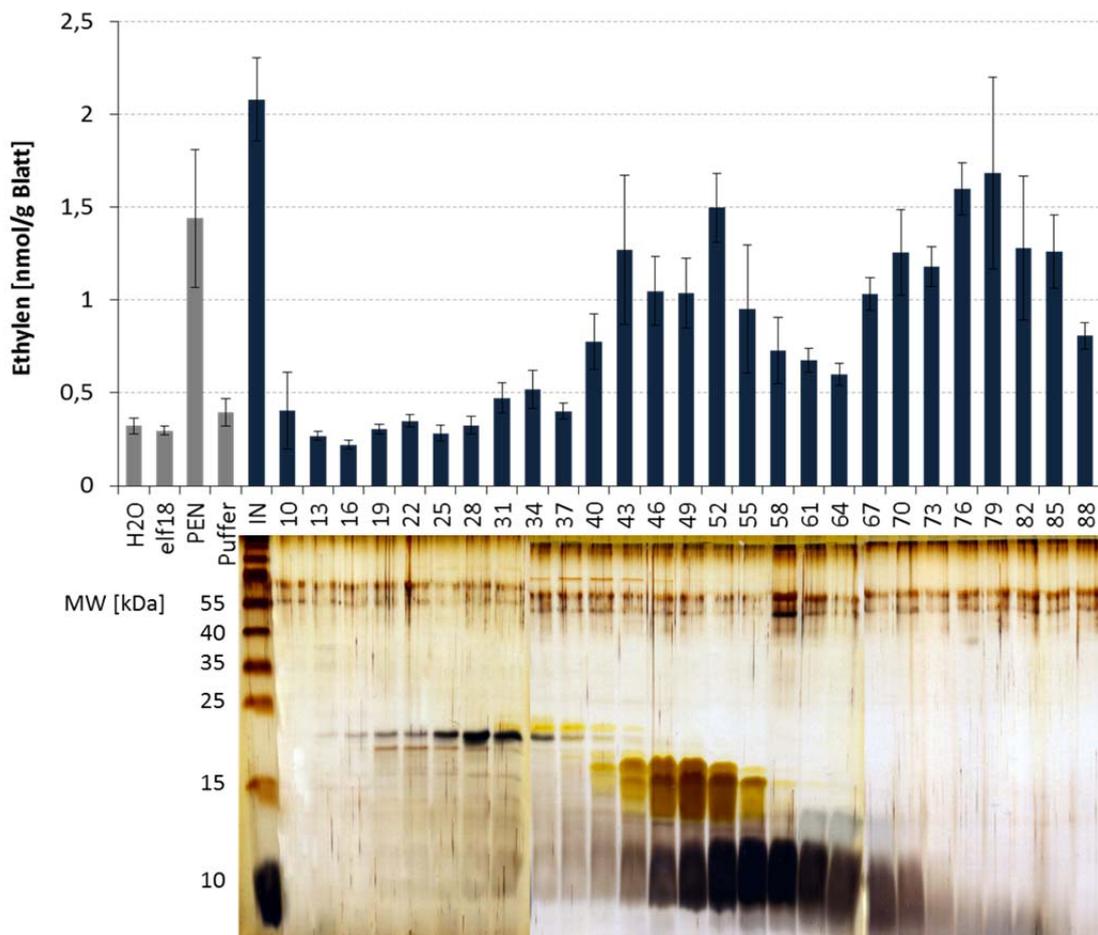


Abbildung 3-9: Ethyleninduktion und Proteinprofil nach Gelfiltration

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 20 μ l der Gelfiltrationsfraktionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M elf18, 90 μ g/ml PEN und Laufpuffer mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 5 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu Input und getesteten Fraktionen.

Die Überprüfung der gewonnenen Fraktionen auf ihre Ethylen induzierende Wirkung ergab zwei Aktivitätsbereiche. Der erste befindet sich zwischen den Fraktionen 43 und 55, die zwischen 68 und 76 ml eluieren. Im Vergleich zu den Referenzproteinen entspricht dies einer Größe von 30 – 20 kDa. Der zweite Teil aktiver Fraktionen eluierte zwischen 83 und 95 ml, was einer Größe von weniger als 13 kDa entspricht (Abbildung 3-9). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein *R. solanacearum* Elicitor zwischen 20 und 30 kDa existiert. Der zweite Aktivitätspeak könnte einen weiteren Elicitor < 13 kDa oder aber Abbauprodukte des ersten repräsentieren.

Für eine andere Methode, die Elicitor-Aktivität weiter zu reinigen, wurden die Fraktionen 9 und 10 eines feintrennenden Kationenaustausches miteinander vereint (Abbildung 3-6, grüner Rahmen). Dieser Pool diente in der Folge als Input für eine Hydrophobe Interaktionschromatographie (HIC) mit einer feintrennenden ReSource Phe (Säulenvolumen 1 ml; GE Healthcare)). Die Chromatographie erfolgte gepuffert in 50 mM MES, 1,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 6,5 (Puffer A). Gebundenes Material wurde mit einem 20 Säulenvolumina langen linearen Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer (50 mM MES, pH 6,5; Puffer B) eluiert und in Fraktionen von je 1 ml gesammelt.

Der *R. solanacearum* Elicitor eluierte unter den gewählten Chromatographiebedingungen sehr spät, bindet also sehr stark an die gewählte Säule. Das Ergebnis lässt darauf schließen, dass der gesuchte Elicitor viele Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten besitzt.

Das Proteinprofil der gesammelten Fraktionen zeigt eine sehr gute Trennung einzelner Proteine. In den Ethylen induzierenden Fraktionen 15 bis 18 ist die Komplexität der Proteinzusammensetzung gegenüber dem auf die Säule geladenen Material stark herabgesetzt (Abbildung 3-10).

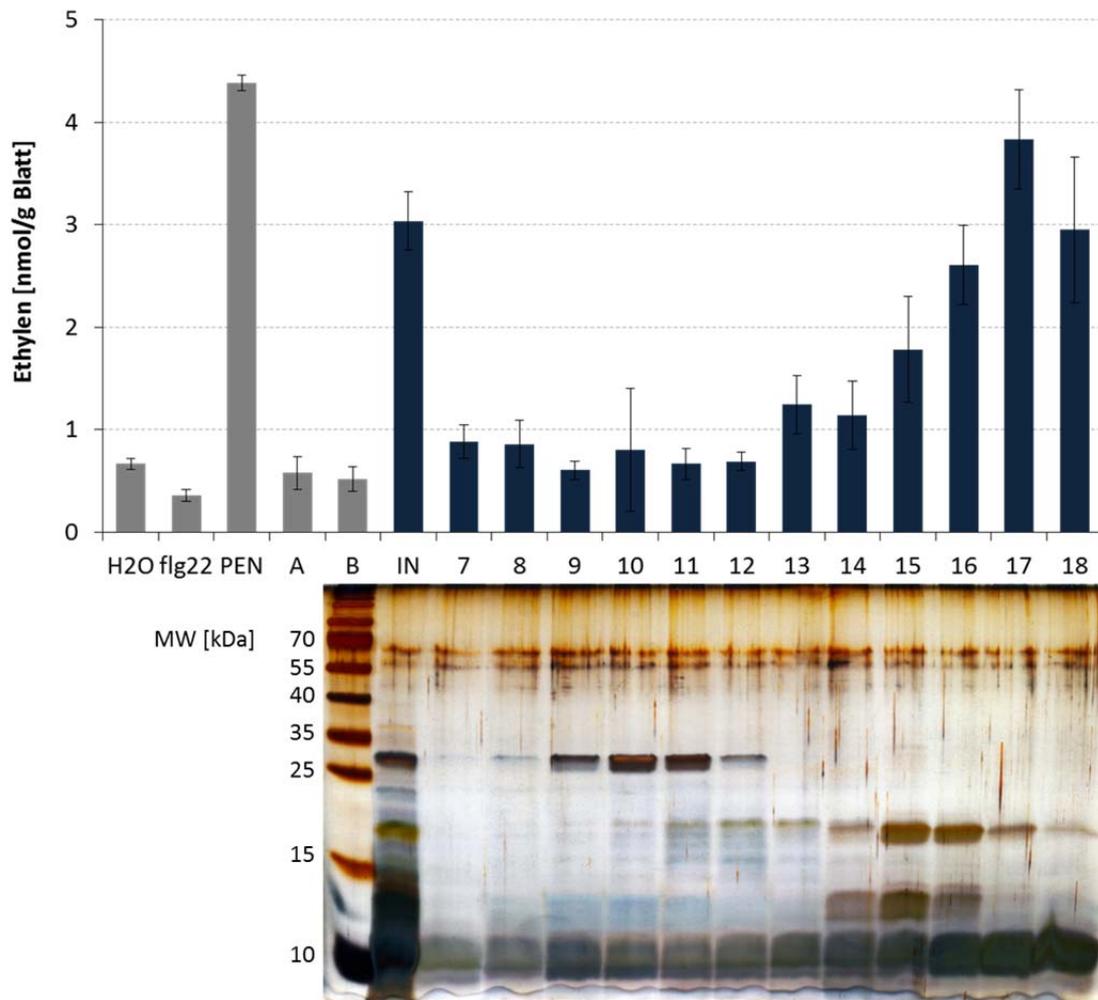


Abbildung 3-10: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Fraktionen der HIC

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 5 μ l der HIC-Fraktionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M flg22, 90 μ g/ml PEN und Lauf- sowie Elutionspuffer mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 2 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fraktionen und zum Input.

3.1.2 Säulenchromatographische Reinigung der Proteine des Kulturextraktes

Aufgrund der Erfahrungen mit den unter 3.1.1 beschriebenen ersten beiden Reinigungsschritten mittels Ionenaustauschchromatographie, wurden diese auch zur Reinigung des Kulturextraktes angewendet. Ein erster Kationenaustausch bei pH 5,2 sollte wiederum lediglich der Konzentration und Reinigung des Startmaterials von allen nicht proteinogenen Bestandteilen dienen. Als ein zweiter Reinigungsschritt wurde das aus dem Kationenaustausch erhaltene Eluat einem Anionenaustausch bei pH 8,5 unterzogen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte hierbei mit einem linearen Gradienten mit einer Länge von 10 Säulenvolumina, wobei das Eluat in Fraktionen von je 1 ml gesammelt wurde.

Die Überprüfung der erhaltenen Fraktionen auf ihre Ethylen induzierende Aktivität bestätigte die unter 3.1.1 gewonnenen Ergebnisse. Wie der Abbildung 3-11 zu entnehmen ist, kann Ethyleninduktion lediglich im Durchfluss, nicht aber in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Der *R. solanacearum* Elicitor bindet bei pH 8,5 nicht an eine Anionenaustauschsäule, besitzt also einen isoelektrischen Punkt über pH 8,5. Die etwas herabgesetzte Aktivität des Durchflusses gegenüber der des geladenen Materials lässt sich auf Verdünnungseffekte durch den Chromatographielauf zurückführen. Im Vergleich zu dem geladenen Material zeigt der Durchfluss jedoch eine deutlich herabgesetzte Proteinzusammensetzung (Abbildung 3-11). Das Reinigungspotenzial des Anionenaustausches bei pH 8,5 kann auch für die Proteine des Kulturextraktes als hoch angesehen werden, weswegen dieser Schritt für weitere Reinigungswiederholungen beibehalten wurde. Auf eine Elution mit einem linearen Gradienten wurde in der Folge allerdings verzichtet. Stattdessen wurde gebundenes Material mit einem 100 %-Schritt eluiert, da es für weitere Reinigungsschritte nicht mehr benötigt wurde.

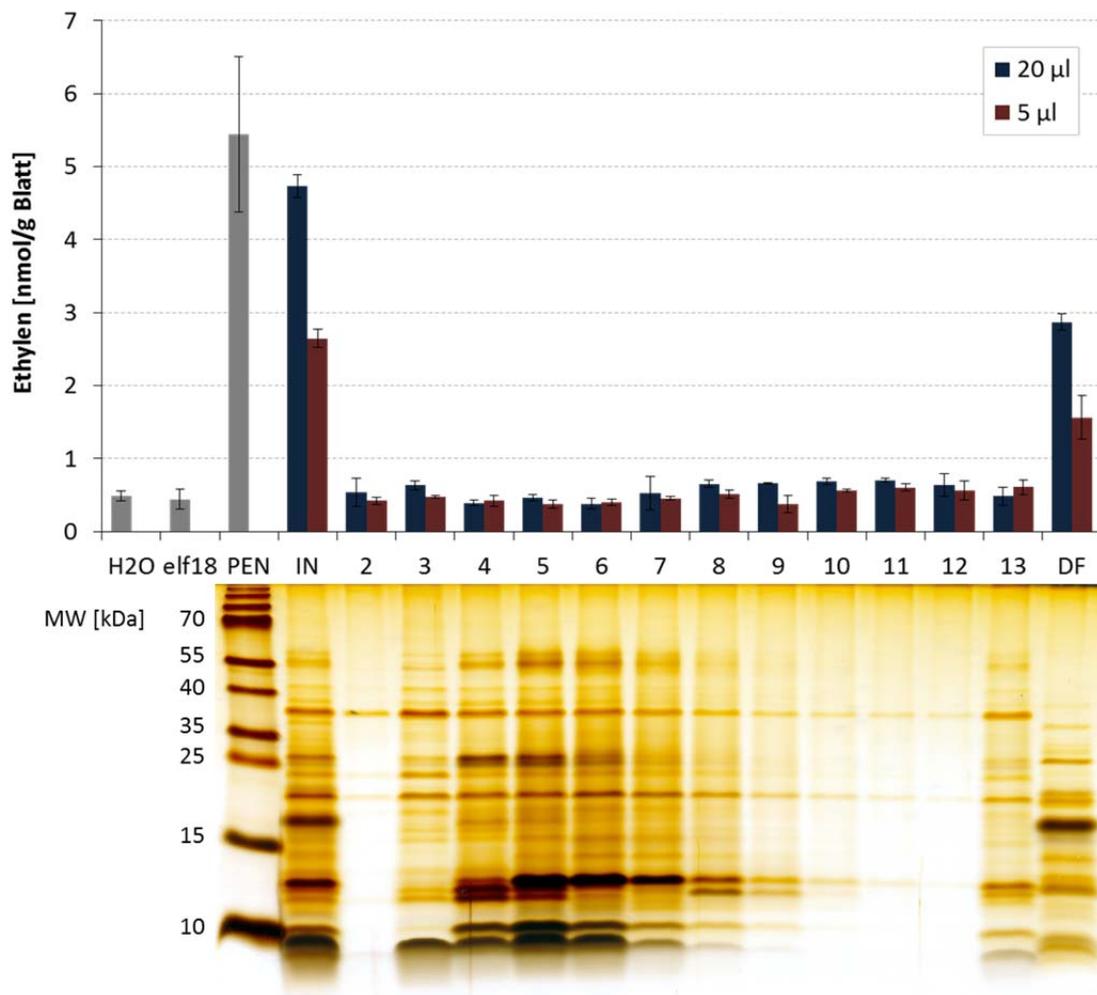


Abbildung 3-11: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Anionenaustauschchromatographie

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit den angegebenen Mengen des Inputs, der Fraktionen und des Durchflusses des 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM elf18 und 90 µg/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 2 µl durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu Input (IN), getesteten Fraktionen und Durchfluss (DF).

Für die weitere Trennung des im Durchfluss des Anionenaustausches bei pH 8,5 enthaltenen *R. solanacearum* Elicitors von nicht immunogenen Proteinen wurde ein Kationenaustausch bei pH 5,2 gepuffert in 50 mM MES (Puffer A) mit einer feintrennenden Säule vom Typ Source15S 4,6/100 durchgeführt. Gebundenes Material wurde mit einem linearen Gradienten von 0 – 100% Elutionspuffer (50 mM MES, 500 mM KCl, pH 5,2; Puffer B) mit einer Länge von 10 Säulenvolumina (~ 16 ml) eluiert. Das Eluat wurde in je 500 µl großen

Fraktionen gesammelt und auf Ethylen induzierende Aktivität hin untersucht. Der Grad der Reinigung bzw. der Grad der Trennung der aktiven von nicht aktiven Proteinen wurde mittels Silberfärbung nach Größentrennung der Proteine in Tricin-SDS-Polyacrylamidgelen sichtbar gemacht. Um die Trennungseigenschaften der Säule optimal zu nutzen, wurde jeweils nur etwa 1/3 der Ladekapazität an Proteinen geladen, was mehrere parallele Läufe mit Aliquots des Durchflusses des Anionenaustausches zur Folge hatte.

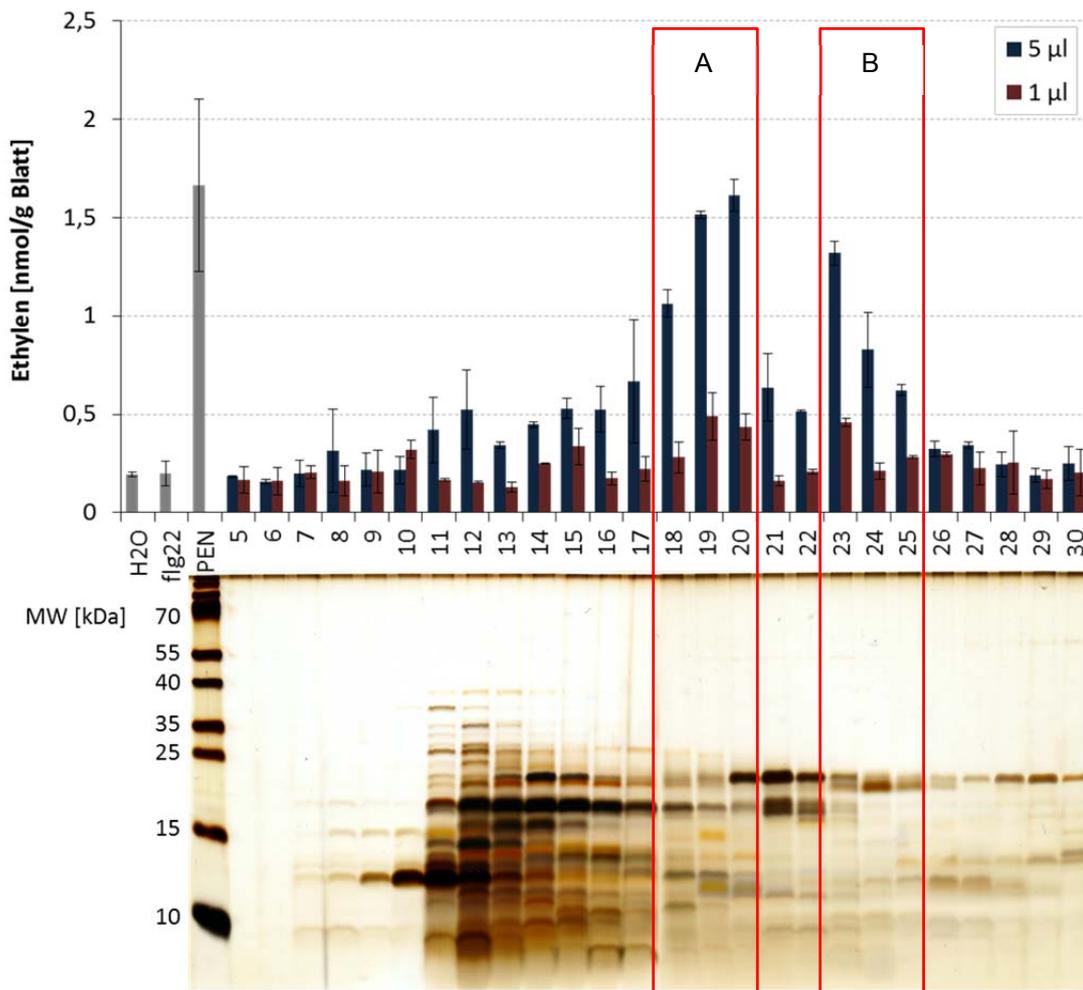


Abbildung 3-12: Ethyleninduktion und Proteinprofil nach hochauflösendem Kationenaustausch

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit den angegebenen Volumina 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM flg22 und 90 µg/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 1 µl durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fraktionen. Die Fraktionen 18 – 20 (Pool A) und 23 – 25 (Pool B) wurden für die nachfolgenden Rechromatographien A und B vereinigt (rote Rahmen).

Die Auswertung der Läufe zeigte Ethylen induzierende Aktivität erst in den spät eluierten Fraktionen. Ein Großteil nicht aktiver Proteine, enthalten in den Fraktionen 9 – 16, konnte mit dieser Säule und unter den gewählten Laufbedingungen von aktiven in den Fraktionen 17 – 26 getrennt werden. Das Proteinprofil der aktiven Fraktionen zeigt gegenüber dem der nicht aktiven Fraktionen eine deutlich herabgesetzte Komplexität. Zudem spalten sich die aktiven Proteine in zwei Aktivitätspeaks um die Fraktionen 17 – 20 und 23 – 25 auf (Abbildung 3-12).

Im Anschluss an diesen Kationenaustausch wurde versucht, die beiden Aktivitätspeaks vollends voneinander zu trennen. Dazu wurden von allen parallelen Läufen jeweils die Fraktionen 18 bis 20 miteinander vereint (Pool A). Mit den Fraktionen des zweiten Aktivitätpeaks, die Fraktionen 23 bis 25, wurde auf gleiche Weise verfahren (Pool B). Beide Pools wurden nun separat einem erneuten Kationenaustausch bei gleichen Laufbedingungen unterzogen. Im Folgenden werden die separaten Läufe jeweils als Rechromatographie A beziehungsweise Rechromatographie B bezeichnet. Durch die geringe Beladung der Säule mit einem unkomplexen Proteinmix wird die gegenseitige Beeinflussung der Proteine beim Ablösen von der Säule deutlich herabgesetzt und nur gleiche Proteine eluieren zusammen, was die Reinheit der Fraktionen weiter erhöhen sollte.

Nach der Auftrennung der in den Fraktionen enthaltenen Proteine nach ihrer Größe im Tricin-SDS-Polyacrylamidgel mit anschließender Silberfärbung zeigte sich ein Proteinprofil, das gegenüber dem vorherigen Kationenaustausch mit dem Durchfluss des Anionenaustausches eine nochmals deutlich gesteigerte Reinheit aufwies (Abbildung 3-13).

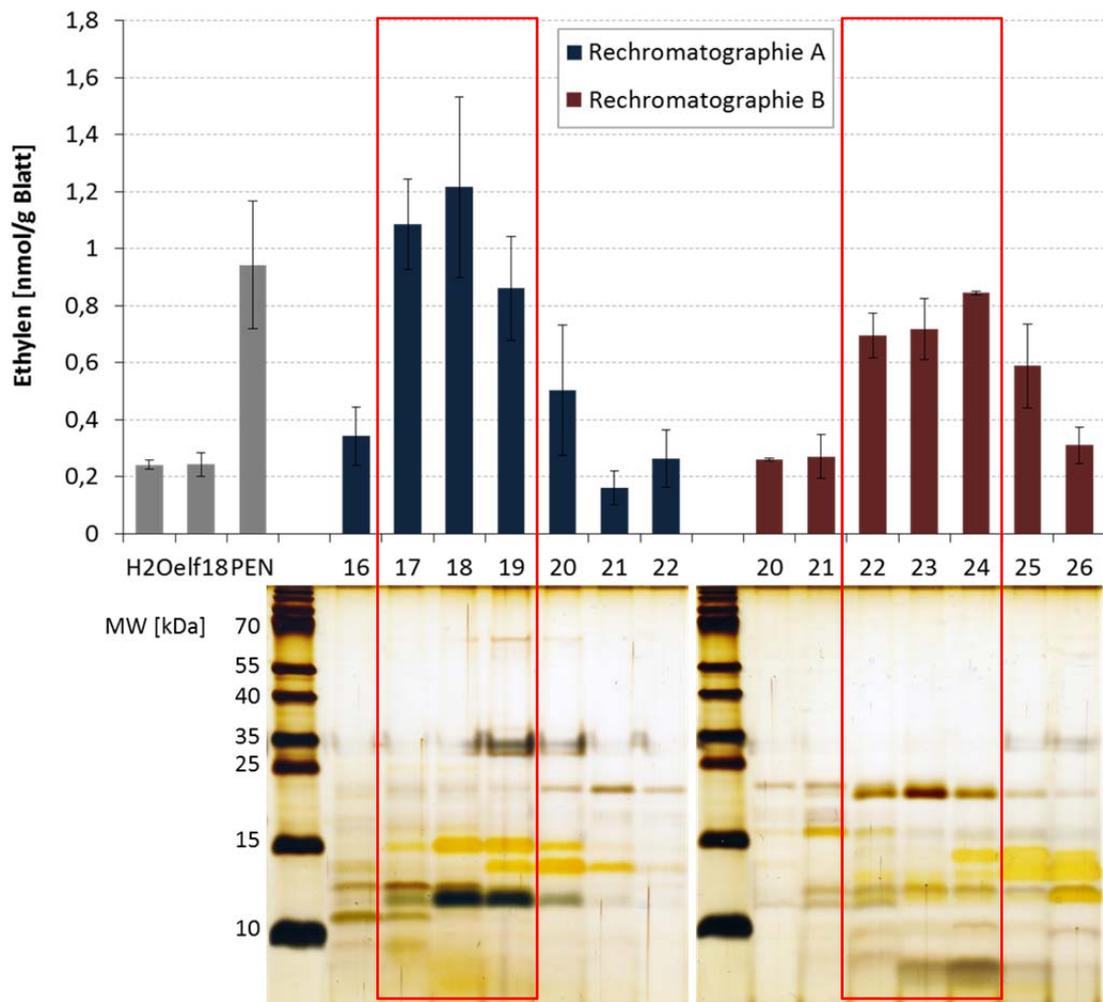


Abbildung 3-13: Ethyleninduktion und Proteinprofil der Rechromatographie von Pool A und Pool B

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 1 μ l der Rechromatografiefractionen 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M elf18 und 90 μ g/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 1 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fractionen. Der rote Rahmen bezeichnet jeweils die für die spätere Charakterisierung (siehe 3.3.2) vereinigten Fractionen der Elicitoraktivitäten A und B (RsE-A und RsE-B).

Unter 3.1.1 konnte bereits gezeigt werden, das RsE bei pH 11,1 an Anionentauscher bindet. Die nach den Rechromatographien A und B erhaltenen aktiven Fraktionen wurden nun separat einem Anionenaustausch bei pH 11,1 unterzogen. Als Input des ersten Laufes, als Anionenaustausch A bezeichnet, diente die Fraktion 18 der Rechromatographie A, ein zweiter Lauf (Anionenaustausch B) wurde mit den zuvor vereinten Fraktionen 22 und 23 der Rechromatographie B durchgeführt (siehe Abbildung 3-13). Als Puffersystem für beide Läufe wurde 20 mM 1,3-Diaminopropan, pH 11,1 (Puffer A) gewählt. Die verwendete Anionenaustauschsäule war eine Source15Q 4,6/100 (GE Healthcare). Gebundenes Material wurde mit einem linearen Gradient von der Länge von 10 Säulenvolumina (~16 ml) mit 20 mM 1,3-Diaminopropan, 0,5 M KCl, pH 11,1 (Puffer B) eluiert und in Fraktionen von je 500 µl gesammelt.

Die erhaltenen Fraktionen wurden dann auf ihre Ethylen induzierende Aktivität und ihre Proteinzusammensetzung hin überprüft. Die Fraktionen zeigten, wie schon bei den Proteinen des Zellextraktes, bei pH 11,1 keinerlei über den Hintergrund hinausgehende Ethyleninduktion (nicht gezeigt). Erst nach Dialyse gegen 25 mM MES, pH 6 konnte Aktivität gemessen werden. Der *R. solanacearum* Elicitor besitzt demnach keine immunogene Wirkung, wenn er negativ geladen ist. Wird der isoelektrische Punkt jedoch unterschritten, induziert er die Bildung von Ethylen in *A. thaliana*.

Die Fraktion 11 des Anionenaustausches A zeigte die stärkste Ethyleninduktion. Die Reinheit dieser Fraktion konnte im Vergleich zur aktiven Fraktion 18 der Rechromatographie A nochmals erhöht werden (Abbildung 3-14).

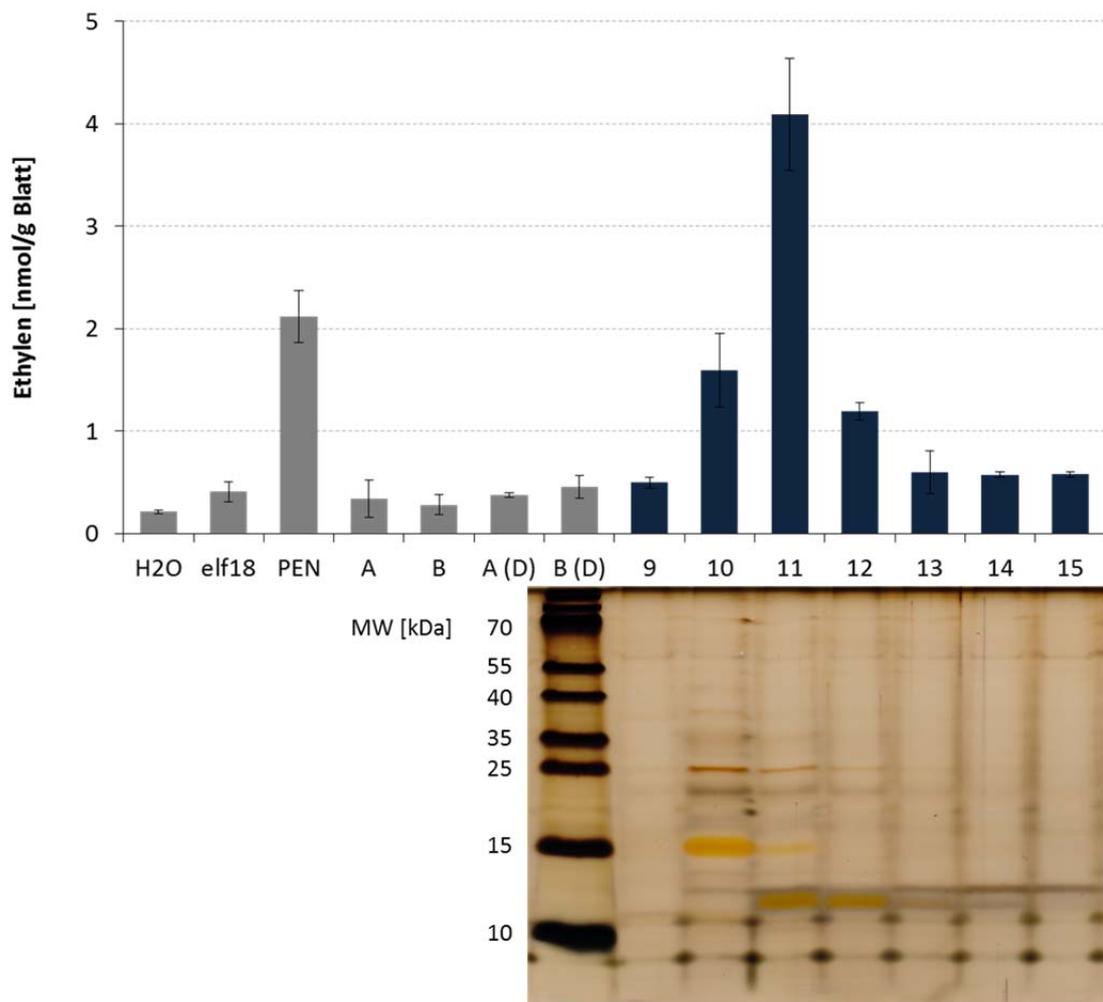


Abbildung 3-14: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Anionenaustausches A

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 1 μ l der Fraktionen des Anionenaustausches A 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M elf18 und 90 μ g/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricin-SDS-PAGE wurde mit je 1 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fraktionen.

Der Anionenaustausch B mit den vereinigten Fraktionen 22 und 23 der Rechromatographie B wies die stärkste Ethyleninduktion in Fraktion 10. Das nach Tricin-SDS-Page mit Silbernitrat gefärbte Gel zeigte in dieser Fraktion einen ebenfalls sehr hohen Reinheitsgrad (Abbildung 3-15).

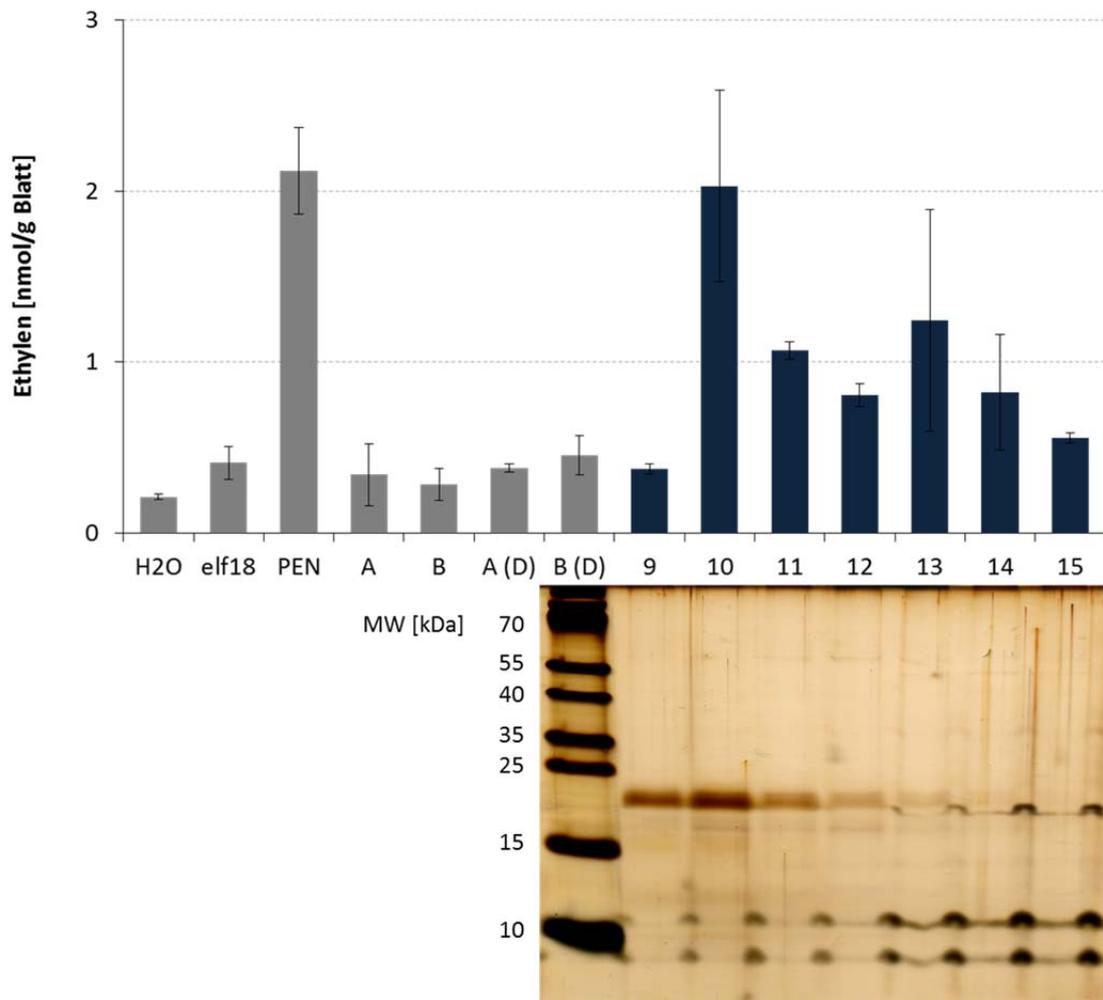


Abbildung 3-15: Ethyleninduktion und Proteinprofil des Anionenaustausches B

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils 1 μ l der Fraktionen des Anionenaustausches B 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M elf18 und 90 μ g/ml PEN mitgeführt. Die mit Silber gefärbte Tricine-SDS-PAGE wurde mit je 1 μ l durchgeführt und zeigt die Proteinzusammensetzung korrespondierend zu den getesteten Fraktionen.

3.1.3 Quantitative Auswertung der Reinigung

R. solanacearum besitzt 5129 proteincodierende Gene, die sich auf ein Chromosom (3448 Gene) und ein Megaplasmid (1681 Gene) verteilen (Salanoubat et al., 2002). Durch die Hitzebehandlung bei der Herstellung der beiden Ausgangsextrakte kann davon ausgegangen werden, dass sowohl hitzebehandelter Zellextrakt als auch der Kulturextrakt deutlich weniger als 5000 Proteinentitäten enthielten. Durch Messung des Proteingehaltes konnte im Fall des Zellextraktes eine Abnahme der Proteinmenge um ca. 90% bedingt durch die Hitzebehandlung festgestellt werden. Der Schritt der Hitzedenaturierung ist hierbei also bereits eine erste, sehr effiziente Reinigungsstufe zur Isolierung des *R. solanacearum* Elicitors.

Die nachfolgenden Tabellen geben eine Übersicht über die durch die jeweiligen Reinigungsschritte erhaltenen Restmengen an Proteinen in aktiven und inaktiven Fraktionen. In der letzten Spalte ist der residuale Proteingehalt der aktiven Fraktionen bezogen auf das Startmaterial angegeben.

Demnach konnten je nach letzter angewendeter Reinigungsmethode 98 – 99,8 % nicht aktive Proteine des Zellextraktes von aktiven getrennt werden (Tabelle 3-3). Die Gelfiltration als letzter Reinigungsschritt konnte die Zahl der verbliebenen Proteine im zweiten Aktivitätspeak am deutlichsten auf nur noch 0,24 % der Menge des Startmaterials senken. Das Proteinprofil dieses Aktivitätspeaks zeigte jedoch nur Proteine < 10 kDa (Abbildung 3-9). Es konnte in diesem Fall nicht bestimmt werden, ob die Ethylen induzierende Aktivität von einem nativen Protein oder aber von Abbauprodukten des gesuchten Elicitors hervorgerufen wurde. Für die spätere Bestimmung der in aktiven Fraktionen enthaltenen Proteine wurden die Fraktion 52 des ersten Aktivitätspeaks der Gelfiltration (Abbildung 3-9) und die Fraktion 12 des zweiten Anionenaustausches (Abbildung 3-7) gewählt (siehe 3.2.1).

Neben der Gelfiltration zeigte die hydrophobe Interaktionschromatographie eine besonders gute Reinigungseffizienz. Durch sie als letzten Reinigungsschritt konnte die Proteinmenge in den immunogen aktiven Fraktionen auf rund 1 % der Proteinmenge des Zellextraktes bzw. rund 10 % des hitzebehandelten Zellextraktes reduziert werden.

Der Anionenaustausch bei pH 11,1 konnte die Reinheit gegenüber dem Pool der aktiven Fraktionen des feintrennenden Kationenaustausches nur geringfügig ändern. Die Ethylen induzierende Aktivität verteilt sich über mehrere, sich in ihrem Proteinprofil recht stark ähnelnde Fraktionen (Abbildung 3-7).

Tabelle 3-3: Proteingehalte in aktiven und nicht aktiven Fraktionen des Zellextraktes nach einzelnen Reinigungsschritten¹

Methode	Proteingehalt nicht aktiver Fraktionen	Proteingehalt aktiver Fraktionen	Residualer Proteingehalt aktiver Fraktionen
Hitzebehandlung	90 %	10 %	10 %
1. KAC (100% Elution)	< 1 %	> 99%	10 % (100 %)
1. AAC	55%	45 %	4,5 % (45 %)
2. KAC	40 %	60 %	2,7 % (27 %)
Vereinigte aktive Fraktionen dienten als Input für:			
A) 2. AAC	35 %	65 %	1,76 % (17,6)
B) Gelfiltration	Peak 1 32 %	68 %	1,84 % (18,4 %)
	Peak 2 91 %	9 %	0,24 % (2,4 %)
C) HIC	65 %	35 %	0,95 % (9,5 %)

Die gewählten ersten Ionenaustauschchromatographien zeigten für den Kulturextrakt Reinigungseffizienzen, die mit denen für den Zellextrakt vergleichbar sind. Die nach der Rechromatographie A und B erstellten Fraktionsvereinigungen A und B (Abbildung 3-13, rote Rahmen) wiesen einen Proteingehalt auf, der nur noch etwa 6,6 % (Pool A) bzw. 2,66 % (Pool B) der ursprünglichen Proteinmenge des Startmaterials entsprach (Tabelle 3-4). Eine quantitative Bestimmung der Proteingehalte in den Ethylen induzierenden Fraktionen nach den Anionenaustauschchromatographien A und B war aufgrund der zu geringen Konzentration nicht möglich.

¹ Die Proteingehalte aktiver und nicht aktiver Fraktionen ergaben in der Summe nicht immer 100 %. In solchen Fällen wurde dies als Verlust den nicht aktiven Fraktionen zugerechnet.

Tabelle 3-4: Proteingehalte in aktiven und nicht aktiven Fraktionen des Kulturextraktes nach einzelnen Reinigungsschritten²

Methode	Proteingehalt nicht aktiver Fraktionen	Proteingehalt aktiver Fraktionen	Residualer Proteingehalt aktiver Fraktionen
1. Kationenaustausch (100% Elution)	3 %	97 %	97 %
1. Anionenaustausch	50%	50 %	48,5 %
2. Kationenaustausch	77 %	Pool A 16 % Pool B 7 %	Pool A 7,76 % Pool B 3,5 %
Rechromatographie A	15 %	85 %	Pool A 6,6 %
Rechromatographie B	24 %	76 %	Pool B 2,66 %

Um die Effizienz der für den Zellextrakt angewendeten Reinigungsmethoden besser mit denen für den Kulturextrakt vergleichen zu können, sind in der Tabelle 3-3 zusätzlich die residualen Proteingehalte der aktiven Fraktionen bezogen auf die Proteinmenge nach der Hitzebehandlung des Zellextraktes in Klammern angegeben.

Der Vergleich der Proteinrestmengen als Maß der Reinigungseffizienz zeigt, dass der Kulturextrakt das erfolversprechendere Ausgangsmaterial war. Er konnte mit weniger Aufwand in kürzerer Zeit hergestellt werden, und seine Proteinzusammensetzung war in ihrer Komplexität mit der des hitzebehandelten Zellextraktes vergleichbar. Jedoch konnten im Kulturextrakt durch die gewählten säulenschromatographischen Methoden immunogene Proteine in deutlich größerem Maß von nicht immunogenen getrennt werden als beim hitzebehandelten Zellextrakt. Aus diesem Grund wurden für nachfolgende Charakterisierungsexperimente hauptsächlich gereinigte Fraktionen des Kulturextraktes eingesetzt (siehe 3.3).

² siehe ¹

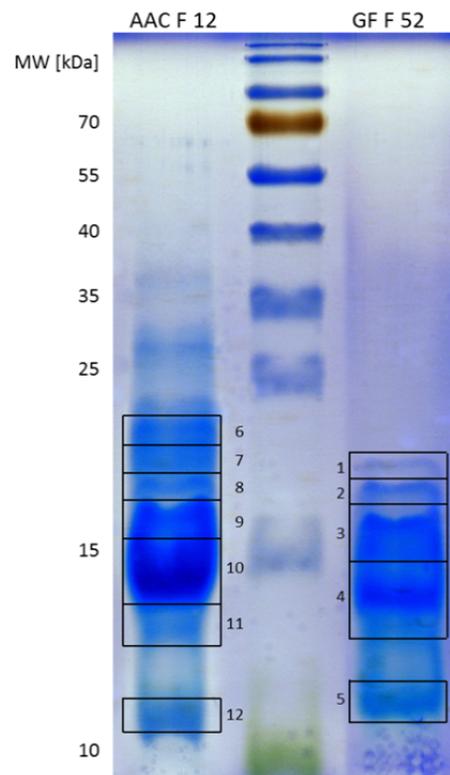
3.2 Potentielle MAMPs von *Ralstonia solanacearum*

3.2.1 Sequenzierung vorgereinigter Proteine des Zellextraktes

Die Komplexität des Zell- und des Kulturextraktes konnte durch die unter 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen chromatographischen Reinigungsschritte deutlich herabgesetzt werden. Um einen Überblick über die noch verbliebenen Zellextraktproteine zu bekommen, wurden die Fraktion 12 des Anionenaustausches bei pH 11,1 (Abbildung 3-7) und die Fraktion 52 des Gelfiltrationslaufes (Abbildung 3-9) mittels Massenfingerabdruck-Analyse untersucht. Dazu wurden Streifen aus einem Coomassiegefärbten Polyacrylamidgel geschnitten und vom Zentrum für Molekulare Medizin in Köln (ZMMK) untersucht (Abbildung 3-16). Aufgrund der Ergebnisse des Gelfiltrationslaufes wurden nur Proteinbanden unterhalb von 25 kDa ausgeschnitten.

Abbildung 3-16: Zur Massenfingerabdruck-Analyse ausgeschnittene Gelbanden der Fraktion 12 der AAC bei pH 11,1 und der Fraktion 52 der Gelfiltration.

Die Proteine der Fraktionen 12 der AAC und der Fraktion 52 der Gelfiltration wurden mittels SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt und danach MS-kompatibel mit Coomassie gefärbt. Die Rahmen kennzeichnen die zur Analyse eingesandten Gelstücke.



In den zur Analyse eingesandten Fraktionen konnten insgesamt 37 Proteine identifiziert werden. Bei der Proteinbestimmung war auffällig, dass einige Proteine in mehreren Banden unterschiedlicher Größe gefunden wurden. Dabei könnten durch Degradation entstandene Abbauprodukte detektiert worden sein. Desweiteren könnte auch eine unzureichende Auftrennung der Proteine gerade im unteren Molekulargewichtsbereich für die mehrmalige Detektion eines

Proteins in Banden verschiedener Massenbereiche verantwortlich sein. Beim Ausschneiden wurde jeweils darauf geachtet, dass zwischen den Schnitten eventuell an der Rasierklinge anhaftende Proteinreste entfernt wurden.

Alle durch Massenfingerabdruck identifizierten Proteine konnten *R. solanacearum* zugeordnet werden. Nach der Identifikation der Proteine in den einzelnen Gelbanden wurde mit allen Sequenzen eine BLAST-Analyse durchgeführt, um den Konservierungsgrad der einzelnen Proteine gegenüber anderen bakteriellen Proteinen zu bestimmen. Die in Tabelle 3-5 gezeigte Auswahl umfasst Proteine, die zum einen in beiden zur Analyse eingesandten Fraktionen enthalten waren und zum anderen in anderen Mikroorganismen stark konservierte Homologe besaßen. Zudem wurden die Anzahl gefundener Peptide und ein isoelektrischer Punkt > pH 8,5 als Kriterien zur Auswahl potentieller MAMPs herangezogen. Die vollständige Liste aller bestimmten Proteine ist im Anhang aufgeführt (Tabelle 7-2).

Tabelle 3-5: Auswahl potentieller MAMPs des hitzebehandelten Zellextraktes

Acc	Protein	Sequenzab- deckung [%]	MW [kDa]	PI	Name
Q8XQR1	lipoprotein signal peptidase	21,1	19,1	9,6	LSP
Q8XXW2	probable signal peptide protein	9,2	19,5	10,2	SPP
Q8XPW8	alanin-rich signal peptide protein	18	17,1	10,3	ARS
Q8XWF3	probable DNA-binding protein HU-beta	78,7	9,8	10,5	HUB
Q8XVK9	50S ribosomal protein L27	55,8	9,0	11,2	L27
Q8Y0Z3	putative outer membrane signal peptide protein	17,9	23,5	10,2	SCON
Q8Y0I6	periplasmatic protease signal peptide protein	19,8	53,0	9,7	PPS

3.2.2 Sequenzierung vorgereinigter Proteine des Kulturextraktes

Die verbliebenen Proteine der Fraktionen A11 und B10 der Anionenaustauschchromatographie bei pH 11,1 des Kulturextraktes wurden nach Größenaufftrennung im Tricin-SDS-Gel ebenso einer Massenfingerringdruck-Analyse unterzogen (Abbildung 3-17). Die dazu aus dem Gel geschnittenen Banden wurden vom Proteom-Zentrum Tübingen analysiert.

Die Analyse ergab insgesamt 36 Proteine, die wiederum nur *R. solanacearum* zugeordnet werden konnten. Bei der Bestimmung der Proteine des aufgereinigten Kulturextraktes wurde erneut eine Vielzahl gleicher Proteine in verschiedenen Banden detektiert, was wahrscheinlich auf Abbau oder Verunreinigungen während des Ausschneidens zurückzuführen ist. Von den 36 bestimmten Proteinen kamen 32 in der Fraktion A11 und 25 in der Fraktion B10 vor, das heißt 11 der Proteine sind nur in Fraktion A11 enthalten und 4 ausschließlich in der Fraktion B10, 21 Proteine sind in beiden enthalten.

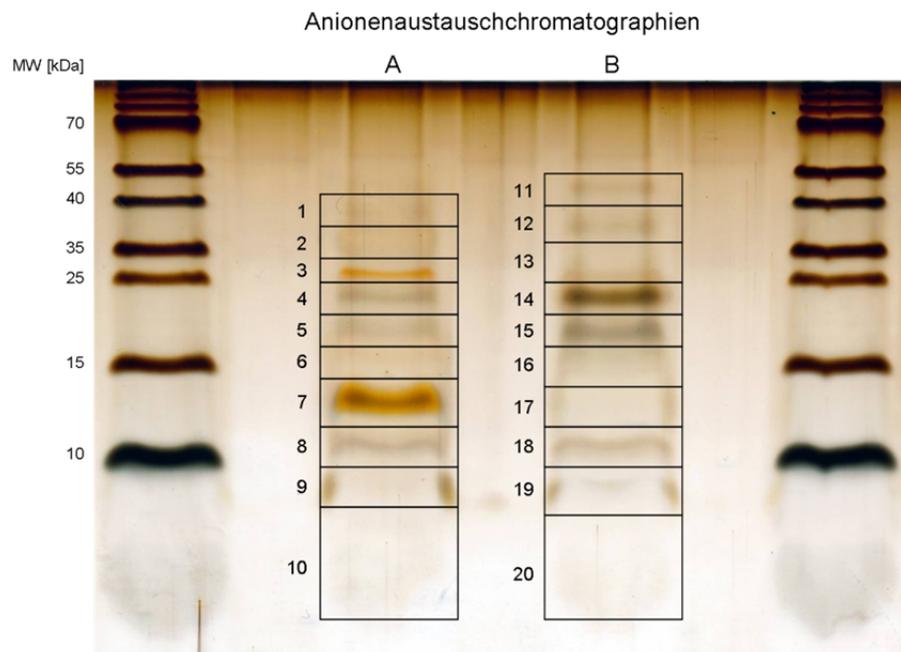


Abbildung 3-17: Zur Massenfingerringdruck-Analyse ausgeschnittene Gelbanden der Fraktionen A11 und B10 der Anionenaustauschchromatographie bei pH 11,1.

Die Proteine der Fraktionen A11 und B10 der Anionenaustauschchromatographien A und B bei pH 11,1 wurden mittels Tricin-SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt und danach MS-kompatibel mit Silbernitrat gefärbt. Die Rahmen kennzeichnen die zur Analyse eingesandten Gelstücke.

Mit den erhaltenen Sequenzen wurde ebenfalls eine BLAST-Analyse durchgeführt. Anschließend wurde eine Auswahl potentieller MAMPs nach den gleichen Kriterien wie unter 3.2.1 getroffen (Tabelle 3-6). Die vollständige Liste der identifizierten Proteine ist im Anhang in der Tabelle 7-3 aufgeführt.

Tabelle 3-6: Auswahl potentieller MAMPs des Kulturextraktes

Acc	Protein	Sequenzab- deckung [%]	MW [kDa]	PI	Name
Q8XXW2	probable signal peptide protein	55,7	19,5	9,51	SPP
Q8XPW8	alanin-rich signal peptide protein	62,9	17,1	9,64	ARS
Q8XWF3	probable DNA-binding protein HU-beta	61,7	9,765	10,5	HUB
Q8Y0Z3	putative outer membrane signal peptide protein	4,6	23,53	9,52	SCON
Q8Y0I6	periplasmic protease signal peptide protein	22,2	53,01	9,18	PPS
Q8XVE8	putative signal peptide protein	44,3	15,4	9,55	PSP

Von der in Tabelle 3-6 gezeigten Auswahl kommen die Proteine SPP, ARS, HUB, SCON, und PPS auch in der Auswahl potentieller MAMPs des Zellextraktes (Tabelle 3-5) vor. Insgesamt wurden 12 Proteine identifiziert, die sowohl in den analysierten Fraktionen des hitzebehandelten Zellextraktes als auch in denen des Kulturextraktes vorkommen.

3.2.3 Klonierung potenzieller MAMPs

Um den *R. solanacearum* Elicitor zu identifizieren, sollten nun die durch Massenfingerabdruck-Analyse identifizierten Proteine (Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6) heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Proteine *probable DNA-binding protein HU-beta* (HUB), *50S ribosomal protein L27* (L27), *putative outer membrane signal peptide protein* (SCON) und *lipoprotein signal peptidase* (LSP) in *E. coli* (Rosetta) exprimiert werden. Die für diese Proteine kodierenden Gensequenzen wurden in den IPTG-induzierbaren Expressionsvektor pET22b kloniert und in den *E. coli* (Rosetta) transformiert.

In der Folge wurden die Zellen der Expressions- und paralleler Leerkulturen geerntet und mit Ultraschall aufgeschlossen. Der durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen gereinigte Zellextrakt konnte daraufhin auf sein Proteinmuster und seine immunogene Aktivität hin untersucht werden. Die Größenzunahme der exprimierten Proteine (Abbildung 3-18) beruht auf zusätzlichen Aminosäuren bis zum C-terminalen His-Tag bedingt durch die Lage des insertierten Gens innerhalb der *multi-cloning-site* des Expressionsvektors.

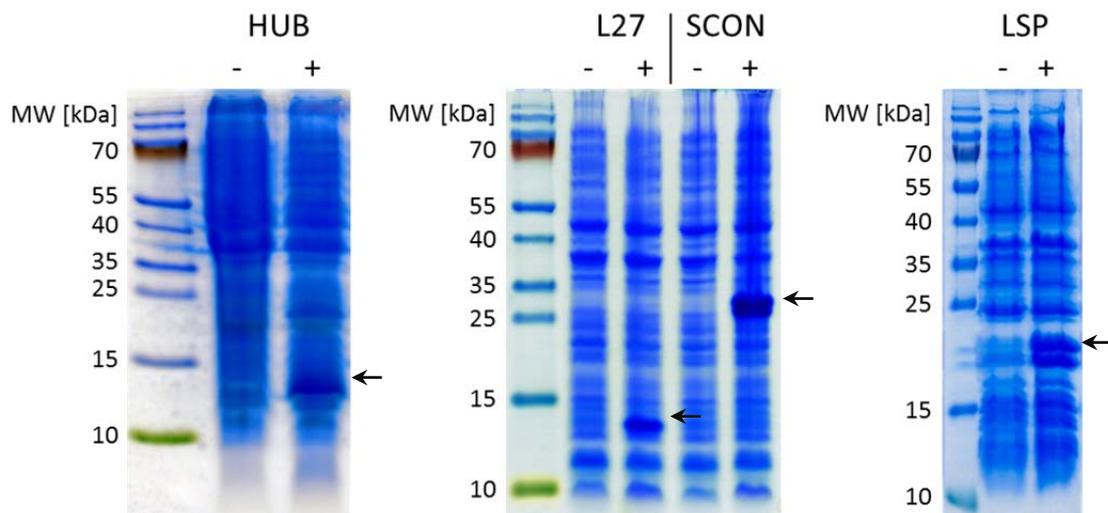


Abbildung 3-18: Expression potentieller MAMPs von *R. solanacearum*

Die mit dem für das jeweilige Protein codierenden Gen transformierten *E. coli* (Rosetta) wurden, nach Expressionsinduktion mit IPTG, für 3 Stunden bei 18 °C inkubiert und danach geerntet. Zur Kontrolle der Expression wurden Proben der jeweiligen transformierten Kulturen (+) und paralleler Leerkulturen (-) nach SDS-Page mit Coomassie gefärbt.

Bei der Untersuchung auf Ethylen induzierende Aktivität zeigte sich jedoch bei keinem der exprimierten Proteine eine Aktivität, die signifikant über die der jeweiligen Leerkontrolle hinausging (Abbildung 3-19).

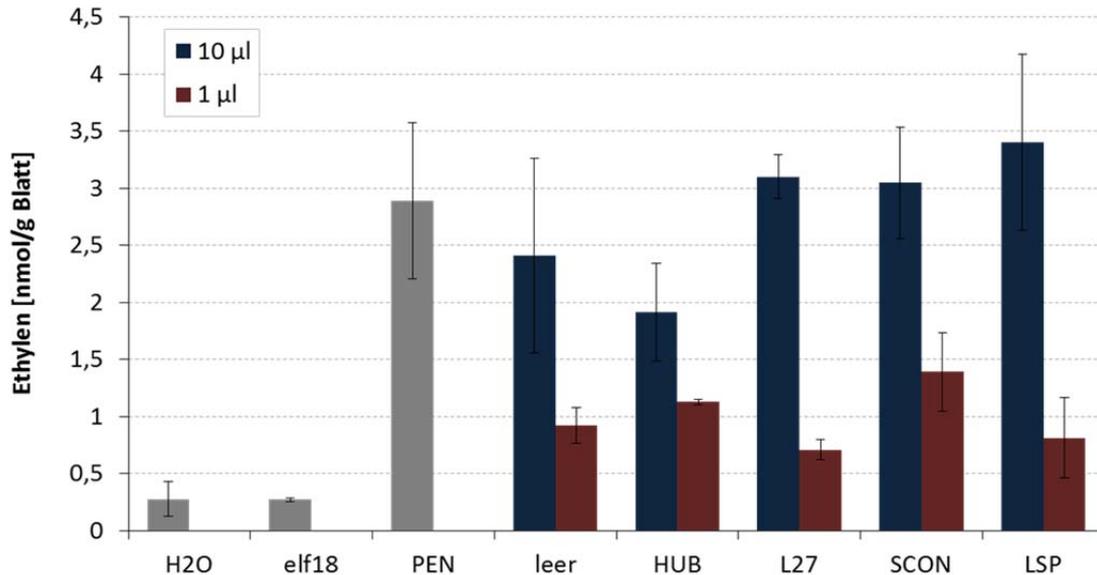


Abbildung 3-19: Ethyleninduktion der exprimierten *R.solanacearum*-Proteine

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit den angegebenen Volumina der jeweiligen Expressionsextrakte 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM elf18 und 90 µg/ml PEN mitgeführt.

Dafür dass keine über den Hintergrund hinausgehende Immunantwort detektiert werden konnte, kommen verschiedene Gründe in Frage. Zunächst einmal könnte keines der vier exprimierten Proteine der gesuchte *R. solanacearum* Elicitor sein. Zum anderen aber könnte das gesuchte MAMP posttranslationale Modifikationen (Glykosylierungen, Acetylierungen oder Lipidreste) besitzen, die in *E. coli* nicht wie in *R. solanacearum* gebildet werden, die aber für die Perzeption durch *A. thaliana* essentiell sind. Dass Glykosylierungen am *R. solanacearum* Elicitor für die Erkennung essentiell sind, kann allerdings durch Deglykosylierungsexperimente so gut wie ausgeschlossen werden (Abbildung 3-32).

3.2.4 Test abgeleiteter Peptide

Von den gut untersuchten MAMPs Flagellin und EF-Tu ist bekannt, dass nur ein kleiner Teil der gesamten Proteinsequenz von den jeweils korrespondierenden Rezeptoren FLS2 bzw. EFR gebunden wird. Diese als Minimalmotive bezeichneten Peptide (flg22 bzw. elf18) leiten sich aus besonders konservierten Bereichen ihrer nativen Proteine ab. Gegenüber den Volllängenproteinen sind sie in der Lage bei noch geringeren Konzentrationen eine volle Immunantwort in Pflanzen zu induzieren.

Aufgrund ihrer konservierten Struktur wurden die Proteine LSP, SPP und ARS für Peptidableitungen ausgewählt. Dabei sollte zum einen untersucht werden, ob es sich bei diesen Proteinen um das gesuchte MAMP handelt, zum anderen sollte der Frage nach dem Minimalmotiv des potentiellen MAMPs nachgegangen werden.

Zunächst wurden von LSP und SPP je zwei Peptide aus besonders konservierten Sequenzbereichen abgeleitet und synthetisiert (Tabelle 3-7). Die vollständige Sequenz der Proteine und die Lage der aus ihnen abgeleiteten Peptide sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 7-1 und Abbildung 7-2).

Tabelle 3-7: Sequenzen der von LSP und SPP abgeleiteten Peptide

Peptid	Sequenz
LSP A	LFLHGLKLTQAQRDKVFAIEYAQMP (25 AS)
LSP B	QLRAQADAKILQVLTPEQRKQISDR (25 AS)
SPP A	WKGRNYQLPRQLTRTGADRYFDQRTG (26 AS)
SPP B	VVIPAKAMLFDRNEGHRLEDECQTA (25 AS)

Bei einem Test auf Ethylen induzierende Aktivität zeigte sich für diese Peptide jedoch immunogenes Potential nur bei relativ hohen Konzentrationen, von denen angenommen werden kann, dass sie physiologisch nicht von Bedeutung sind (Abbildung 3-20). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass weder LSP noch SPP den gesuchten *R. solanacearum* Elicitor repräsentieren oder wiederum fehlende Modifikationen für die Inaktivität verantwortlich sind.

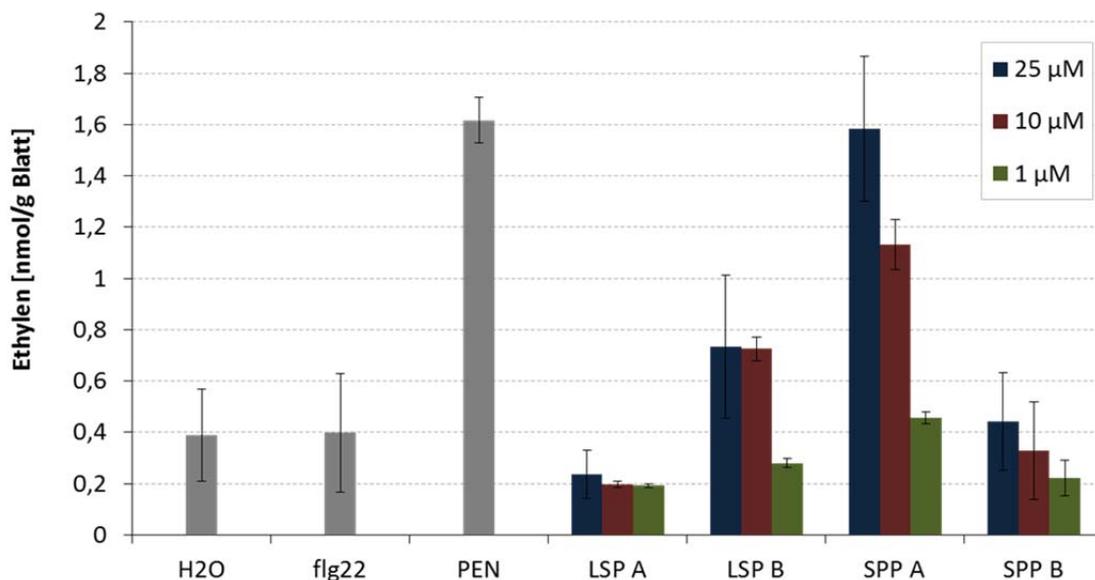


Abbildung 3-20: Ethyleninduktion der synthetisierten *R.solanacearum*-Peptide

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden in den angegebenen Konzentrationen mit den jeweiligen synthetisierten Peptiden von LSP bzw. SPP 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM flg22 und 90 µg/ml PEN mitgeführt.

In einem zweiten Ansatz wurden aus den Proteinsequenzen von SPP und ARS jeweils 10 sich überlappende Peptide abgeleitet und synthetisiert.

Für beide Proteine sagt SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ein N-terminales Signalpeptid vorher. Für die Ableitung der Peptide wurde dieses jeweils nicht berücksichtigt, da sie während der Translokation der Proteine in den periplasmatischen und/oder extrazellulären Raum enzymatisch entfernt werden und somit für die Detektion des Proteins nicht von Bedeutung sein sollten. Die Sequenzen der abgeleiteten Peptide sind in der Tabelle 3-8 aufgelistet. Die Ableitungen der Peptide und ihre Lage innerhalb des nativen Proteins zeigen die Abbildung 7-3 und die Abbildung 7-4 im Anhang.

Tabelle 3-8: Sequenzen der von SPP und ARS abgeleiteten Peptide

Peptid	Sequenz (je 30 AS)
SPP1	AASQYASAQPTTSAKPAAKKATAKKKAAKK
SPP2	PAKKATAKKKAAKKGAPAKEVAAKPEGVL
SPP3	GAPAKEVAAKPEGVLWKCELGNEMYIAGDM
SPP4	WKCELGNEMYIAGDMTRDQVVTMHWKGRNY
SPP5	TRDQVVTMHWKGRNYQLPRQLTRTGADRYF
SPP6	QLPRQLTRTGADRYFDQRTGMDLVVIPAKA
SPP7	DQRTGMDLVVIPAKAMLFDRNEGHRLEDEC
SPP8	MLFDRNEGHRLEDECQTAEMAAGAPAPTQG
SPP9	QTAEMAAGAPAPTQGGALRAPAGLPLMMQD
SPP10	GALRAPAGLPLMMQDNAAPAPAPAPTPDAT
ARS1	QTPAAATAPATASGGVHAVCKDGTPTYSGAT
ARS2	TASGGVHAVCKDGTPTYSGATLRGACRHHGG
ARS3	KDGTPTYSGATLRGACRHHGGVDDKASAADA
ARS4	RHHGGVDDKASAADAAPAANAPATSAAMPA
ARS5	APAANAPATSAAMPAAPPAPAKPAAPAAP
ARS6	PAKPAAPAAPMTPAKPAATAPAAAAPMAPA
ARS7	PAAAAPMAPAAAATPGAAADKVVANASTKV
ARS8	AADKVVANASTKVYHCPGDRYYGKTKQGAY
ARS9	TKVYHCPGDRYYGKTKQGAYMSEADAKAQG
ARS10	YGKTKQGAYMSEADAKAQGMRPSHGKACAK

Die Peptide wurden dann in Konzentrationen von 10 μM und 1 μM auf ihr Ethylen induzierendes Potenzial hin untersucht.

Im Fall von SPP zeigte das Peptid SPP5 eine deutliche Ethyleninduktion, jedoch lediglich bei einer Konzentration von 10 μM ; bei einer Konzentration von 1 μM konnte keine signifikant über den Hintergrund hinausgehende Aktivität gemessen werden. Von allen anderen SPP-Peptiden zeigte lediglich SPP3 bei einer Konzentration von 1 μM eine leichte Induktion von Ethylen (Abbildung 3-21).

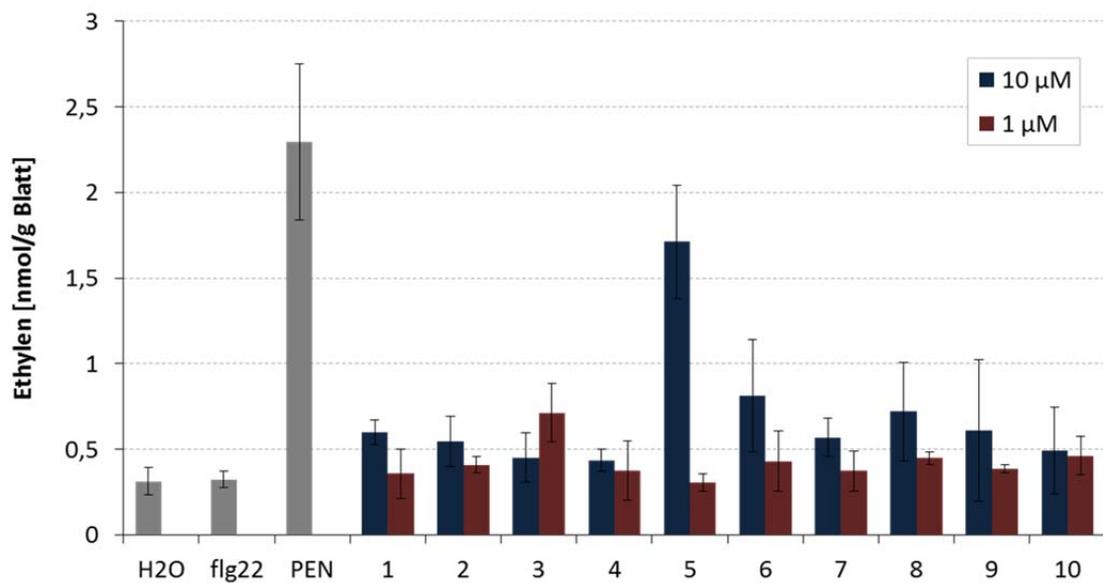


Abbildung 3-21: Ethyleninduktion der synthetisierten SPP-Peptide

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit den angegebenen Konzentrationen der synthetisierten Peptiden von SPP 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM flg22 und 90 µg/ml PEN mitgeführt.

Die von ARS abgeleiteten Peptide ARS8 und ARS9 waren in der Lage, bei einer Konzentration von 10 μM Ethylen zu induzieren. Desweiteren zeigte ARS6 eine leichte Aktivität bei 1 μM . Alle anderen ARS-Peptide hingegen zeigten kein Ethylen induzierendes Potential (Abbildung 3-22).

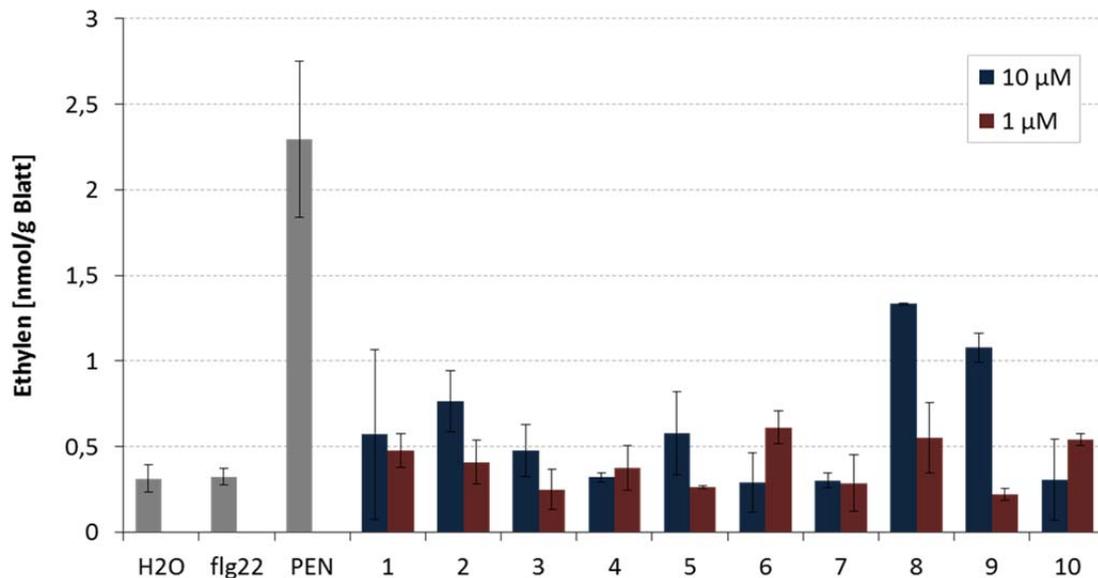


Abbildung 3-22: Ethyleninduktion der synthetisierten ARS-Peptide

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden in den angegebenen Konzentrationen mit den synthetisierten Peptiden von ARS 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μM flg22 und 90 $\mu\text{g/ml}$ PEN mitgeführt.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der Aktivität von SPP3 und SPP5 tatsächlich um eine Elicitor-Aktivität handelt, die sich von den anderen Peptiden unterscheidet, wurde untersucht, inwieweit die Peptide SPP3 bis SPP7 eine Medienalkalisierung induzieren können. Die gleiche Vorgehensweise wurde für die ARS-Peptide 6 bis 10 gewählt. Die dazu verwendeten Zellkulturen waren *A. thaliana* (Landsberg), *N. benthamiana* und *L. esculentum*; als finale Peptidkonzentration wurden aufgrund ihrer physiologischen Relevanz 1 μM gewählt.

Wie die Abbildung 3-23 verdeutlicht, kann keines der gewählten Peptide einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes in *A. thaliana* induzieren. In *N. benthamiana* Zellkulturen hingegen induzieren die SPP-Peptide 4, 5 und 7 und die ARS-Peptide 7, 9 und 10 einen leichten Anstieg des extrazellulären

pH-Wertes. Im Vergleich dazu induziert in Zellkulturen von *L. esculentum* lediglich SPP6 eine leichte Medienalkalisierung, aber keines der anderen getesteten Peptide (Abbildung 3-23).

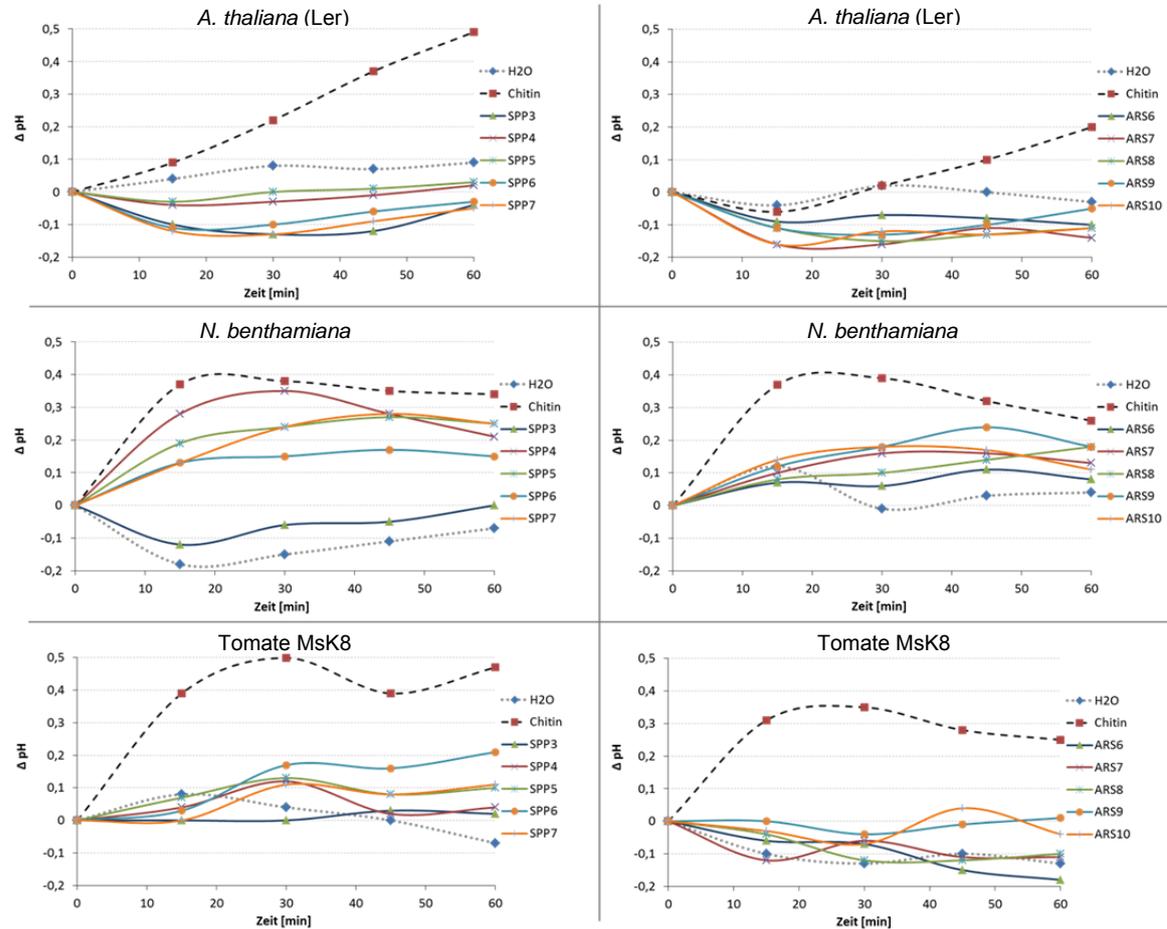


Abbildung 3-23: Test der synthetisierten Peptide auf Induktion einer Medienalkalisierung in pflanzlichen Zellkulturen

Pflanzliche Zellkulturen von *A. thaliana* (Ler), *N. benthamiana* und Tomate Msk8 wurden mit den angegebenen Peptiden von SPP (links) und ARS (rechts) versetzt (Endkonzentration 1 μ M). Der pH-Wert der Kulturen wurde in Abständen von 15 Minuten über einen Zeitraum von 1 Stunde gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser und Chitin mitgeführt.

Das SPP-Peptid 5 war in der Lage Ethylenbildung in *A. thaliana* und Medienalkalisierung in *N. benthamiana* zu induzieren. Die SPP-Peptide 4 und 7 induzierten in *N. benthamiana* zwar einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes, zeigten aber kein Vermögen in *A. thaliana* Ethylenbildung auszulösen. Das SPP-Peptid 3, welches Ethylen induzierende Wirkung in *A. thaliana* zeigte, löste in keinen der getesteten Zellkulturen eine Medienalkalisierung aus. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass SPP nicht der gesuchte Elicitor ist oder den

getesteten Peptiden für die Perzeption essentielle Modifikationen fehlen. Da die Peptide in der niedrigsten Reinheitsstufe bestellt wurden, haben die gemessenen immunogenen Aktivitäten ihre Ursache wahrscheinlich in nach der Peptidsynthese zurückgebliebenen Chemiekalienresten.

Im Fall der ARS-Peptide können Verunreinigungen in den Aliquots ebenfalls nicht als Quelle der Aktivitäten ausgeschlossen werden. Einzig das Potential von ARS9 sowohl Ethylenbildung in *A. thaliana* als auch Medienalkalisierung in *N. benthamiana* zu induzieren, ist ein Hinweis darauf, dass es sich bei dem gesuchten *R. solanacearum* Elicitor um ARS handeln könnte. Dieser Hinweis wird jedoch durch die Tatsachen geschwächt, dass ARS9 zum einen nicht in der Lage war in *A. thaliana* einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes auszulösen und zum anderen die gemessene pH-Werterhöhung in *N. benthamiana* erst relativ spät erfolgte, sodass andere Einflüsse auf die Zellkulturen nicht ausgeschlossen werden können.

3.3 Charakterisierung des *R. solanacearum* Elicitors (RsE)

3.3.1 Der Zellextrakt induziert Medienalkalisierung und Expression von *PR1*

Die bisher gezeigten immunogenen Aktivitäten beschränkten sich hauptsächlich auf die Induktion von Ethylen. Dieser Assay ist aufgrund seiner Toleranz gegenüber Salzgehalt und pH-Wert der zu testenden Proben sehr gut für eine schnelle Analyse von z. B. Chromatographiefraktionen geeignet. Ein typisches MAMP sollte weitere mit der pflanzlichen Immunität in Zusammenhang stehende Reaktionen auslösen. Im Folgenden möchte ich die Ergebnisse weiterer pflanzlicher Immunantworten aufführen, um die in *R. solanacearum* enthaltene Elicitor-Aktivität näher charakterisieren zu können.

Bereits gezeigt werden konnte, dass die Elicitor-Aktivität auch nach Hitzebehandlung erhalten bleibt und die Bildung von Ethylen induzieren kann (Abbildung 3-1). Die Behandlung mit Proteinase K hingegen zerstört diese Aktivität (Abbildung 3-3). Diese Ergebnisse konnten auch für die Induktion der Medienalkalisierung von *A. thaliana fls2 x efr*-Zellkulturen bestätigt werden. Die Hitzebehandlung führt nicht zu einer Verringerung der Aktivität und die Inkubation mit Proteinase K zerstört das Vermögen einen pH-Wert-Anstieg zu induzieren (Abbildung 3-24). Der in *R. solanacearum* enthaltene Elicitor ist demnach ein hitzestabiles Protein, das nicht Flagellin oder EF-Tu ist. Nachfolgend wird dieser Elicitor als RsE (*Ralstonia solanacearum* Elicitor) bezeichnet.

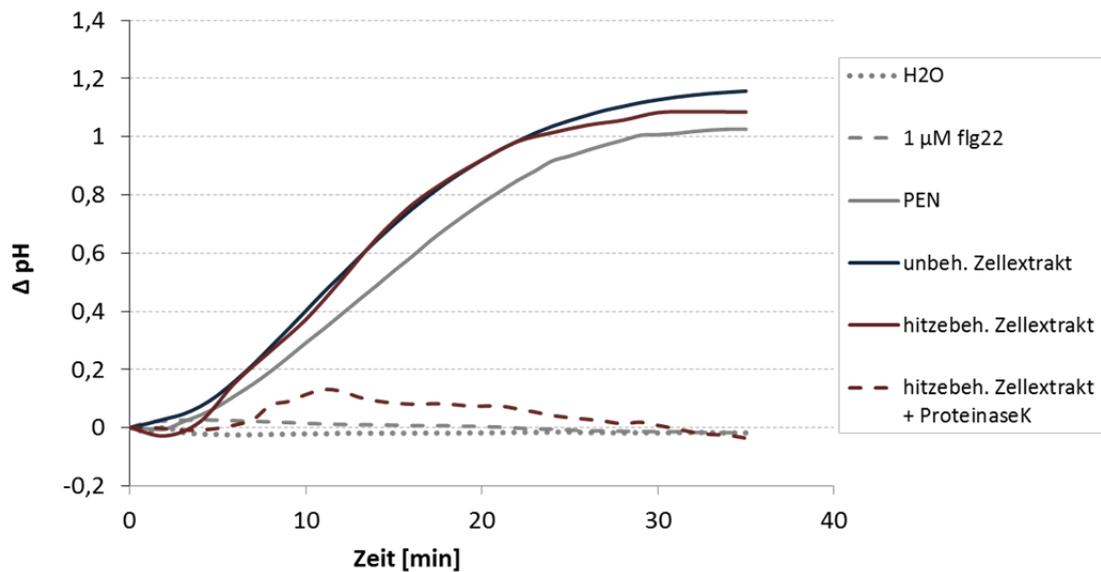


Abbildung 3-24: Medienalkalisierung von *A. thaliana fls2 x efr* durch RsE

Nach Zugabe von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ unbehandeltem Zellextrakt und 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ hitzebehandeltem Zellextrakt (mit und ohne Proteinase K-Behandlung) zu Zellkulturen von *A. thaliana fls2 x efr* wurde der pH-Wert des Mediums über einen Zeitraum von 35 Minuten gemessen. Als Kontrollen dienten steriles Aqua dest., 1 μM flg22 und 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PEN.

Eine weitere typische Immunantwort ist die Induktion der Expression von immunassoziierten Genen. Ein wichtiger Vertreter dieser immunassoziierten Gene ist *PR1* (*Pathogenesis Related Gen 1*). Die Fusion des *PR1*-Promotors an das β -Glukuronidasegen ermöglicht es, die Induktion von *PR1* histochemisch sichtbar zu machen. Um das Potential von RsE zur Aktivierung des *PR1*-Gens zu überprüfen, wurden Blätter *PR1::GUS*-transgener *A. thaliana*-Pflanzen mit dem unbehandelten und dem hitzebehandelten Zellextrakt infiltriert, wobei Wasser und das Flagellinpeptid flg22 als Negativ- respektive Positivkontrolle mitgeführt wurden. Dabei zeigte sich, dass sowohl der unbehandelte wie auch der hitzebehandelte Zellextrakt RsE enthalten, und dass dieser eine starke *PR1*-Induktion auslöst (Abbildung 3-25).

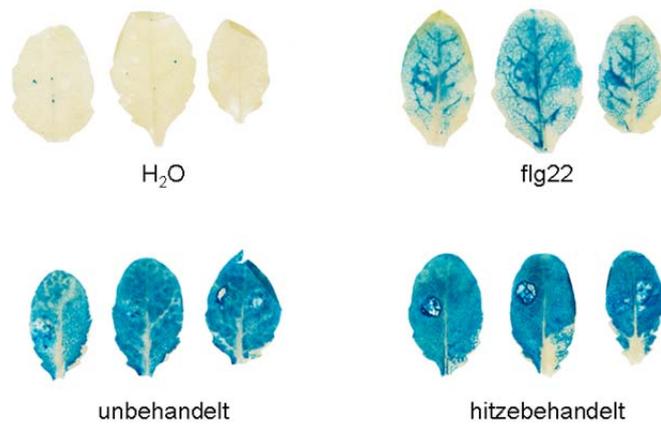


Abbildung 3-25: RsE induziert PR1

Je ein Blatt drei verschiedener, fünf Wochen alter *PR1::GUS* transgener *A. thaliana* wurde mit 1 µg/µl unbehandeltem und 0,2 µg/µl hitzebehandeltem Zellextrakt von *R. solanacearum* infiltriert und nach 24 Stunden auf GUS-Aktivität untersucht.

Die Hitzestabilität von RsE lässt desweiteren die Schlussfolgerung zu, dass die Ursache der immunogenen Aktivität in einer Strukturerkennung von RsE durch *A. thaliana* liegt. Die Möglichkeit, dass *A. thaliana* eine Enzymaktivität von RsE oder deren Produkte detektiert, kann so gut wie ausgeschlossen werden.

3.3.2 Der gereinigte *R. solanacearum* Elicitor induziert Immunantworten im nanomolaren Bereich

Im Kapitel 3.1 wurde beschrieben, aus welchen Extrakten RsE gewonnen und wie der Elicitor mittels FPLC aufgereinigt wurde. Die Reinigung von RsE aus dem Kulturextrakt führte nach Kationenaustausch mittels feintrennender Säule zu zwei Aktivitätspeaks, die anschließend getrennt voneinander einer Rechromatographie unterzogen wurden, was eine weitere Erhöhung der Reinheit zur Folge hatte (Abbildung 3-13). Diese beiden Elicitor-Aktivitäten, nachfolgend als RsE-A und RsE-B bezeichnet, wurden nun näher untersucht.

Zunächst wurde anhand einer Konzentrationsreihe die Ethylen-induzierende Aktivität bestimmt. Für RsE-A war signifikant über den Hintergrund hinausgehende Aktivität ab einer Konzentration von ~ 0,14 ng/µl messbar. RsE-B

induzierte Ethylen sogar schon ab einer Konzentration von $\sim 0,033$ ng/ μ l (EC₂₀-Werte, Tabelle 3-9).

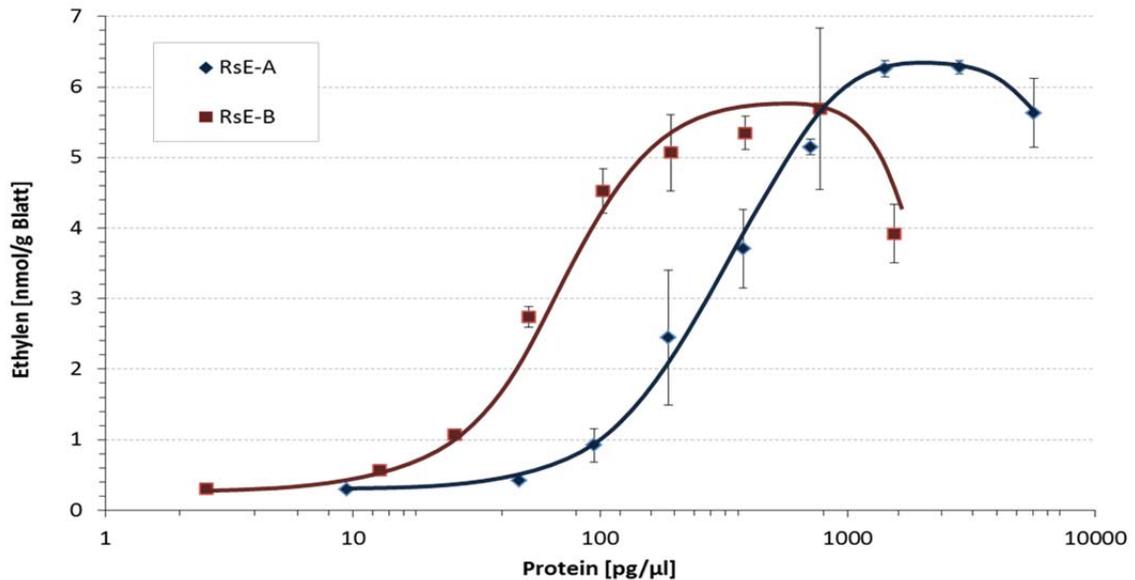


Abbildung 3-26: Ethyleninduktion durch ansteigende Konzentrationen von RsE-A und RsE-B

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit jeweils ansteigenden Konzentrationen der *R. solanacearum*-Extrakte 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen.

Aus den gewonnenen Daten der Konzentrationsreihen konnten neben den EC₂₀- auch die EC₅₀-Werte bestimmt werden (Tabelle 3-9).

Tabelle 3-9: EC₂₀- und EC₅₀-Werte von RsE-A und RsE-B für die Induktion von Ethylen

Aktivität	EC ₂₀ -Wert	EC ₅₀ -Wert
RsE-A	0,14 ng/ μ l	0,3 ng/ μ l
RsE-B	0,033 ng/ μ l	0,065 ng/ μ l

Da der *R. solanacearum* Elicitor noch nicht identifiziert werden konnte, ist auch eine Berechnung von molaren Konzentrationen nicht möglich. In Kapitel 3.1.1 konnte jedoch durch Gelfiltrationsexperimente gezeigt werden, dass die Größe des gesuchten Elicitors wahrscheinlich unter 30 kDa liegt. Unter der Annahme, dass RsE-A und RsE-B jeweils nur eine Proteinentität enthalten, können jedoch Molaritäten für verschiedene Beispielgrößen berechnet werden. Die Tabelle 3-10 zeigt die molaren EC₅₀-Werte für die Beispielgrößen 10, 20 und 30 kDa. Die halbmaximale Aktivität von RsE-A liegt demnach zwischen 10 und 30 nM, die von RsE-B zwischen 6,5 und 2,2 nM. Da es sich bei RsE-A und RsE-B aber um Proteingemische handelt, liegt der eigentliche EC₅₀-Wert für den von ihnen repräsentierten Elicitor unterhalb der berechneten Werte.

Tabelle 3-10: molare EC₅₀-Werte der Ethyleninduktion von RsE-A und RsE-B für Molekulargewichte von 30, 20 und 10 kDa

Aktivität	Molekulargewicht		
	10 kDa	20 kDa	30 kDa
EC ₅₀ RsE-A	30 nM	15 nM	10 nM
EC ₅₀ RsE-B	6,5 nM	3,3 nM	2,2 nM

Sowohl RsE-A als auch RsE-B lösen einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes in *A. thaliana* (Col-0)-Zellkulturen aus (Abbildung 3-27). Gegenüber der Positivkontrolle flg22 fällt auf, dass der Anstieg des pH-Wertes flacher ausfällt. RsE-A induziert jedoch mit einem maximalen $\Delta\text{pH} \sim 0,95$ einen etwas stärkeren pH-Anstieg als flg22 mit $\Delta\text{pH} \sim 0,85$; RsE-B erreicht einen maximalen ΔpH von $\sim 0,48$. Die Behandlung beider Aliquots mit Proteinase K führt wiederum zu einer deutlichen Herabsetzung der Aktivität und bestätigt, dass es sich bei dem gesuchten *R. solanacearum* Elicitor um ein Protein handelt.

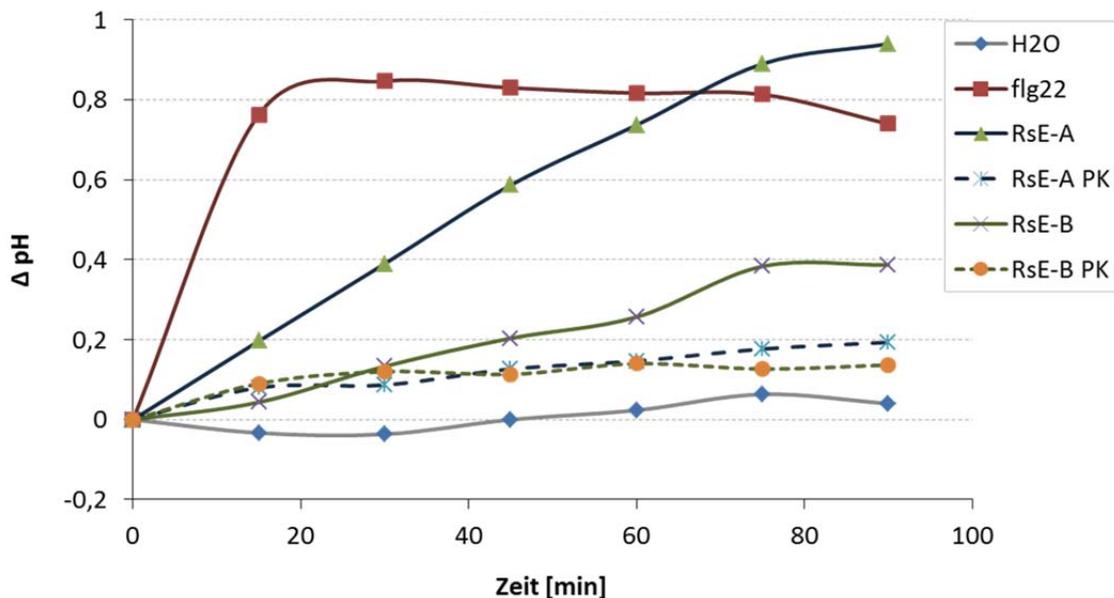


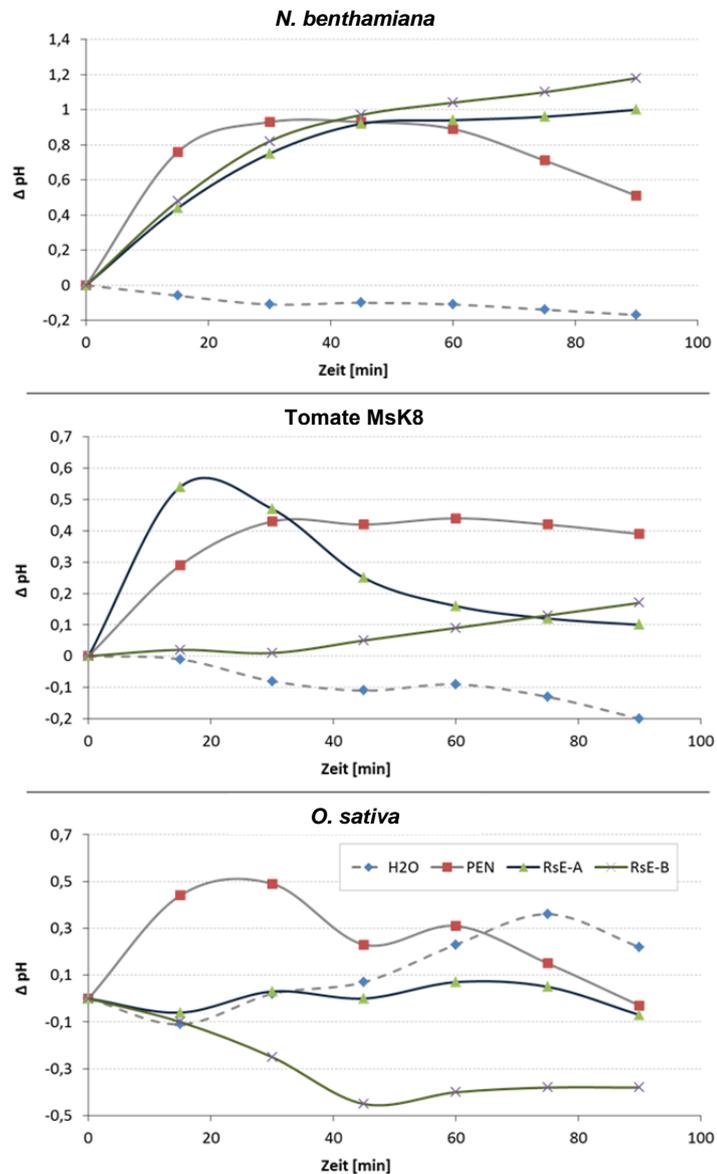
Abbildung 3-27: Medienalkalisierung von *A. thaliana* Col-0 durch RsE-A und RsE-B

Nach der Zugabe von $\sim 1 \mu\text{g/ml}$ unbehandeltem und Proteinase K (PK) behandeltem RsE-A bzw. RsE-B zu Zellkulturen von *A. thaliana* wurde der pH-Wert des Mediums über einen Zeitraum von 90 Minuten gemessen. Als Kontrollen dienten steriles Aqua dest. und $1 \mu\text{M}$ flg22.

Das Potenzial von RsE-A und RsE-B, einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes zu induzieren, wurde auch in Zellkulturen anderer Pflanzen überprüft. In Zellkulturen von *N. benthamiana* induzierten sowohl RsE-A als auch RsE-B eine starke Alkalisierung des Mediums. Der Anstieg der Medienalkalisierung fällt bei beiden Aktivitäten im Vergleich zur Positivkontrolle wieder etwas flacher aus. In Tomate MsK8 dagegen führt lediglich die Zugabe von RsE-A zu einer starken Erhöhung des pH-Wertes, wobei der Anstieg hierbei recht steil verläuft. Die Zugabe von RsE-B führte in Tomate erst spät zu einer leichten Erhöhung des pH-Wertes. In Zellkulturen von Reis (*O. sativa*) konnte weder für RsE-A noch für

R_sE-B eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes festgestellt werden (Abbildung 3-28). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sowohl *N. benthamiana* als auch Tomate MsK8, nicht aber *O. sativa* über ein Perzeptionssystem für den *R. solanacearum* Elicitor verfügen.

Abbildung 3-28: Test an Zellkulturen
Zellkulturen von *N. benthamiana*, *Tomate MsK8* und *O. sativa* mit R_sE-A und R_sE-B inkubiert. über einen Zeitraum von 90 min PEN mitgeführt.



Eine weitere frühe, immunassoziierte Antwort ist die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die Reaktion von Luminol mit diesen Oxidationsmitteln resultiert in einer Chemolumineszenz, die mit Luminometern detektiert und quantifiziert werden kann.

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren, wurde auch für R_sE-A und R_sE-B überprüft. Dabei zeigten beide Elicitoraktivitäten einen mit

der Positivkontrolle Chitosan vergleichbaren zeitlichen Beginn der ROS-Induktion, jedoch waren demgegenüber sowohl RsE-A als auch RsE-B in der Lage, einen deutlich stärkeren Anstieg von ROS zu induzieren. Im Fall von RsE-B klingt diese Reaktion zudem wesentlich langsamer ab, als für RsE-A und Chitosan beobachtet (Abbildung 3-29).

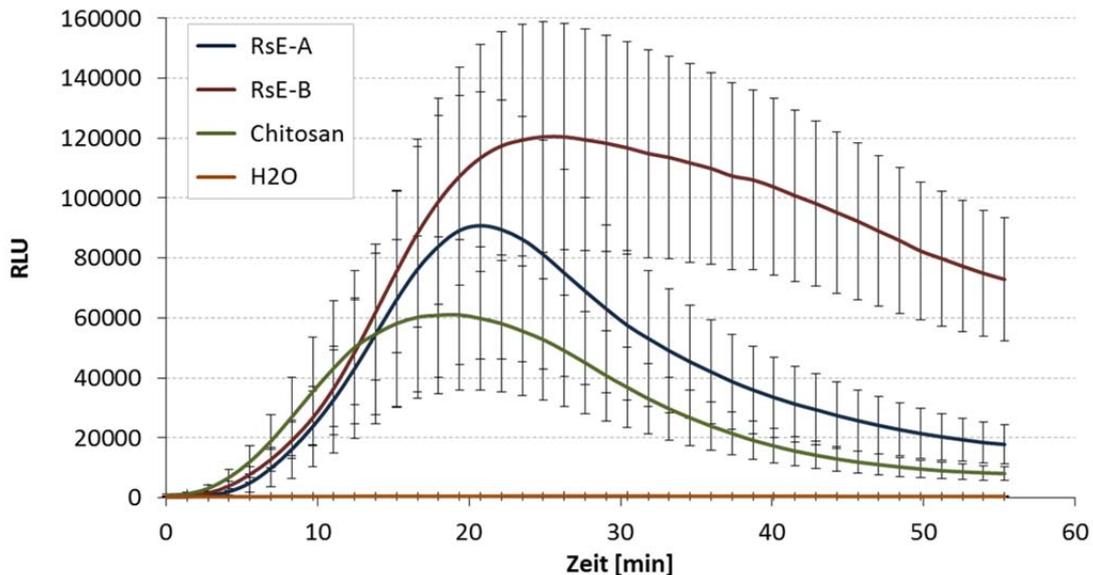


Abbildung 3-29: Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies in *A. thaliana*

Blattstücke fünf bis sechs Wochen alter *A.thaliana fls2 x efr* wurden in einem Luminol/Peroxidasegemisch mit $\sim 0,5 \mu\text{g/ml}$ RsE-A bzw. RsE-B inkubiert. Als Kontrollen wurden Wasser und 10 mg/ml Chitosan mitgeführt. Die Luminol-abhängige Chemolumineszenz wurde in relativen Lichteinheiten (RLU – *relative light units*) über einen Zeitraum von 55 Minuten gemessen.

Wie in der Einleitung bereits beschrieben, ist die Kallosebildung eine Immunreaktion der Pflanzen, die Eindringen und Ausbreitung von mikrobiellen Schadorganismen erschweren soll.

Durch Infiltration von RsE-A und RsE-B in *A. thaliana* sollte überprüft werden, ob die in den Aliquots enthaltene Elicitor-Aktivität auch die Bildung von Kallose induzieren kann. Nach 24-stündiger Inkubation von *A. thaliana fls2 x efr* zeigten die Negativkontrollen Wasser und Flagellinpeptid flg22 wie erwartet keine Kallosebildung. Der als Positivkontrolle verwendete *Penicillium*-Extrakt (PEN)

induzierte die Bildung von Kallose dagegen sehr stark. Die Inkubation der Pflanzen mit RsE-A und RsE-B resultierte ebenfalls in einer Bildung von Kallose, die jedoch im Vergleich zu PEN etwas geringer ausfiel (Abbildung 3-30).

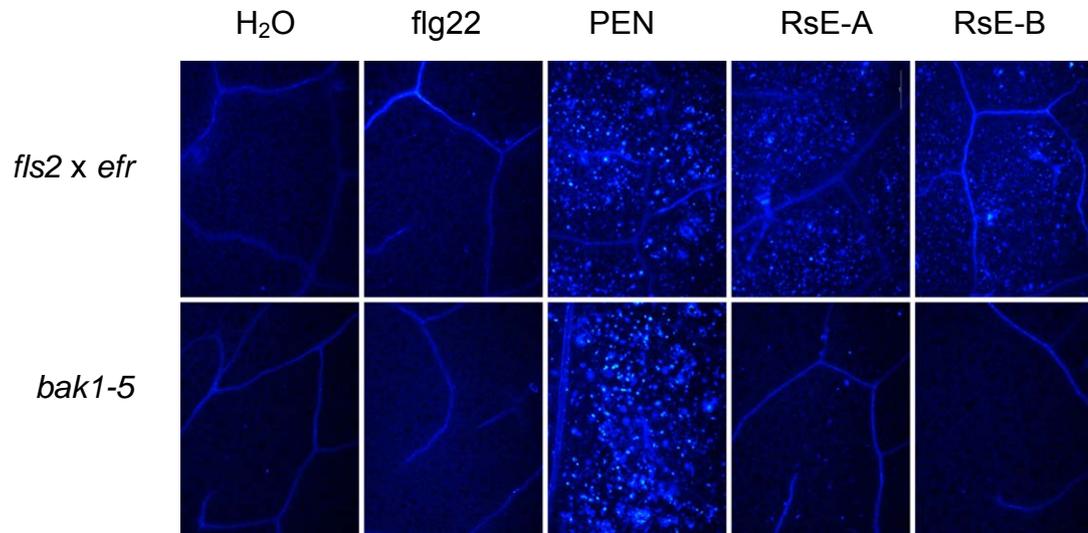


Abbildung 3-30: Kallosebildung durch RsE A und RsE B

Blätter von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* und *A. thaliana bak1-5* wurden mit Wasser, 1 μ M flg22, 90 μ g/ml PEN und je 1 μ g/ml RsE-A und -B infiltriert. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Blätter geerntet und die Kallosebildung durch Anillinfärbung sichtbar gemacht.

Zusätzlich zu der Rezeptordoppelmutante *A. thaliana fls2 x efr* wurden auch Pflanzen der *BAK1*-Mutante *A. thaliana bak1-5* mit den Kontrollen, RsE-A und RsE-B infiltriert. BAK1 ist neben Funktionen in der Brassinosteroidperzeption und der Zelltodkontrolle auch als rezeptorassoziierte Kinase von FLS2 und EFR für die Perzeption von Flagellin bzw. EF-Tu essentiell (Chinchilla et al., 2009). *Bak1-5*-Mutanten zeigen eine starke Herabsetzung der Immunreaktionen auf Flagellin oder EF-Tu, wohingegen die Brassinosteroidperzeption und die Zelltodkontrolle nicht beeinträchtigt sind (Schwessinger et al., 2011). Im Gegensatz zu *A. thaliana fls2 x efr* waren beide Aliquots nicht in der Lage Kallosebildung zu induzieren, wohingegen die Kontrollen mit Wasser, flg22 und PEN zu vergleichbaren Ergebnissen führten, wie sie auch in *A. thaliana fls2 x efr* beobachtet wurden (Abbildung 3-30). Dies deutet darauf hin, dass auch die Erkennung des *R. solanacearum* Elicitors BAK1-abhängig ist.

Ein wichtiges Bindeglied in der immunassoziierten Signaltransduktion sind mitogenaktivierte Proteinkinasen, an deren Ende die MAP-Kinasen (MPKs) stehen. Ihre Aktivierung kann bereits kurze Zeit nach Detektion eines MAMPs nachgewiesen werden (Pitzschke et al., 2009).

Aus diesem Grund wurde auch für RsE-A und RsE-B das Vermögen, MPKs zu aktivieren, untersucht. In *A. thaliana fls2 x efr* zeigte sich für RsE-A eine mit der Positivkontrolle PEN vergleichbare Aktivierung von MPK3 und MPK6, wohingegen diese MPKs nach Infiltration mit RsE-B etwas schwächer induziert waren (Abbildung 3-31).

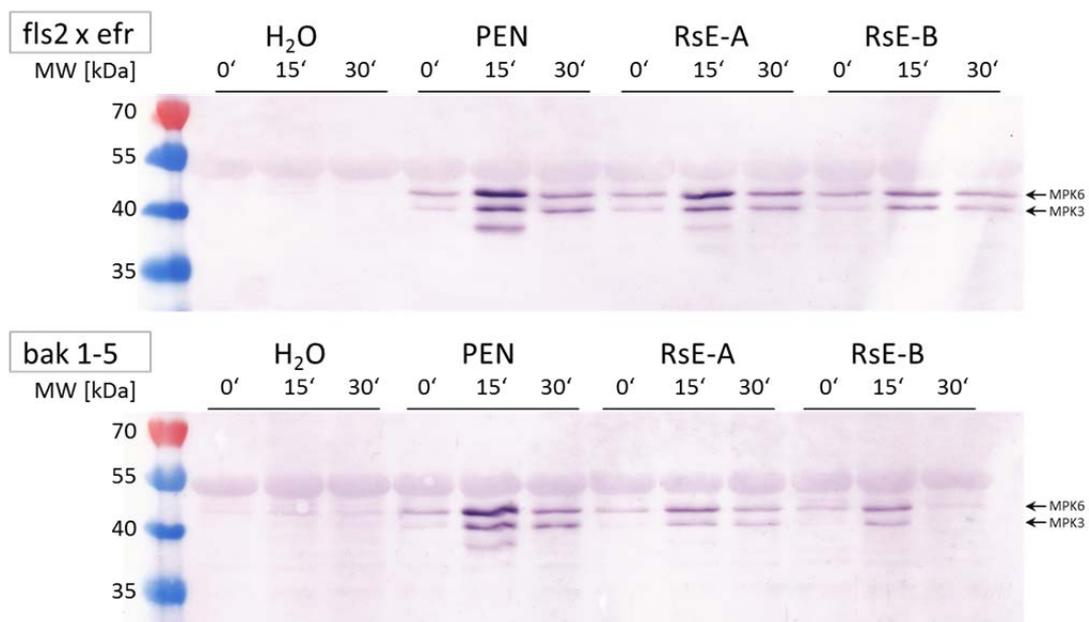


Abbildung 3-31: RsE-A und RsE-B induzieren die Aktivierung von MAPKs

Blätter von je 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* und *A. thaliana bak1-5* wurden mit Wasser, 1 μ M flg22, 90 μ g/ml PEN und je 1 μ g/ml RsE-A und -B infiltriert. Nach 15 und 30 Minuten wurde aus infiltrierten Blättern ein Proteinextrakt hergestellt, der dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurde. Aktivierte MPK6 und MPK3 wurden durch Immunoblot mit für diese MPKs spezifischen phospho-p44/p42-Antikörpern analysiert.

In *A. thaliana bak1-5* konnte wie oben berichtet keine Kallosebildung nachgewiesen werden (Abbildung 3-30). Nach Infiltration dieser Mutanten mit RsE-A bzw. RsE-B zeigte sich in Bezug auf die Aktivierung von MPKs kein so eindeutiges Bild. Die Applikation beider Aliquots führte zu einer Aktivierung von MPK3 und MPK6, wenngleich diese Aktivierung im Vergleich zu *A. thaliana fls2 x efr* deutlich schwächer ausfiel (Abbildung 3-31).

Bisher konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem gesuchten *R. solanacearum* Elicitor um ein Protein handelt. Durch die Behandlung mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) sollte nun untersucht werden, ob für die von RsE-A und RsE-B verursachten Immunantworten eventuelle N-Glykosylierungen von Bedeutung sind. Um wiederum andere Einflüsse auf die Ethylen induzierende Aktivität als PNGase F ausschließen zu können, wurden parallel Aliquots von RsE-A und RsE-B ohne Zusatz von PNGase F den gleichen Inkubationsbedingungen ausgesetzt.

Es zeigte sich, dass eine Deglykosylierung der in RsE-A und RsE-B enthaltenen Proteine keinen Einfluss auf ihre immunogene Wirkung hatte (Abbildung 3-32). Somit scheinen eventuelle, an die Proteine posttranslational gebundene Kohlenhydratreste für die Perzeption durch *A. thaliana* nicht essentiell zu sein. Aufgrund einer fehlenden Kontrolle für die Deglykosylierung eines MAMPs durch PNGaseF kann diese Einschätzung jedoch nur eine Vermutung sein.

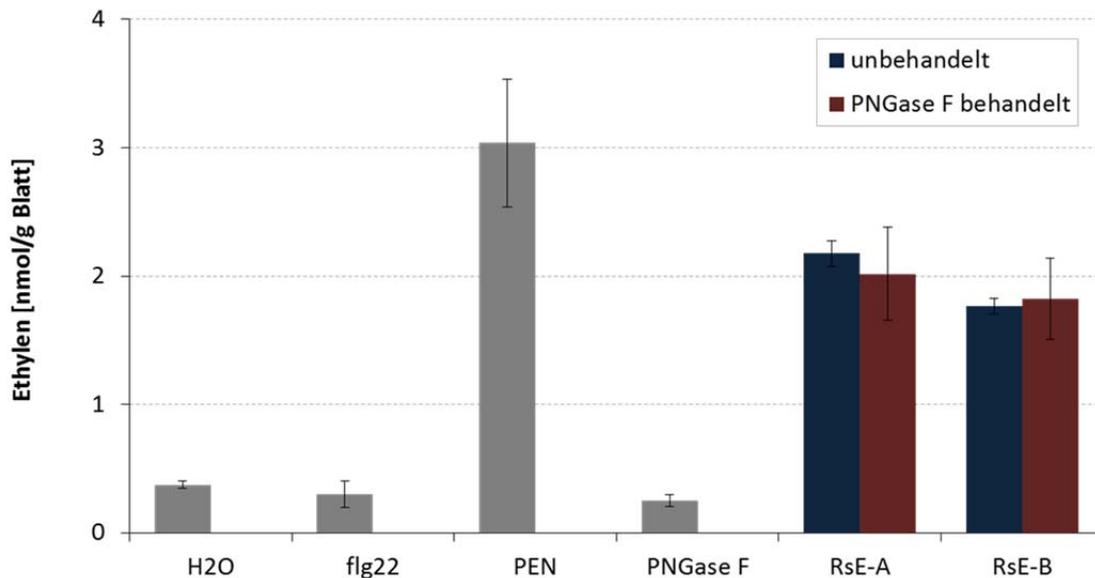


Abbildung 3-32: Behandlung von RsE-A und RsE-B mit PNGase F reduziert nicht die Ethylen induzierende Aktivität

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit 0,2 µg/ml RsE-A und 0,05 µg/ml RsE-B (unbehandelt bzw. über Nacht mit PNGase F behandelt) 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 µM flg22 und 90 µg/ml PEN mitgeführt.

3.3.3 Cyanogenbromid und selten schneidende Proteasen spalten aktive Peptide aus RsE-A und RsE-B ab

Die in 3.1.1 und 3.1.2 beschriebenen Reinigungsschritte wurden, von einer Hitzebehandlung abgesehen, mit unbehandelten Proteinextrakten durchgeführt. Ein weiterer Ansatz zur Identifikation von RsE ist die Reinigung aktiver Peptide, die dann einem bestimmten *R. solanacearum* Protein zugeordnet werden können. Um für eine Detektion ausreichend lange Peptide aus den *R. solanacearum* Proteinen zu erhalten, wurden Aliquots von RsE-A und RsE-B mit den selten schneidenden Proteasen AspN und GluC, sowie mit der Chemikalie Cyanogenbromid verdaut. AspN schneidet Proteine N-terminal von Aspartatresten, GluC C-terminal von Glutamatresten (und mit deutlich geringerer Aktivität nach Aspartatresten), und Cyanogenbromid schneidet Proteine nur nach Methioninresten.

Es zeigte sich, dass RsE-A sowohl nach Inkubation mit AspN als auch nach Inkubation mit Cyanogenbromid noch immer die Bildung von Ethylen induzieren kann (Abbildung 3-33). Im Fall von Cyanogenbromid lag die Elicitoraktivität sogar deutlich über der der unbehandelten Kontrolle, was auf die Freisetzung eines stärker aktiven Peptids hindeutet, wie es im Fall von Flagellin und dem Peptid flg22 schon beschrieben ist (Felix et al., 1999).

Die Inkubation von RsE-B mit den genannten Proteasen führte in allen Fällen zu einer Reduktion der Elicitor-Aktivität, wenngleich die Aktivität noch immer über der der Negativkontrollen lag (Abbildung 3-33). Besonders im Fall von AspN und GluC liegt der Schluss nahe, dass zwar aktive Peptide gebildet wurden, diese jedoch nicht die vollständige Erkennungssequenz beinhalten, die für eine 100%-ige Aktivität nötig ist.

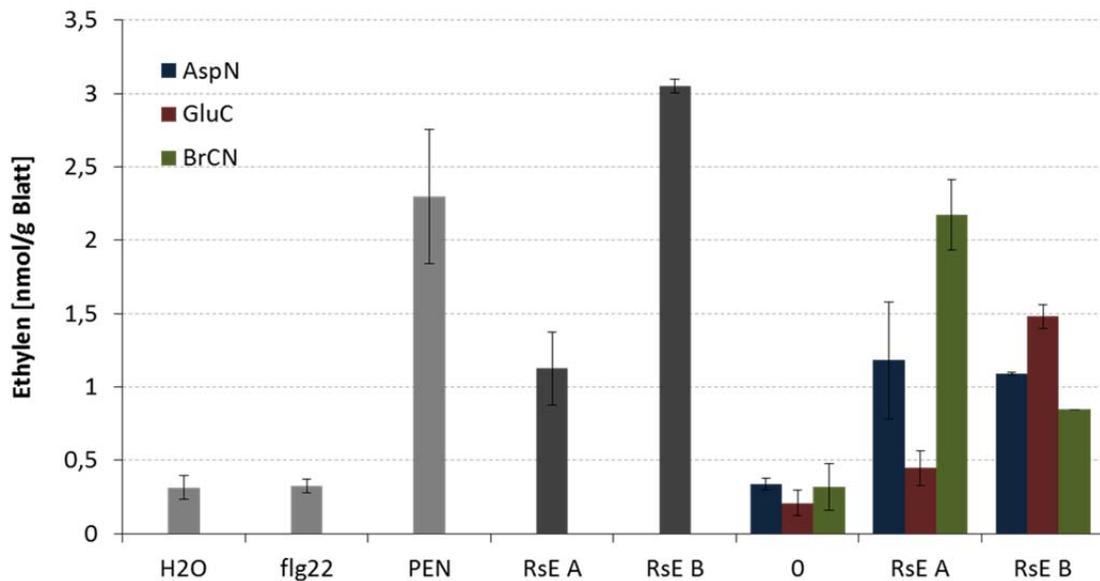


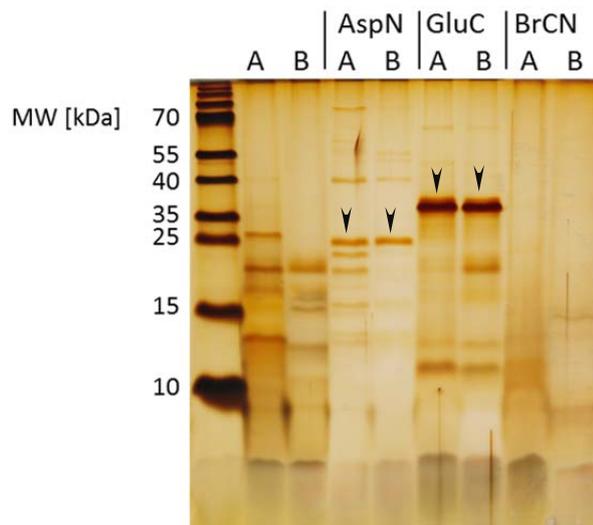
Abbildung 3-33: Ethylen induzierende Aktivität von mit Proteasen und Cyanogenbromid behandeltem RsE-A und RsE-B

Blattstücke von 6 Wochen alten *A. thaliana fls2 x efr* wurden mit Protease behandelten und unbehandelten Aliquots von RsE-A und RsE-B 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ethylengehalt im Luftraum der Inkubationsgläser wurde im Anschluss mit einem Gaschromatographen gemessen. Zur Kontrolle wurden Wasser, 1 μ M flg22 und 90 μ g/ml PEN mitgeführt.

Der Vergleich der Proteinprofile von RsE-A und RsE-B vor bzw. nach der jeweiligen Proteasebehandlung zeigt, dass nahezu alle Proteine mindestens einmal geschnitten wurden. Lediglich beim Verdau von RsE-B mit GluC zeigt eine Proteinbande bei \sim 20 kDa noch die gleiche Intensität wie in der unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3-34).

Abbildung 3-34: Proteinprofil der verdauten Aliquots von RsE-A und RsE-B

Die Proteine von 1 μ l RsE-A und RsE-B vor bzw. nach dem Verdau mit den angegebenen Proteasen wurden in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Die Banden der Proteasen AspN und GluC sind mit einem schwarzen Pfeil markiert.



4. Diskussion

Pflanzen besitzen im Vergleich zu Wirbeltieren kein adaptives Immunsystem. Dennoch sind sie in der Lage, ‚Selbst‘ von ‚Nicht-Selbst‘ oder ‚verändertem Selbst‘ zu unterscheiden. Im Laufe der Evolution entwickelten sie ein hochentwickeltes Perzeptionssystem, das sie dazu befähigt, ein breites Spektrum endogener und exogener Signale zu empfangen und sie ins Zellinnere weiterzuleiten. Am Ende einer ganzen Signalkaskade steht eine Immunreaktion, die das Ausbreiten von Schadorganismen unterbinden soll.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *R. solanacearum* mindestens einen hitzestabilen, proteinogenen Elicitor mit einer Größe < 30 kDa besitzt, welcher in der Lage ist, eine Vielzahl von Immunreaktionen in *A. thaliana* bereits bei Konzentrationen von ≤ 30 nM auszulösen.

4.1 Die Aufreinigung von RsE aus *R. solanacearum*

Die Wahl von *R. solanacearum* zur Aufreinigung neuer MAMPs basierte auf folgender Überlegung: *R. solanacearum* ist ein sehr heterogenes bakterielles Pathogen mit einem sehr großen Wirtspflanzenkreis, und die von ihm verursachten Krankheiten sind von enormer wirtschaftlicher Bedeutung. Jedoch zeigen die verschiedenen Kultivare von *R. solanacearum* auch große Unterschiede in ihrer Wirtspräferenz, was - unterstützt durch Genomanalysen - zu der These führte, dass es sich bei *R. solanacearum* mehr um einen Spezieskomplex als um eine einzelne Art handelt (Remenant et al., 2010; Genin and Denny, 2012). Da zudem bereits ein proteinogener Elicitor, der nicht Flagellin ist, in *R. solanacearum* nachgewiesen werden konnte (Pfund et al., 2004), sollte die Identifikation und Charakterisierung dieses Elicitors zusammen mit der Bestimmung des korrespondierenden Mustererkennungsrezeptors das Verständnis der ‚Nicht-Selbst‘-Erkennung von Pflanzen erweitern. Untersuchungen des immunogenen Potentials von RsE bei verschiedenen

Wirtspflanzen von *R. solanacearum* könnten zukünftig auch dabei helfen, das heute als Spezieskomplex eingestufte Pathogen *R. solanacearum* besser zu verstehen und systematisch zu klassifizieren.

Für die Reinigung des *R. solanacearum* Elicitors wurden säulen-chromatographische Trennverfahren gewählt. Das dazu verwendete Ausgangsmaterial stammte aus zwei verschiedenen Quellen. Aus geernteten Zellen wurde ein Extrakt von Zellproteinen hergestellt (Zellextrakt), und aus zuvor aufgekochten Kulturen wurde durch Ammoniumsulfatfällung ein Proteinextrakt aus dem Überstand gewonnen (Kulturextrakt). Wie der Vergleich der Proteinprofile zeigt, enthält der Kulturextrakt deutlich weniger Proteine als der Zellextrakt. Nach der Hitzebehandlung des Zellextraktes konnte dessen Komplexität jedoch so deutlich verringert werden, dass seine Zusammensetzung eine mit dem Kulturextrakt vergleichbare Komplexität aufwies (Abbildung 3-2).

Für beide Extrakte konnte festgestellt werden, dass das immunogene Potential zum einen proteinbasiert ist (Abbildung 3-3) und zum anderen durch Hitzebehandlung nicht herabgesetzt wird, sondern auf einem vergleichbar hohen Level verbleibt (Abbildung 3-1). Dabei weist der Kulturextrakt jedoch einen deutlich niedrigeren EC_{50} -Wert als der hitzebehandelte Zellextrakt auf (Tabelle 3-1). Für weitere Aufreinigungen stellt der Kulturextrakt somit das bessere Ausgangsmaterial dar, da bei ihm das Verhältnis immunogener Proteine zu nicht immunogenen größer ist als beim hitzebehandelten Zellextrakt.

Da durch die thermische Behandlung der Extrakte die Mehrzahl der Enzyme von *R. solanacearum* inaktiviert worden sein sollte, kann zusätzlich davon ausgegangen werden, dass den gemessenen Immunantworten die Erkennung einer Molekülstruktur durch einen korrespondierenden *A. thaliana* Mustererkennungsrezeptor zugrunde liegt und nicht die Detektion einer Enzymaktivität.

Wie die Herabsetzung der Proteinkomplexität und die Verringerung des EC₅₀-Wertes zeigen, stellt die Hitzebehandlung bereits den ersten Reinigungsschritt zur Isolation des *R. solanacearum* Elicitors dar.

Zur weiteren Reinigung wurden die von hitzelabilen, nicht immunogenen Proteinen befreiten *R. solanacearum* Extrakte nun Ionenaustauschchromatographien mit grob trennenden Säulen unterzogen (Abbildung 3-4, Abbildung 3-5 und Abbildung 3-11). Hierbei konnte beobachtet werden, dass der gesuchte Elicitor sowohl des hitzebehandelten Zellextraktes als auch des Kulturextraktes einen höheren isoelektrischen Punkt als pH 8,5 haben muss, da er unter den gewählten Bedingungen nicht an den Anionentauscher binden konnte (Abbildung 3-5 und Abbildung 3-11). Ethylen induzierende Aktivität konnte nur im Durchfluss detektiert werden. Den jeweiligen Proteinprofilen ist jedoch zu entnehmen, dass die Komplexität der Proteine im jeweiligen Durchfluss deutlich reduziert worden ist. Die quantitative Auswertung der Anionenaustauschchromatographien beider Extrakte ergab eine Reduktion des Proteingehalts um circa 50 % (Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4). Das Reinigungspotential dieses Schrittes ist demnach, trotz fehlender Bindung und somit nicht möglicher Auftrennung durch einen Gradienten, als sehr hoch einzustufen.

Zur Trennung der im jeweiligen Durchfluss verbliebenen immunogen aktiven Proteine von inaktiven wurden in der Folge feiner trennende Säulen verwendet.

4.1.1 Feintrennende, säulenchromatographische Reinigung des hitzebehandelten Zellextraktes

Nach feintrennendem Kationenaustausch konnte nur eine geringe Trennungskapazität beobachtet werden. Wenngleich sich die Proteinprofile der gewonnenen Fraktionen teilweise deutlich unterscheiden, so verteilt sich Ethylen induzierende Aktivität doch nahezu über den gesamten Elutionsbereich (Abbildung 3-6). Dafür könnten folgende Gründe ursächlich sein:

- 1) Die Komplexität des an die Säulenmatrix gebundenen Materials führte während der Elution zu einer gegenseitigen Beeinflussung der Proteine untereinander.

Zwar wurde bei allen Chromatographieläufen darauf geachtet, die Ladekapazität der Säule nicht zu überschreiten, der Einfluss bereits eluierter Proteine auf noch gebundene konnte vorher jedoch nicht abgeschätzt werden. Dieser Einfluss scheint durch Rechromatographie verringert zu werden, wie die verfeinerte Trennung aktiver Proteine nach Rechromatographie nahe legen (siehe 4.1.2). Es ist sehr wahrscheinlich, dass die Trennschärfe der Kationenaustauschsäule durch eine Rechromatographie mit z. B. aktiven Einzelfractionen hätte gesteigert werden können.

- 2) Der gesuchte Elicitor wurde im Laufe der vorhergehenden Reinigungsprozesse z. B. durch partiellen Verdau modifiziert.

Wie ausführlicher unter 4.5 diskutiert, hätte die Modifikation eines Proteins veränderte chemische Eigenschaften zur Folge. Somit ist nicht auszuschließen, dass das heterogene Elutionsverhalten der immunogenen Aktivität auf partielle chemische Veränderungen zurückzuführen ist. Durch die zu Beginn erfolgte Hitzebehandlung des Zellextraktes kann proteolytische Aktivität z.B. von *R. solanacearum* eigenen Proteasen jedoch so gut wie ausgeschlossen werden.

- 3) *R. solanacearum* besitzt mehrere Elicitoren mit jeweils unterschiedlichem Retentionsverhalten.

Ähnlich wie unter 2) diskutiert, sollten sich verschiedene Elicitoren auch in ihren chemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Im vorliegenden Fall könnten zwei oder mehr Elicitoren mit unterschiedlichem Retentionsverhalten zu der beobachteten Verteilung bzw. Überlappung immunogener Aktivität über mehrere Fraktionen geführt haben.

Für die nachfolgenden Reinigungen mittels Gelfiltration oder Anionenaustausch bei pH 11,1 wurden relativ viele aktive Fraktionen miteinander vereinigt (Abbildung 3-6, roter Rahmen), mit dem Nachteil, dass die durch den feintrennenden Kationenaustausch erreichten Trennungen teilweise wieder rückgängig gemacht wurden. Lediglich für die auf hydrophober Interaktion basierende Chromatographie wurden nur die in ihrem Proteinprofil recht ähnlichen Fraktionen 9 und 10 miteinander vereint und eingesetzt (Abbildung 3-6,

grüner Rahmen). Dies führte dazu, dass nach erfolgter hydrophober Interaktionschromatographie das Proteinprofil der Ethylen induzierenden Fraktionen eine im Vergleich zu feintrennendem Anionenaustausch und Gelfiltration deutlich geringere Komplexität aufwies (Abbildung 3-10).

4.1.2 Feintrennende, säulenchromatographische Reinigung des Kulturextraktes

Der Kationenaustausch mit feintrennender Säule, durchgeführt mit den im Anionenaustausch bei pH 8,5 nicht gebundenen Proteinen des Kulturextraktes, führte zu zwei Ethylen induzierenden Aktivitätsbereichen (Abbildung 3-12). Ein Großteil der für diesen Chromatographielauf eingesetzten Proteine eluierte bereits vor diesen Fraktionen und zeigte keine nennenswerte Ethyleninduktion. Nach quantitativer Auswertung des Chromatographielaufes konnte festgestellt werden, dass circa $\frac{3}{4}$ nicht aktiver Proteine durch diesen Reinigungsschritt aus dem Durchfluss des Anionenaustausches entfernt werden konnten. Im Gegensatz zum feintrennenden Kationenaustausch mit den Proteinen des hitzebehandelten Zellextraktes konnte hierbei also eine besonders hohe Reinigungseffizienz erreicht werden. Die Proteinmenge des ersten Aktivitätsbereiches entspricht nur noch etwa 16 %, die des zweiten Aktivitätsbereiches sogar nur noch circa 7 % der für diesen Chromatographielauf eingesetzten Proteine (Tabelle 3-4). Gründe dafür könnten die nochmals verringerte Beladung der Kationenaustauschsäule oder die geringere Komplexität des geladenen Proteinmaterials sein, die in der Folge zu einer verringerten gegenseitigen Beeinflussung der Proteine untereinander während der Elution geführt haben könnten. Dass Menge und Komplexität des geladenen Materials wichtige Faktoren für die Trennungseffizienz von Chromatographiesäulen sind, wird durch die Ergebnisse der Rechromatographien untermauert. Dazu wurden drei Fraktionen des ersten Aktivitätspeaks zum Pool A und zwei Fraktionen des zweiten Aktivitätsbereiches zum Pool B vereinigt (Abbildung 3-12, rote Rahmen). Durch den erneuten Kationenaustausch sollte der in den jeweiligen Pools

enthaltene Elicitor zum einen angereichert und zum anderen eventuelle Überlappungen der beiden Elicitoraktivitäten verringert werden, um somit beide Aktivitätsbereiche vollends voneinander zu trennen. Die Proteinprofile zeigten für beide Rechromatographien eine nochmals gesteigerte Reinheit der Ethylen induzierenden Fraktionen (Abbildung 3-13). Bezogen auf den ursprünglich eingesetzten Kulturextrakt enthielten die aktiven Fraktionen der Rechromatographie A nur noch circa 6,6 %, die der Rechromatographie B sogar nur noch circa 2,66 % der Proteinmenge (Tabelle 3-4).

Die Reinheit des in der Fraktion 18 der Rechromatographie A enthaltenen Elicitors konnte durch den Anionenaustausch A bei pH 11,1 nochmals gesteigert werden (Abbildung 3-14, Fraktion 11). Das gleiche gilt für die Fraktion 10 des Anionenaustauschs B (Abbildung 3-15) mit den vereinten Fraktionen 22 und 23 der Rechromatographie B (Abbildung 3-13). Aufgrund der geringen Proteinkonzentration, die eine exakte Proteinquantifizierung nicht zuließ, kann hier über die Reinigungseffizienz nur durch einen optischen Vergleich der nach SDS-Page erhaltenen Proteinprofile spekuliert werden.

Nachfolgende Charakterisierungsexperimente und die Bestimmung des EC_{50} -Wertes wurden aus diesem Grund mit jeweils vereinten Fraktionen der Rechromatographien A und B durchgeführt (Abbildung 3-13, rote Rahmen).

Abschließend kann festgehalten werden, dass der Elicitor aus dem Kulturextrakt durch die gewählten säulenchromatographischen Trennverfahren eine deutlich höhere Reinheit erlangt hat als der aus dem hitzebehandelten Zellextrakt (Tabelle 3-3 und Tabelle 3-4). Da der Kulturextrakt zudem einen niedrigeren EC_{50} -Wert aufweist und somit im Verhältnis mehr immunogene Proteine enthält, ist er als Ausgangsmaterial für weitere Reinigungen von RsE dem Zellextrakt eindeutig vorzuziehen. Desweiteren sollte der Kulturextrakt auch während der Kultivierung von *R. solanacearum* ins Medium sekretierte Proteine enthalten. Ob es sich bei dem gesuchten Elicitor um ein sekretiertes Protein handelt, kann an dieser Stelle jedoch nicht abschließend geklärt werden. Der Zellextrakt zeigt ebenso wie der Kulturextrakt ein hohes Potential in *A. thaliana* Immunantworten zu induzieren, sollte aber lediglich für Sekretion vorgesehene aber keine bereits translozierten Proteine enthalten. Dass intrazelluläre Moleküle

potente Elicitoren von Immunantworten sind, konnte in tierischen und pflanzlichen Systemen bereits gezeigt werden (Wagner, 1999; Hemmi et al., 2000; Kunze et al., 2004). Vom bakteriellen Elongationsfaktor EF-Tu ist darüber hinaus bekannt, dass ein hypoosmotischer Schock zu einer Sekretion des Proteins in *E. coli* führen kann (Berrier et al., 2000).

Welche Lehren können aus den bisher durchgeführten Reinigungsschritten gezogen werden, und welche Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten zur Identifikation von RsE gibt es?

Als Quelle der Aufreinigung stellt der Kulturextrakt das geeignetere Ausgangsmaterial dar. Zwar sollte eine finale Aufreinigung der im Zellextrakt enthaltenen immunogenen Aktivität ebenfalls möglich sein, jedoch scheint auf Grundlage der vorliegenden Daten die Aufreinigung von RsE aus dem Kulturextrakt schneller zum Ziel zu führen. Dabei stellen der Anionenaustausch bei pH 8,5 und der feintrennende Kationenaustausch mit den beim Anionenaustausch bei pH 8,5 nicht gebundenen Proteinen potente FPLC-Reinigungsschritte dar. Weitere säulenchromatographische Methoden wie Hydrophobe Interaktionschromatographie oder Chromatofokussierung könnten darüber hinaus den Elicitor weiter aufreinigen.

Die Befunde nach Inkubation von vorgereinigten *R. solanacearum* Extrakten mit selten schneidenden Proteasen und Chemikalien sind ein ebenfalls vielversprechender Ansatz. Die durch diese Behandlung erhaltenen immunogen aktiven Peptide sollten mittels HPLC, deren Säulen die Trenneigenschaften von FPLC-Säulen übertreffen, isoliert und in der Folge einem *R. solanacearum* Protein zugeordnet werden können.

Eine gänzlich andere Strategie würde die Identifikation des RsE-Rezeptors eröffnen. Durch z.B. Coimmunopräzipitation könnte RsE über seine Bindung an diesen Rezeptor identifiziert werden.

4.2 Fügt sich RsE in das MAMP-Konzept ein?

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass *R. solanacearum* mit RsE einen bisher noch nicht identifizierten Elicitor pflanzlicher Abwehrreaktionen enthält. Dass sich dieser mit seinen Eigenschaften in das klassische MAMP-Konzept einfügt, kann jedoch nicht eindeutig geschlussfolgert werden. Erst die endgültige Identifikation von RsE kann klären, ob es sich bei diesem Elicitor um ein MAMP, also eine konservierte, mikrobielle Struktur handelt, die in einer großen Gruppe von Bakterien vorkommt.

Einige in der vorliegenden Arbeit erhaltene Befunde decken sich jedoch mit Eigenschaften anderer, bereits bekannter MAMPs:

1) Das immunogene Potenzial von RsE wird durch Hitzebehandlung nicht verringert (Abbildung 3-1); die Behandlung mit Proteinase K dagegen resultiert in einem Verlust der immunogenen Aktivität (Abbildung 3-3). Demnach ist RsE ein hitzestabiler, proteinogener Elicitor. Die Hitzestabilität deutet zudem darauf hin, dass es als Molekülstruktur nicht aber als Enzymaktivität detektiert wird.

2) RsE löst in *A. thaliana* für MAMPs typische, immunassoziierte Reaktionen aus. Es induziert die Bildung von Ethylen und reaktiven Sauerstoffspezies, den Anstieg des extrazellulären pH-Wertes in pflanzlichen Zellkulturen, die Bildung von Kallose, die Expression immunassoziiierter Abwehrgene und die Aktivierung von MAP-Kinasen (Abbildung 3-26, Abbildung 3-25, Abbildung 3-27, Abbildung 3-29, Abbildung 3-30 und Abbildung 3-31).

3) RsE ist dabei bereits in sehr niedrigen und physiologisch erwartbaren Konzentrationen wirksam (Tabelle 3-9 und Tabelle 3-10), wie sie für andere MAMPs wie Chitin, Flagellin oder EF-Tu ebenfalls beobachtet werden konnten (Felix et al., 1993; Felix et al., 1999; Kunze et al., 2004). Der für die Ethyleninduktion ermittelte EC_{50} -Wert von RsE-A liegt bei 0,3 ng/ μ l, der von RsE-B bei 0,065 ng/ μ l. Da noch nicht bekannt ist, welche Proteine RsE-A und RsE-B repräsentieren, können in diesem Zusammenhang molare Konzentrationen lediglich abgeschätzt werden. Demzufolge hätte RsE-A für Molekulargewichte zwischen 30 und 10 kDa ein EC_{50} -Wert von 10 bis 30 nM; RsE-B besitzt für diesen Größenbereich einen EC_{50} -Wert von 2,2 bis 6,5 nM (Tabelle 3-10). Das Proteinprofil der Rechromatografiefraktionen A17 – A19 und B22 – B24

(Abbildung 3-13, rote Rahmen), die jeweils als Elicitoraktivitäten RsE-A und RsE-B miteinander vereint wurden, zeigt jedoch noch immer mindestens fünf Proteine, die in allen drei jeweils vereinten Fraktionen enthalten sind. Die Identifikation der Proteine in aktiven Fraktionen der nachfolgend durchgeführten Anionenaustauschchromatographien A und B (Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15) erbrachte darüber hinaus 32 bzw. 25 verschiedene Proteine in jeweils einer aktiven AAC-Fraktion (siehe 3.2.2). Es ist darum sehr wahrscheinlich, dass der EC_{50} -Wert für den eigentlichen *R. solanacearum* Elicitor noch deutlich niedriger liegt und RsE Immunantworten in *A. thaliana* bereits im pikomolaren Bereich zu stimulieren vermag.

4) Sowohl RsE-A als auch RsE-B, die durch Kationenaustausch identifizierten und voneinander getrennten Elicitoraktivitäten, induzieren eine starke Medienalkalisierung nicht nur in Zellkulturen von *A. thaliana*, sondern auch in Zellkulturen von *N. benthamiana* und Tomate MsK8 (Abbildung 3-28). Dass RsE auch bei Vertretern anderer Pflanzenfamilien als den Brassicaceen und Solanaceen immunogenes Potential besitzt, ist wahrscheinlich, kann abschließend aber erst durch zusätzliche Tests geklärt werden. In *O. sativa*, einem Vertreter der Einkeimblättrigen Pflanzen, konnte kein Anstieg des extrazellulären pH-Wertes, ausgelöst durch RsE, gemessen werden, ein Hinweis darauf, dass RsE in monokotylen Pflanzen möglicherweise nicht als Elicitor erkannt wird. Nähere Aussagen darüber können wiederum erst nach zusätzlichen Untersuchungen an weiteren Vertretern Einkeimblättriger Pflanzen getroffen werden.

5) Die Auftrennung vorgereinigter *R. solanacearum* Proteine nach ihrer Größe durch Gelfiltration resultierte in zwei Aktivitätspeaks, die in Relation zu ihrer Retentionszeit mit Molekulargewichten von 20 – 30 kDa und < 13 kDa korrespondierten (siehe 3.1.1 und Abbildung 3-9). Dieser Befund deckt sich mit Beobachtungen von Pfund et al., 2004, die ebenfalls proteinogene Immunaktivität in diesem Größenbereich detektieren konnten.

6) In *A. thaliana bak1-5*-Mutanten konnten weder RsE-A noch RsE-B die Bildung von Kallose stimulieren (Abbildung 3-30). Die Aktivierung der MAP-Kinasen MPK3 und MPK6 fiel in diesen Mutanten ebenfalls deutlich schwächer aus, als für *A. thaliana fls2 x efr* beobachtet (Abbildung 3-31). BAK1 ist als

positiver Regulator der LRR-RLKs FLS2, EFR und BRI1 bekannt (Chinchilla et al., 2007; Heese et al., 2007). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass BAK1 auch für die Perzeption von RsE-A und RsE-B von Bedeutung ist und die durch sie hervorgerufenen Immunantworten auf der Erkennung durch einen auf der Zelloberfläche lokalisierten Mustererkennungsrezeptor der Familie der Leucinreichen Rezeptorähnlichen Kinasen basiert (Chinchilla et al., 2009).

Somit ist es wahrscheinlich, dass die endgültige Identifikation von RsE diesen Elicitor als mikrobielle, konservierte Struktur einer Vielzahl von Bakterien und somit als MAMP ausweist, wie es das klassische Konzept von Medzhitov und Janeway, 1997 postuliert.

4.3 Welches Protein repräsentiert RsE?

Nach der mehrstufigen Aufreinigung von Zell- und Kulturextrakt wurden die verbliebenen immunogenen Proteine über ihren Massenfingerabdruck identifiziert, um in der Folge mögliche Kandidaten für den gesuchten *R. solanacearum* Elicitor benennen zu können. Die zur Analyse benutzten Fraktionen zeigten nach SDS-PAGE eine recht unkomplexe Proteinzusammensetzung (Abbildung 3-16 und Abbildung 3-17). Dennoch wurden für die vorgereinigten Fraktionen des Zellextraktes noch 37 Proteine, für die des Kulturextraktes noch 36 Proteine identifiziert (Tabelle 7-2 und Tabelle 7-3).

Die identifizierten *R. solanacearum* Proteine enthalten bis auf *R. solanacearum* EF-Tu keine bereits bekannten MAMPs. Diesen Schluss legen BLAST-Analysen nahe, die für die erhaltenen *R. solanacearum* Sequenzen keine Homologien zu bereits identifizierten MAMPs zeigten. Dass es sich bei RsE um EF-Tu handelt ist aus folgendem Grund sehr unwahrscheinlich: Zwischen *E. coli* EF-Tu und *R. solanacearum* EF-Tu besteht eine Sequenzhomologie von 81 %. Untersuchungen von Kunze et al., 2004 konnten zeigen, dass das Peptid elf12, welches selbst keine Elicitoraktivität besitzt, als Antagonist für die Perzeption

sowohl von *E. coli* EF-Tu als auch von *R. solanacearum* Proteinen wirkt und eine Medienalkalisierung durch diese inhibieren kann. Somit scheinen sowohl *E. coli* EF-Tu als auch *R. solanacearum* EF-Tu durch denselben Rezeptor detektiert zu werden. Die immunogene Aktivität, die RsE auch in der Rezeptormutante *A. thaliana fls2 x efr* zeigt, schließt somit EF-Tu als Repräsentant für RsE nahezu aus.

Nach der BLAST-Analyse der ermittelten Sequenzen wurden besonders konservierte Proteine beider Extrakte mit einem isoelektrischen Punkt > pH 8,5 zur heterologen Expression in *E. coli* ausgewählt (Tabelle 3-5 und Tabelle 3-6).

Die Proteine *DNA-binding protein HU-beta* (HUB), *50S ribosomal protein L27* (L27), *signal peptide protein* (SCON) und *lipoprotein signal peptidase* (LSP) wurden in der Folge in *E. coli* (Rosetta) exprimiert, zeigten in *A. thaliana* jedoch keine nennenswerten, über die Leerkontrolle hinausgehende Ethyleninduktion (Abbildung 3-19). Eine naheliegende Erklärung dafür ist die Möglichkeit, dass keines der vier Proteine den *R. solanacearum* Elicitor RsE repräsentiert. Desweiteren könnten aber auch posttranslationale Modifikationen, die von *R. solanacearum* nicht aber von *E. coli* an den Proteinen vorgenommen werden, wichtig für eine Bindung an den korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor sein. Somit könnte ein in *E. coli* heterolog exprimiertes MAMP von *R. solanacearum* aufgrund der fehlenden Modifikation nicht detektiert werden. Dass posttranslationale Modifikationen bei der MAMP-Perzeption von Bedeutung sind, zeigt beispielsweise das deutlich höhere immunogene Potential der N-acetylierten Form des auf EF-Tu basierenden Peptids efl18 gegenüber der nicht acetylierten Form (Kunze et al., 2004).

Im vorliegenden Fall hatte die Inkubation von RsE-A und RsE-B mit Peptid-N-Glykosidase F (PNGase F) keine Verringerung der Ethylen induzierenden Aktivität zur Folge (Abbildung 3-32). Diese Ergebnisse deuten zwar darauf hin, dass eine N-Glykosylierung des *R. solanacearum* Elicitors nicht essentiell für das Auslösen einer Immunantwort ist, aufgrund einer fehlenden Positivkontrolle für die Deglykosylierung eines Elicitors kann jedoch keine endgültige Aussage getroffen werden. Inwieweit das gesuchte MAMP andere posttranslationale Veränderungen trägt, die für die Induktion einer Immunantwort von Bedeutung sind, kann anhand der bisher erhobenen Daten nicht beurteilt werden. Für

zukünftige Versuche, den *R. solanacearum* Elicitor zu identifizieren, wird es darum notwendig sein, eventuell vorhandene Proteinmodifikationen z.B. durch MALDI-TOF-MS-Analysen zu identifizieren und für das weitere Vorgehen zu berücksichtigen.

Eine weitere Methode, potentielle MAMPs einem bestimmten Protein zuzuordnen, bestand in der Überprüfung immunogener Aktivität von *R. solanacearum* Peptiden. Dazu wurden Peptide synthetisiert, die sich aus besonders konservierten Bereichen der Proteine *lipoprotein signal peptidase* (LSP) und *signal peptide protein* (SPP) ableiteten (Abbildung 7-1 und Abbildung 7-2). Für die Proteine SPP und *alanin-rich signal peptide protein* (ARS) wurden zudem jeweils zehn, sich überlappende Peptide synthetisiert, die die komplette Sequenz der beiden Proteine abdecken (Abbildung 7-3 und Abbildung 7-4). In der anschließenden Überprüfung konnte jedoch für keines der gewählten Peptide immunogene Aktivität in physiologisch relevanten Konzentrationen gemessen werden (Abbildung 3-20, Abbildung 3-21, Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23). Die Peptide SPP3 und SPP5 sowie ARS8 und ARS9 zeigten zwar eine leichte Induktion von Ethylen in *A. thaliana*, waren aber nicht in der Lage, in *A. thaliana* Zellkulturen eine Medienalkalisierung hervorzurufen (Abbildung 3-21, Abbildung 3-22 und Abbildung 3-23). Da in Zellkulturen von *N. benthamiana* und Tomate MsK8 ebenfalls keine eindeutige Aktivität mit einem durch die getesteten Peptide repräsentierten Sequenzbereich korreliert werden konnte, ist davon auszugehen, dass die untersuchten Peptide kein immunogenes Potential besitzen.

Als Kandidaten für das gesuchte *R. solanacearum* MAMP können die zur Peptidableitung herangezogenen Proteine dennoch nicht endgültig ausgeschlossen werden. Es besteht die Möglichkeit, dass die getesteten Peptide in ihren Sequenzen das Erkennungsmotiv nicht vollständig abdecken. Weitere Peptide mit längeren und/oder in ihrem Korrelationsbereich verschobenen Sequenzen sollten untersucht werden. Zudem könnten den untersuchten Peptiden, ähnlich den heterolog exprimierten Proteinen, Modifikationen fehlen, die für eine volle Immunantwort notwendig sind, sodass auch hier die Identifikation möglicher posttranslationaler Modifikationen in die zukünftige Arbeit einfließen sollte.

4.4 Enthält RsE ein Minimalmotiv für die Erkennung durch einen korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor?

Für viele bisher identifizierte und charakterisierte MAMPs konnte ein Minimalmotiv für die Perzeption durch den korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor ermittelt werden. Beispiele hierfür sind das Peptid flg22, das sich von einem besonders konservierten Bereich am N-Terminus von Flagellin ableitet (Felix et al., 1999) oder das Peptid elf18, welches die ersten 18 Aminosäuren von Ef-Tu umfasst (Kunze et al., 2004). Auch im Fall von Chitin konnte gezeigt werden, dass Oligomere mit vier bis sieben N-Acetylglucosaminresten niedrigere EC_{50} -Werte aufweisen als längerkettige Oligomere (Felix et al., 1993).

Für die Perzeption von RsE muss das Protein nicht in seiner gesamten Länge vorliegen. Dies zeigen Untersuchungen nach Inkubation mit selten schneidenden Proteasen und Cyanogenbromid (siehe 3.3.3). Nach der Behandlung mit der Endopeptidase AspN war die Ethen induzierende Aktivität von RsE-A unverändert, die Aktivität von RsE-B hingegen war reduziert, lag jedoch noch deutlich über der Hintergrundaktivität der Wasserkontrolle. Im Fall von RsE-A lässt das Ergebnis zwei Schlussfolgerungen zu:

- 1) RsE-A wurde nicht von AspN geschnitten, da es entweder keine Aspartatreste enthält oder die Reaktionsbedingungen für den Verdau von RsE-A für eine funktionelle Endopeptidase AspN falsch gewählt waren.

Letzteres ist unwahrscheinlich, da die nach der Inkubation erfolgte Kontrolle mittels silbergefärbter Tricin-SDS-PAGE, einen vollständigen Verdau bestätigte (Abbildung 3-34). Generell kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die ermittelte residuale Aktivität durch unvollständigen Verdau ausgelöst wurde.

- 2) Die Veränderung in der Struktur von RsE-A durch AspN ist für die Erkennung durch den Mustererkennungsrezeptor nicht von Bedeutung.

Dies bedeutet, dass das Minimalmotiv von RsE-A noch intakt ist und die durch die Endopeptidase freigesetzten RsE-A-Peptide keine größere Affinität zum korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor aufweisen als das native Protein RsE-A.

Die reduzierte Aktivität von RsE-B nach AspN-Behandlung lässt hingegen darauf schließen, dass mindestens eine Schnittstelle der Peptidase innerhalb des Erkennungsmotivs für den Mustererkennungsrezeptor liegt. Dieser Schnitt scheint die Erkennungssequenz aber nicht so weit zerstört zu haben, dass eine Bindung an den korrespondierenden Rezeptor und eine darauf folgende Immunantwort nicht mehr möglich war.

Nach Inkubation mit der Endopeptidase GluC war nur bei RsE-B noch Ethyleninduktion messbar, die Aktivität von RsE-A wurde durch diese Behandlung zerstört. Die Reduktion der Aktivität von RsE-B durch GluC könnte sich wiederum auf ein Schneiden innerhalb des Erkennungsmotives von RsE-B zurückführen lassen, ähnlich den Beobachtungen nach AspN-Verdau. Dem Verlust von RsE-A, nach Inkubation mit GluC Ethylenbildung zu induzieren, liegt wahrscheinlich die Zerstörung der Erkennungssequenz durch die Peptidase zugrunde.

Nach der Behandlung von RsE-A mit Cyanogenbromid konnte eine deutlich höhere Induktion von Ethylen gemessen werden, als mit der unbehandelten Proteinfraction. In diesem Fall scheint Cyanogenbromid aus dem intakten Protein Peptide zu entlassen, die eine deutlich höhere Affinität zu ihrem korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor haben als der native Elicitor RsE-A. Ähnliche Beobachtungen wurden für die oben bereits erwähnten MAMP – Peptide-Paare Flagellin – flg22, Elongationsfaktor Tu – elf18 und Chitin – N-Acetylglucosaminoligomere bereits beschrieben. Die immunogene Aktivität von RsE-B wurde durch Behandlung mit Cyanogenbromid deutlich reduziert. Es ist wahrscheinlich, dass hierbei eine Schnittstelle der Protease innerhalb des Erkennungsmotivs von RsE-B liegt, sodass das aus dem Verdau resultierende Peptid eine deutlich geringere Affinität zum korrespondierenden Rezeptor für RsE-B besitzt.

4.5 Sind RsE-A und RsE-B auf dasselbe Protein zurückzuführen?

Die Größentrennung vorgereinigter Proteine des hitzebehandelten Zellextraktes durch Gelfiltration resultierte in zwei, voneinander getrennten Aktivitätsbereichen (Abbildung 3-9). Im Laufe der Aufreinigung der Proteine des Kulturextraktes wurden nach Kationenaustausch mit feintrennender Säule zwei Aktivitätspeaks detektiert (Abbildung 3-13), die in der Folge durch Rechromatographie korrespondierender Proteinpools weiter voneinander getrennt werden konnten (Abbildung 3-12) und jeweils als RsE-A und RsE-B bezeichnet wurden. Es stellt sich nun die Frage, ob es sich bei den getrennten Elicitoraktivitäten nach Gelfiltration und bei den Aktivitäten von RsE-A und RsE-B um ein und dasselbe Protein mit jeweils unterschiedlichen Modifikationen oder aber um zwei verschiedene Proteine handelt.

Geht man davon aus, dass die Elicitoraktivitäten nur durch eine Proteinspezies repräsentiert werden, so könnte ihr unterschiedliches Retentionsverhalten bei Gelfiltration oder Kationenaustausch durch eine Modifikation während des Aufreinigungsprozesses erklärt werden. Diese Veränderung, z.B. durch einen partiellen Verdau des nativen Proteins oder die Abspaltung posttranslational angefügter Gruppen, hätte eine Änderung der Größe und der chemischen Eigenschaften des nativen Proteins und somit das beobachtete veränderte Retentionsverhalten zur Folge.

Gegen die Annahme, beide Elicitoraktivitäten sind auf ein und dasselbe Protein zurückzuführen, sprechen jedoch einige, in der vorliegenden Arbeit erhaltene Befunde.

- 1) Die oben bereits diskutierte Behandlung mit den selten schneidenden Proteasen AspN, GluC und der Chemikalie Cyanogenbromid führte in allen drei Fällen für RsE-A zu anderen Ergebnissen als für RsE-B. Die Inkubation mit Cyanogenbromid resultierte im Fall von RsE-B nicht in einer Erhöhung der Elicitoraktivität, wie es für RsE-A zu beobachten war. Desweiteren zerstörte die Behandlung mit GluC die Elicitoraktivität von RsE-A, nicht aber die von RsE-B, und AspN-Behandlung zeigte für RsE-

B eine Reduktion der Ethylen induzierenden Aktivität, hatte aber auf RsE-A keinerlei Auswirkung.

- 2) RsE-A ist in der Lage einen Anstieg des extrazellulären pH-Wertes in Zellkulturen von *N. benthamiana* und Tomate MsK8 zu induzieren. RsE-B vermag dies lediglich in Zellkulturen von *N. benthamiana*.

Demnach ist es nicht unwahrscheinlich, dass RsE-A und RsE-B von zwei verschiedenen Proteinspezies repräsentiert werden. Dass dies für die nach Gelfiltration erhaltenen Aktivitäten ebenso zutrifft, kann nicht so einfach spekuliert werden, da außer den unterschiedlichen Retentionszeiten während der Gelfiltration keine Ergebnisse vorliegen, die nicht auch durch die These erklärt werden können, dass das native Protein im Laufe der Aufreinigung einer teilweisen Modifikation unterworfen war.

Eine endgültige Aussage darüber, ob *R. solanacearum* mehr als einen bisher unbekanntem Elicitor enthält, kann jedoch erst nach der Identifikation der für diese Elicitoraktivitäten ursächlichen Proteine getroffen werden.

5. Zusammenfassung

Mikroben-assoziierte molekulare Muster (MAMPs) sind Elicitoren tierischer und pflanzlicher Immunreaktionen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Gram-negative Bakterium *R. solanacearum* mindestens einen bisher nicht identifizierten Elicitor besitzt, der nicht Flagellin oder EF-Tu ist. Mittels säulenchromatographischer Methoden wurde aus Rohextrakten von *R. solanacearum* immunogene Aktivität aufgereinigt. Es zeigte sich, dass diese Aktivität auf der Perzeption mindestens eines hitzestabilen Proteins basischen Charakters durch *A. thaliana* basiert. Durch Größenausschlusschromatographien ist dabei eine Molekülgröße von weniger als 30 kDa anzunehmen.

Für MAMPs typische Immunreaktionen wie Medienalkalisierung, Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Ethylen, sowie Induktion von immunassoziierten Genen und Kalloseeinlagerung konnten beobachtet werden, wobei der Elicitor bereits bei Konzentrationen von ≤ 30 nM immunogen aktiv war. Auf der Grundlage von Aktivitätsmessungen nach Behandlungen mit selten schneidenden Proteasen und Chemikalien ist es wahrscheinlich, dass der Elicitor nicht als Vollängenprotein vorliegen muss, sondern ein für das Auslösen einer Immunreaktion geeignetes Minimalmotiv zur Bindung an einen korrespondierenden Mustererkennungsrezeptor besitzt.

Einige Vertreter bisher identifizierter MAMP-Rezeptoren der Familie der rezeptorähnlichen Kinasen mit Leucin-reichen Wiederholungen besitzen mit BAK1 einen essentiellen Korezeptor aus derselben Familie. Die Daten der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass auch bei der Perzeption des *R. solanacearum* Elicitors BAK1 als Korezeptor fungiert, und somit der eigentliche Rezeptor des *R. solanacearum* Elicitors der Familie der rezeptorähnlichen Kinasen angehört.

Neben *A. thaliana* zeigte der Elicitor auch in *N. benthamiana* und Tomate Msk8 immunogene Aktivität. Es ist somit wahrscheinlich, dass er in einer Vielzahl von Pflanzen verschiedener Familien eine Immunreaktion hervorruft.

6. Literaturverzeichnis

- 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.
- Apel, K., and Hirt, H.** (2004). REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 373-399.
- 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.
- Bailey, B.A.** (1995). Purification of a Protein from Culture Filtrates of *Fusarium oxysporum* that Induces Ethylene and Necrosis in Leaves of *Erythroxylum coca*. *Phytopathology* **85**, 1250–1255.
- Basse, C.W., Fath, A., and Boller, T.** (1993). High affinity binding of a glycopeptide elicitor to tomato cells and microsomal membranes and displacement by specific glycan suppressors. *J Biol Chem* **268**, 14724-14731.
- Baureithel, K., Felix, G., and Boller, T.** (1994). Specific, high affinity binding of chitin fragments to tomato cells and membranes. Competitive inhibition of binding by derivatives of chitooligosaccharides and a Nod factor of *Rhizobium*. *J Biol Chem* **269**, 17931-17938.
- Berrier, C., Garrigues, A., Richarme, G., and Ghazi, A.** (2000). Elongation Factor Tu and DnaK Are Transferred from the Cytoplasm to the Periplasm of *Escherichia coli* during Osmotic Downshock Presumably via the Mechanosensitive Channel MscL. *Journal of Bacteriology* **182**, 248-251.
- 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. *The Plant Cell Online* **12**, 1425-1440.
- Boller, T.** (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Current Opinion in Cell Biology* **17**, 116-122.

- Boller, T., and Felix, G.** (2009). A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 379-406.
- Bolton, M.D., Van Esse, H.P., Vossen, J.H., De Jonge, R., Stergiopoulos, I., Stulemeijer, I.J.E., Van Den Berg, G.C.M., Borrás-Hidalgo, O., Dekker, H.L., De Koster, C.G., De Wit, P.J.G.M., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2008). The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species. *Mol Microbiol* **69**, 119-136.
- Bos, J.I.B., Kanneganti, T.-D., Young, C., Cakir, C., Huitema, E., Win, J., Armstrong, M.R., Birch, P.R.J., and Kamoun, S.** (2006). The C-terminal half of *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Journal* **48**, 165-176.
- Boutrot, F., Segonzac, C., Chang, K.N., Qiao, H., Ecker, J.R., Zipfel, C., and Rathjen, J.P.** (2010). Direct transcriptional control of the Arabidopsis immune receptor FLS2 by the ethylene-dependent transcription factors EIN3 and EIL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- Bozkurt, T.O., Schornack, S., Banfield, M.J., and Kamoun, S.** (2012). Oomycetes, effectors, and all that jazz. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 483-492.
- Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nurnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J* **21**, 6681-6688.
- Buell, C.R., Joardar, V., Lindeberg, M., Selengut, J., Paulsen, I.T., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Deboy, R.T., Durkin, A.S., Kolonay, J.F., Madupu, R., Daugherty, S., Brinkac, L., Beanan, M.J., Haft, D.H., Nelson, W.C., Davidsen, T., Zafar, N., Zhou, L., Liu, J., Yuan, Q., Khouri, H., Fedorova, N., Tran, B., Russell, D., Berry, K., Utterback, T., Van Aken, S.E., Feldblyum, T.V., D'Ascenzo, M., Deng, W.-L., Ramos, A.R., Alfano, J.R., Cartinhour, S., Chatterjee, A.K., Delaney, T.P., Lazarowitz, S.G., Martin, G.B., Schneider, D.J., Tang, X., Bender, C.L., White, O., Fraser, C.M., and Collmer, A.** (2003). The complete genome sequence of the Arabidopsis and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 10181-10186.
- Cabrera, J.C., Boland, A., Messiaen, J., Cambier, P., and Van Cutsem, P.** (2008). Egg box conformation of oligogalacturonides: The time-dependent stabilization of the elicitor-active conformation increases its biological activity. *Glycobiology* **18**, 473-482.

- Cheng, W., Munkvold, Kathy R., Gao, H., Mathieu, J., Schwizer, S., Wang, S., Yan, Y.-b., Wang, J., Martin, Gregory B., and Chai, J.** (2011). Structural Analysis of *Pseudomonas syringae* AvrPtoB Bound to Host BAK1 Reveals Two Similar Kinase-Interacting Domains in a Type III Effector. *Cell Host & Microbe* **10**, 616-626.
- Chinchilla, D., Shan, L., He, P., de Vries, S., and Kemmerling, B.** (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends Plant Sci* **14**, 535-541.
- Chinchilla, D., Zipfel, C., Robatzek, S., Kemmerling, B., Nurnberger, T., Jones, J.D.G., Felix, G., and Boller, T.** (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-U412.
- 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.
- Colcombet, J., and Hirt, H.** (2008). Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes, pp. 217-226.
- Cosio, E.G., Frey, T., Verduyn, R., van Boom, J., and Ebel, J.** (1990). High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Letters* **271**, 223-226.
- D'Ovidio, R., Mattei, B., Roberti, S., and Bellincampi, D.** (2004). Polygalacturonases, polygalacturonase-inhibiting proteins and pectic oligomers in plant-pathogen interactions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1696**, 237-244.
- Da Cunha, L., Sreerekha, M.V., and Mackey, D.** (2007). Defense suppression by virulence effectors of bacterial phytopathogens. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 349-357.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Darvill, A.G., and Albersheim, P.** (1984). Phytoalexins and their Elicitors-A Defense Against Microbial Infection in Plants. *Annual Review of Plant Physiology* **35**, 243-275.
- de Jonge, R., van Esse, H.P., Kombrink, A., Shinya, T., Desaki, Y., Bours, R., van der Krol, S., Shibuya, N., Joosten, M.H.A.J., and Thomma, B.P.H.J.** (2010). Conserved Fungal LysM Effector Ecp6 Prevents Chitin-Triggered Immunity in Plants. *Science* **329**, 953-955.

- De Wit, P.J.G.M., Mehrabi, R., Van Den Burg, H.A., and Stergiopoulos, I.** (2009). Fungal effector proteins: past, present and future. *Mol Plant Pathol* **10**, 735-747.
- DebRoy, S., Thilmony, R., Kwack, Y.-B., Nomura, K., and He, S.Y.** (2004). A family of conserved bacterial effectors inhibits salicylic acid-mediated basal immunity and promotes disease necrosis in plants. *P Natl Acad Sci USA* **101**, 9927-9932.
- Denny, T.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In *Plant-Associated Bacteria*, S. Gnanamanickam, ed (Springer Netherlands), pp. 573-644.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 8024-8029.
- 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.
- 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.
- Enkerli, J., Felix, G., and Boller, T.** (1999). The Enzymatic Activity of Fungal Xylanase Is Not Necessary for Its Elicitor Activity. *Plant Physiol* **121**, 391-398.
- Erbs, G., Silipo, A., Aslam, S., De Castro, C., Liparoti, V., Flagiello, A., Pucci, P., Lanzetta, R., Parrilli, M., Molinaro, A., Newman, M.-A., and Cooper, R.M.** (2008). Peptidoglycan and Muropeptides from Pathogens *Agrobacterium* and *Xanthomonas* Elicit Plant Innate Immunity: Structure and Activity. *Chemistry & Biology* **15**, 438-448.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E.** (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 366-371.
- 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., Regenass, M., and Boller, T.** (1993). Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *The Plant Journal* **4**, 307-316.
- 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.
- Felix, G., Grosskopf, D.G., Regenass, M., Basse, C.W., and Boller, T.** (1991). Elicitor-Induced Ethylene Biosynthesis in Tomato Cells: Characterization and Use as a Bioassay for Elicitor Action. *Plant Physiol* **97**, 19-25.
- Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G., Kemmerling, B., Krzymowska, M., and Nurnberger, T.** (2002). NPP1, a Phytophthora-associated trigger of plant defense in parsley and Arabidopsis. *Plant J* **32**, 375-390.
- Fliegmann, J., Mithöfer, A., Wanner, G., and Ebel, J.** (2004). An Ancient Enzyme Domain Hidden in the Putative β -Glucan Elicitor Receptor of Soybean May Play an Active Part in the Perception of Pathogen-associated Molecular Patterns during Broad Host Resistance. *J Biol Chem* **279**, 1132-1140.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D., and Pugin, A.** (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant Defenses. *Mol Plant Microbe In* **19**, 711-724.
- Genin, S., and Denny, T.P.** (2012). Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *Annu Rev Phytopathol* **50**, 67-89.
- Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Ntoukakis, V., Petutschnig, E., Lipka, V., and Rathjen, J.P.** (2009). AvrPtoB Targets the LysM Receptor Kinase CERK1 to Promote Bacterial Virulence on Plants. *Current biology : CB* **19**, 423-429.
- Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G., and Boller, T.** (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **18**, 277-284.

- Granado, J., Felix, G., and Boller, T.** (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants (Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells). *Plant Physiol* **107**, 485-490.
- Gust, A.A., Biswas, R., Lenz, H.D., Rauhut, T., Ranf, S., Kemmerling, B., Gotz, F., Glawischnig, E., Lee, J., Felix, G., and Nurnberger, T.** (2007). Bacteria-derived peptidoglycans constitute pathogen-associated molecular patterns triggering innate immunity in Arabidopsis. *J Biol Chem* **282**, 32338-32348.
- Haas, B.J., Kamoun, S., Zody, M.C., Jiang, R.H.Y., Handsaker, R.E., Cano, L.M., Grabherr, M., Kodira, C.D., Raffaele, S., Torto-Alalibo, T., Bozkurt, T.O., Ah-Fong, A.M.V., Alvarado, L., Anderson, V.L., Armstrong, M.R., Avrova, A., Baxter, L., Beynon, J., Boevink, P.C., Bollmann, S.R., Bos, J.I.B., Bulone, V., Cai, G., Cakir, C., Carrington, J.C., Chawner, M., Conti, L., Costanzo, S., Ewan, R., Fahlgren, N., Fischbach, M.A., Fugelstad, J., Gilroy, E.M., Gnerre, S., Green, P.J., Grenville-Briggs, L.J., Griffith, J., Grunwald, N.J., Horn, K., Horner, N.R., Hu, C.-H., Huitema, E., Jeong, D.-H., Jones, A.M.E., Jones, J.D.G., Jones, R.W., Karlsson, E.K., Kunjeti, S.G., Lamour, K., Liu, Z., Ma, L., MacLean, D., Chibucos, M.C., McDonald, H., McWalters, J., Meijer, H.J.G., Morgan, W., Morris, P.F., Munro, C.A., O'Neill, K., Ospina-Giraldo, M., Pinzon, A., Pritchard, L., Ramsahoye, B., Ren, Q., Restrepo, S., Roy, S., Sadanandom, A., Savidor, A., Schornack, S., Schwartz, D.C., Schumann, U.D., Schwessinger, B., Seyer, L., Sharpe, T., Silvar, C., Song, J., Studholme, D.J., Sykes, S., Thines, M., van de Vondervoort, P.J.I., Phuntumart, V., Wawra, S., Weide, R., Win, J., Young, C., Zhou, S., Fry, W., Meyers, B.C., van West, P., Ristaino, J., Govers, F., Birch, P.R.J., Whisson, S.C., Judelson, H.S., and Nusbaum, C.** (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393-398.
- Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., and Rathjen, J.P.** (2010). Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 388-393.
- Hardham, A.R., Jones, D.A., and Takemoto, D.** (2007). Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 342-348.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., and Aderem, A.** (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**, 1099-1103.
- He, S.Y., Huang, H.-C., and Collmer, A.** (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: A protein that is secreted via the hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell* **73**, 1255-1266.

- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B.** (2001). Molecular Evidence for the Early Colonization of Land by Fungi and Plants. *Science* **293**, 1129-1133.
- Heese, A., Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S., Jones, A.M.E., He, K., Li, J., Schroeder, J.I., Peck, S.C., and Rathjen, J.P.** (2007). The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *PNAS* **104**, 12217-12222.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., and Akira, S.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-745.
- Horvath, P., and Barrangou, R.** (2010). CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. *Science* **327**, 167-170.
- Huffaker, A., Pearce, G., and Ryan, C.A.** (2006). An endogenous peptide signal in *Arabidopsis* activates components of the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 10098-10103.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ito, Y., Kaku, H., and Shibuya, N.** (1997). Identification of a high-affinity binding protein for N-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membrane of suspension-cultured rice cells by affinity labeling. *The Plant Journal* **12**, 347-356.
- 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.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kauss, H., Fauth, M., Merten, A., and Jeblick, W.** (1999). Cucumber Hypocotyls Respond to Cutin Monomers via Both an Inducible and a Constitutive H₂O₂-Generating System. *Plant Physiol* **120**, 1175-1182.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J.-M., Yvin, J.-C., Kopp, M., Kloareg, B., and Fritig, B.** (2000). Linear β -1,3 Glucans Are Elicitors of Defense Responses in Tobacco. *Plant Physiol* **124**, 1027-1038.
- Koga, J., Yamauchi, T., Shimura, M., Ogawa, N., Oshima, K., Umemura, K., Kikuchi, M., and Ogasawara, N.** (1998). Cerebrosides A and C,

Sphingolipid Elicitors of Hypersensitive Cell Death and Phytoalexin Accumulation in Rice Plants. *J Biol Chem* **273**, 31985-31991.

Koornneef, M., Hanhart, C.J., and Martinelli, L. (1987). A genetic analysis of cell culture traits in tomato. *Theoret. Appl. Genetics* **74**, 633-641.

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.

Lee, J., Klessig, D.F., and Nürnberger, T. (2001). A Harpin Binding Site in Tobacco Plasma Membranes Mediates Activation of the Pathogenesis-Related Gene HIN1 Independent of Extracellular Calcium but Dependent on Mitogen-Activated Protein Kinase Activity. *The Plant Cell Online* **13**, 1079-1093.

Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., Zhou, J.-M., and Chai, J. (2012). Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* **336**, 1160-1164.

Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell Online* **15**, 165-178.

Lotze, M.T., Zeh, H.J., Rubartelli, A., Sparvero, L.J., Amoscato, A.A., Washburn, N.R., DeVera, M.E., Liang, X., Tör, M., and Billiar, T. (2007). The grateful dead: damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunol Rev* **220**, 60-81.

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.

Martin, G.B., Bogdanove, A.J., and Sessa, G. (2003). UNDERSTANDING THE FUNCTIONS OF PLANT DISEASE RESISTANCE PROTEINS. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 23-61.

Mattinen, L., Tshuikina, M., Mäe, A., and Pirhonen, M. (2004). Identification and Characterization of Nip, Necrosis-Inducing Virulence Protein of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant Microbe In* **17**, 1366-1375.

May, M.J., and Leaver, C.J. (1993). Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in *Arabidopsis thaliana* Suspension Cultures. *Plant Physiol* **103**, 621-627.

- Medzhitov, R., and Janeway, C.A.** (1997). Innate immunity: Impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* **9**, 4-9.
- Meyer, A., Pühler, A., and Niehaus, K.** (2001). The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Planta* **213**, 214-222.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W.** (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **15**, 809-834.
- Milling, A., Babujee, L., and Allen, C.** (2011). *Ralstonia solanacearum* Extracellular Polysaccharide Is a Specific Elicitor of Defense Responses in Wilt-Resistant Tomato Plants. *PLoS ONE* **6**, e15853.
- 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*. *P Natl Acad Sci USA* **104**, 19613-19618.
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J., and Orth, K.** (2006). *Yersinia* YopJ Acetylates and Inhibits Kinase Activation by Blocking Phosphorylation. *Science* **312**, 1211-1214.
- Nomura, K., DebRoy, S., Lee, Y.H., Pumphin, N., Jones, J., and He, S.Y.** (2006). A Bacterial Virulence Protein Suppresses Host Innate Immunity to Cause Plant Disease. *Science* **313**, 220-223.
- Nürnbergger, T., and Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 318-324.
- Nürnbergger, 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.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.-L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M., and Blein, J.-P.** (2001). Mediation of Elicitor Activity on Tobacco Is Assumed by Elicitor-Sterol Complexes. *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2825-2834.
- Pemberton, C.L., and Salmond, G.P.C.** (2004). The Nep1-like proteins—a growing family of microbial elicitors of plant necrosis. *Mol Plant Pathol* **5**, 353-359.

- Pfund, C., Tans-Kersten, J., Dunning, F.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Allen, C., and Bent, A.F.** (2004). Flagellin is not a major defense elicitor in *Ralstonia solanacearum* cells or extracts applied to *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe In* **17**, 696-706.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H.** (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 421-426.
- Qutob, D., Kamoun, S., and Gijzen, M.** (2002). Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *The Plant Journal* **32**, 361-373.
- Remenant, B., Coupat-Goutaland, B., Guidot, A., Cellier, G., Wicker, E., Allen, C., Fegan, M., Pruvost, O., Elbaz, M., Calteau, A., Salvignol, G., Mornico, D., Mangenot, S., Barbe, V., Medigue, C., and Prior, P.** (2010). Genomes of three tomato pathogens within the *Ralstonia solanacearum* species complex reveal significant evolutionary divergence. *BMC Genomics* **11**, 379.
- Rivas, S., and Thomas, C.M.** (2005). Molecular Interactions Between Tomato and the Leaf Mold Pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annu Rev Phytopathol* **43**, 395-436.
- Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G.** (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annu Rev Phytopathol* **49**, 317-343.
- 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. *The Plant Cell Online* **16**, 1604-1615.
- Ronald, P.C., and Beutler, B.** (2010). Plant and Animal Sensors of Conserved Microbial Signatures. *Science* **330**, 1061-1064.
- Rooney, H.C.E., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G., and de Wit, P.J.G.M.** (2005). *Cladosporium Avr2* Inhibits Tomato Rcr3 Protease Required for Cf-2-Dependent Disease Resistance. *Science* **308**, 1783-1786.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choisine, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A.** (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.

- Schweizer, P., Felix, G., Buchala, A., Müller, C., and Métraux, J.-P.** (1996). Perception of free cutin monomers by plant cells. *The Plant Journal* **10**, 331-341.
- Schwessinger, B., Roux, M., Kadota, Y., Ntoukakis, V., Sklenar, J., Jones, A., and Zipfel, C.** (2011). Phosphorylation-Dependent Differential Regulation of Plant Growth, Cell Death, and Innate Immunity by the Regulatory Receptor-Like Kinase BAK1. *PLoS Genet* **7**, e1002046.
- Shabab, M., Shindo, T., Gu, C., Kaschani, F., Pansuriya, T., Chintha, R., Harzen, A., Colby, T., Kamoun, S., and van der Hoorn, R.A.L.** (2008). Fungal Effector Protein AVR2 Targets Diversifying Defense-Related Cys Proteases of Tomato. *The Plant Cell Online* **20**, 1169-1183.
- 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.
- Shapiro, A.D., and Zhang, C.** (2001). The Role of NDR1 in Avirulence Gene-Directed Signaling and Control of Programmed Cell Death in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 1089-1101.
- Shiu, S.-H., and Bleecker, A.B.** (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases, pp. 10763-10768.
- Sohn, K.H., Lei, R., Nemri, A., and Jones, J.D.G.** (2007). The Downy Mildew Effector Proteins ATR1 and ATR13 Promote Disease Susceptibility in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell Online* **19**, 4077-4090.
- Stergiopoulos, I., and de Wit, P.J.G.M.** (2009). Fungal Effector Proteins. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 233-263.
- Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L., Mizoguchi, S.D., Warrenner, P., Hickey, M.J., Brinkman, F.S.L., Hufnagle, W.O., Kowalik, D.J., Lagrou, M., Garber, R.L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L.L., Coulter, S.N., Folger, K.R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G.K.S., Wu, Z., Paulsen, I.T., Reizer, J., Saier, M.H., Hancock, R.E.W., Lory, S., and Olson, M.V.** (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* **406**, 959-964.
- Tahat, M.M., and Sijam, K.** (2010). *Ralstonia solanacearum*: The Bacterial Wilt Causal Agent. *Asian Journal of Plant Sciences* **9**, 385 - 393.

- Thomma, B.P.H.J., Nürnberger, T., and Joosten, M.H.A.J.** (2011). Of PAMPs and Effectors: The Blurred PTI-ETI Dichotomy. *The Plant Cell Online* **23**, 4-15.
- Thomma, B.P.H.J., Eggermont, K., Tierens, K.F.M.-J., and Broekaert, W.F.** (1999). Requirement of Functional Ethylene-Insensitive 2 Gene for Efficient Resistance of Arabidopsis to Infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**, 1093-1101.
- van den Burg, H.A., Harrison, S.J., Joosten, M.H.A.J., Vervoort, J., and de Wit, P.J.G.M.** (2006). *Cladosporium fulvum* Avr4 Protects Fungal Cell Walls Against Hydrolysis by Plant Chitinases Accumulating During Infection. *Mol Plant Microbe In* **19**, 1420-1430.
- Van der Hoorn, R.A.L., De Wit, P.J.G.M., and Joosten, M.H.A.J.** (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends Plant Sci* **7**, 67-71.
- 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.
- Wagner, H.** (1999). Bacterial CpG DNA Activates Immune Cells to Signal Infectious Danger. In *Advances in Immunology*, J.D. Frank, ed (Academic Press), pp. 329-368.
- Wei, Z., Laby, R., Zumoff, C., Bauer, D., He, S., Collmer, A., and Beer, S.** (1992). Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. *Science* **257**, 85-88.
- Willmann, R., Lajunen, H.M., Erbs, G., Newman, M.-A., Kolb, D., Tsuda, K., Katagiri, F., Fliegmann, J., Bono, J.-J., Cullimore, J.V., Jehle, A.K., Götz, F., Kulik, A., Molinaro, A., Lipka, V., Gust, A.A., and Nürnberger, T.** (2011). Arabidopsis lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 19824-19829.
- Yamaguchi, T., Yamada, A., Hong, N., Ogawa, T., Ishii, T., and Shibuya, N.** (2000). Differences in the Recognition of Glucan Elicitor Signals between Rice and Soybean: β -Glucan Fragments from the Rice Blast Disease Fungus *Pyricularia oryzae* That Elicit Phytoalexin Biosynthesis in Suspension-Cultured Rice Cells. *The Plant Cell Online* **12**, 817-826.
- 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. Proceedings of the National Academy of Sciences **103**, 10104-10109.

Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *P Natl Acad Sci USA* **101**, 15811-15816.

Zeng, L., Velásquez, A.C., Munkvold, K.R., Zhang, J., and Martin, G.B. (2012). A tomato LysM receptor-like kinase promotes immunity and its kinase activity is inhibited by AvrPtoB. *The Plant Journal* **69**, 92-103.

Zhang, J., and Zhou, J.-M. (2010). *Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures*, pp. 783-793.

Zhao, Q., and Guo, H.-W. (2011). Paradigms and Paradox in the Ethylene Signaling Pathway and Interaction Network. *Molecular Plant* **4**, 626-634.

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

Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D.G., 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.

7. Anhang

Primername	Sequenz	T _m [°C]
HUB_fw1a	<u>gggcatatg</u> acgaccaaattccgaactcgtagc	54
HUB_rev1a	acggcggcgc <u>cttcttcttg</u> ttcacggcgctccttg	54
L27_fw1a	<u>gggcatatg</u> gcacagaaaaaaggcggcggttc	56
L27_rev1a	atagcggcgc <u>ggccgccgga</u> acgacgtcg	57
LSP_fw1a	<u>gggcatatg</u> tttgctgttactccccgtcg	49
LSP_rev1a	acggcggcgc <u>catcatcggctg</u> cggcg	49
scon_fw1a	<u>gggcatatg</u> aaaaaatttaccagctcgcggttcgctgc	57
scon_rev1a	acggcggcgc <u>ctgcgcgctg</u> cgcgtaccg	57

Tabelle 7-1: Primerliste

Alle Primer wurden von Hand abgeleitet. Die für die Subklonierung nötigen Schnittstellen für NdeI (nur in *forward* Primern) und NotI (nur in *reverse* Primern) sind rot markiert. Für eine effektive Restriktion wurden jeweils drei zusätzliche Nukleotide vor das Erkennungsmotiv des Restriktionsenzym gesetzt (blau). Die Schmelztemperaturen wurden für die jeweiligen, mit *R. solanacearum* korrespondierenden Gensequenzen berechnet (unterstrichen).

```

gi|17549381 MFAVTPRRSLAAVAAGLLLSCAVAYAQSSAPEASPRPPMA-----PHGMPHM----- 47
gi|295096131 -----MRKLTALFVASTLALGATSMFAADTATTTAAPTEG-----K-MMMHHKGGK- 46
gi|168233225 -----MRKLTALFVASTLALGAAANLAHAAET--TTAAPADA-----K-PMMQHKGKF- 44
gi|206577515 -----MKKLTALFVASTLALGAANLAHAAADT---TTAPSDS-----KPMMMHHKG---- 42
gi|270264557 -----MRKLTALFVASTLALGSASMAFAADT---TAAPATAADAAPM--KMMHHKGE--- 47
gi|157372973 -----MRKLTALFVASTLALGSASMAFAADT---TAAPATT-DAAPMNMKMMHHKGE--- 48
gi|309778805 -----MAAAAAGLVFSCAAA-AQTAAPGAAPLSPMQPMQSIIPPHGSGMMGRGPGPA 50
gi|313200959 -----MKINKHIILPGLLLVGLAALFGLTALSYAGDDEACAG-----PHGKHAHAGGPG- 48
      . . . . .
gi|17549381 --PGGPGFMGPHHGG-LFLHGLKLTEAQRDKVFAIEYAQMPELREQRKAI EHARRDLREM 104
gi|295096131 -----GMHHEM-MMFKDLNLTDAQKQQIRDIMKSQR---DQMKRPPLEERRAMHDI 93
gi|168233225 -----GPHHD--MMFKNLNLTDAQRQQIRDIMKQQR---EQMKRPPLEERRAMHDI 90
gi|206577515 -----GPGQHD--MMFKGLNLTDAQKQQIRDIMKSQR---ENMKRPSLDERRAMHDL 89
gi|270264557 -----GKGGP----FAGLNLTEQQRQMRDIMKESH---QNRGAGVKEERQALHNL 91
gi|157372973 -----GKGGP----FAGLNLTEQQRQMRDIMKESH---QKRGETKKEERQALHSM 92
gi|309778805 FGPGGPHGMGSHHGGAPFLRGLDLSEAQRDKIFAIEYAQMP EAREQRKAI EHARRDLHQM 110
gi|313200959 -----AEDGGFHRGLRGLDLTADQKAQIKQIMDKQKPVREQKMQUALHDGMKNLQTL 99
      . . . . .
gi|17549381 VVSGQYDEARSRALTDALGRAVARETQLRAQADAKILQVLTPEQRKQISDREAQRVAAME 164
gi|295096131 IASDSFDKAKAEAQIDKMAEQHKARMLAHMETQNKIYNIILTPEQKKQFNANFEKRLTERA 153
gi|168233225 IASDTFDKAKAEAQITKMEAQRKANMLAHMETQNKIYNVLTPEQKKQYNANFEKRLTERP 150
gi|206577515 IASDTFDKAKAEAQIDKMEAQHKAMALSRLTQNKIYNIILTPEQKKQFNANFEKHLTERN 149
gi|270264557 VASDSFDEAKAKSQIDAISKAQSEHMLERAKAENKMYNLLTPEQKKQYNENYQKREQKMM 151
gi|157372973 VASDSFDEAKAKTQIDAISKAQSEHMLERAKAENKMYNLLTPEQKKQYNENYQKREQKMM 152
gi|309778805 VTSGQYDEARARSLTESLGRAVAREAQLRAQAGAKVMQVLTPEQRKQIADREAQRVAELP 170
gi|313200959 AKAEPYDPAKVQAAAAEQAKIQADLIVLRDTAAHQVYALLTPEQKQKWNDR--PERGPKK 158
      : : * * : . : : : * : : : * : : : * : : : * : : :
      . . . . .
gi|17549381 EEAGP-PPQPM--- 175
gi|295096131 APEGKMPAPTE---- 164
gi|168233225 AQEGKMPAAAE---- 161
gi|206577515 APAGKMPAPAE---- 160
gi|270264557 DHMNKMKSKMTTEQ- 165
gi|157372973 EHMNNMKSKMTNSQ- 166
gi|309778805 PERNEGAPPELAAM 185
gi|313200959 DDRG----- 162

```

Abbildung 7-1: Proteinsequenzalignment von *R. solanacearum* LSP

Nach einer BLAST-Analyse von *R. solanacearum* lipoprotein signal peptidase (LSP) wurde mit zufällig gewählten Treffern mit verschiedenen hohen BLAST scores ein multiples Sequenzalignment mit Hilfe des ClustalW2 Algorithmus durchgeführt. Aus besonders konservierten Sequenzbereichen wurden die Peptide LSP A (rot) und LSP B (grün) abgeleitet.

[\(gi|17549381\)](#) – lipoprotein signal peptidase [*Ralstonia solanacearum* GMI1000], [\(gi|295096131\)](#) – P pilus assembly/Cpx signaling pathway, periplasmic inhibitor/zinc-resistance associated protein [*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* NCTC 9394], [\(gi|168233225\)](#) spheroplast protein Y [*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Kentucky str. CDC 191], [\(gi|206577515\)](#) hypothetical protein KPK_3216 [*Klebsiella pneumoniae* 342], [\(gi|270264557\)](#) periplasmic protein [*Serratia odorifera* 4Rx13], [\(gi|157372973\)](#) periplasmic protein [*Serratia proteamaculans* 568], [\(gi|309778805\)](#) hypothetical protein HMPREF1004_00159 [*Ralstonia* sp. 5_7_47FAA], [\(gi|313200959\)](#) hypothetical protein MPQ_1217 [*Methylovorus* sp. MP688]


```

10      20      30      40      50      60      70      80      90
MNXFIVGACA GVLSLAASQY ASAQPTTSK PAAKKATAKK KAAKKGAPAK EVAAKPEGVL WKCELGNEY IAGDMTRDQV VTMHWKGRNY
SPP1-----AASQY ASAQPTTSK PAAKKATAKK KAAKK
SPP2-----PAAKKATAKK KAAKKGAPAK EVAAKPEGVL
SPP3-----GAPAK EVAAKPEGVL WKCELGNEY IAGDM
SPP4      WKCELGNEY IAGDMTRDQV VTMHWKGRNY
SPP5      TRDQV VTMHWKGRNY QLPRQLTRTGADRYF

100     110     120     130     140     150     160     170     180
QLPRQLTRTG ADRYFDQRTG MDLVVIPAKA MLFDRNEGHR LADECQTAEM AAGAPAPTQG GALRAPAGLP LMMQDNAAPA PAPAPTPDAT
SPP6---QLPRQLTRTG ADRYFDQRTG MDLVVIPAKA
SPP7-----DQRTG MDLVVIPAKA MLFDRNEGHR LADEC
SPP8-----MLFDRNEGHR LADECQTAEM AAGAPAPTQG
SPP9-----QTAEM AAGAPAPTQG GALRAPAGLP LMMQD
SPP10-----GALRAPAGLP LMMQDNAAPA PAPAPTPDAT

```

Abbildung 7-3: Ableitung der sich überlappenden Peptide von *R. solanacearum* SPP

Vom *R. solanacearum* Protein *signal peptide protein* (ARS) wurden sich überlappende Peptide abgeleitet, die, mit Ausnahme des Signalpeptids (grün) die gesamte Sequenz des Proteins abdecken. Dabei wurden für stärker konservierte Bereiche höhere Überlappungen gewählt als für weniger konservierte.

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
MKLSALMFSM AALLLAGSAYA QTPAAATAPA TASGGVHAVC KDGTTPYSGAT LRGACRHHGG VDKKASAADA APAANAPATS AAMPAAPATS PAKPAAPAAP
ARS1-----QTPAAATAPA TASGGVHAVC KDGTTPYSGAT
ARS2-----TASGGVHAVC KDGTTPYSGAT LRGACRHHGG
ARS3-----KDGTTPYSGAT LRGACRHHGG VDKKASAADA
ARS4-----RHGG VDKKASAADA APAANAPATS AAMPA
ARS5-----APAANAPATS AAMPAAPATS PAKPAAPAAP
110     120     130     140     150     160     170     178
MTPAKPAATA PAAAAAPMAPA AAATPGAAAD KVMANASTKV YHCPGDRYYG KTKQGAYMSE ADAKAQGMRP SHGKACAK
ARS6---PAKPAAPAAP MTPAKPAATA PAAAAAPMAPA
ARS7-----PAAAAAPMAPA AAATPGAAAD KVMANASTKV
ARS8-----AAD KVMANASTKV YHCPGDRYYG KTKQGAY
ARS9-----TKV YHCPGDRYYG KTKQGAYMSE ADAKAQ
ARS10-----YG KTKQGAYMSE ADAKAQGMRP SHGKACAK

```

Abbildung 7-4: Ableitung der sich überlappenden Peptide von *R. solanacearum* ARS

Vom *R. solanacearum* Protein *alanin rich signal peptide* (ARS) wurden sich überlappende Peptide abgeleitet, die, mit Ausnahme des Signalpeptids (grün) die gesamte Sequenz des Proteins abdecken. Dabei wurden für stärker konservierte Bereiche höhere Überlappungen gewählt als für weniger konservierte.

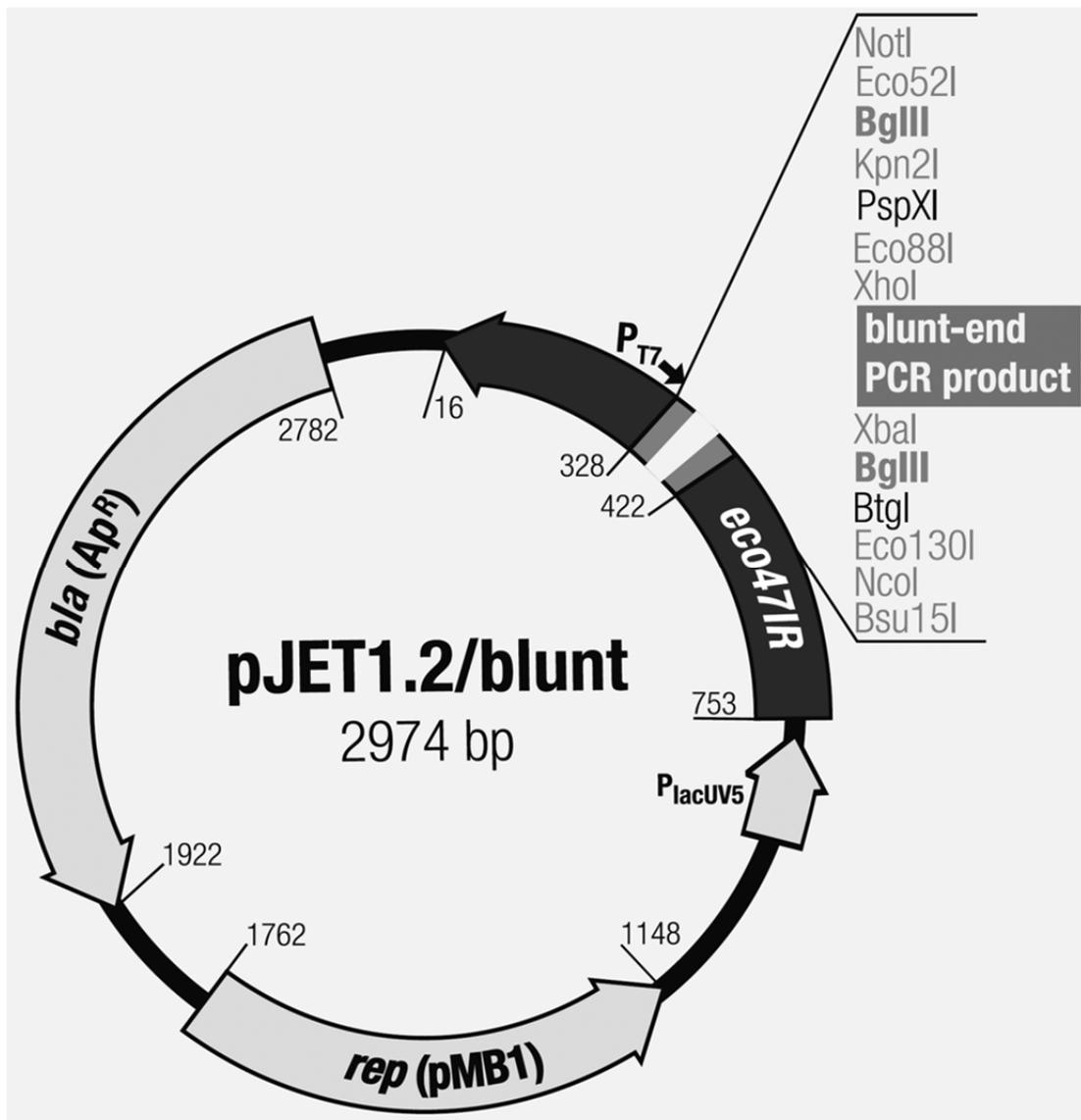


Abbildung 7-5: Vektorkarte für den Zwischenvektor pJET1.2/blunt

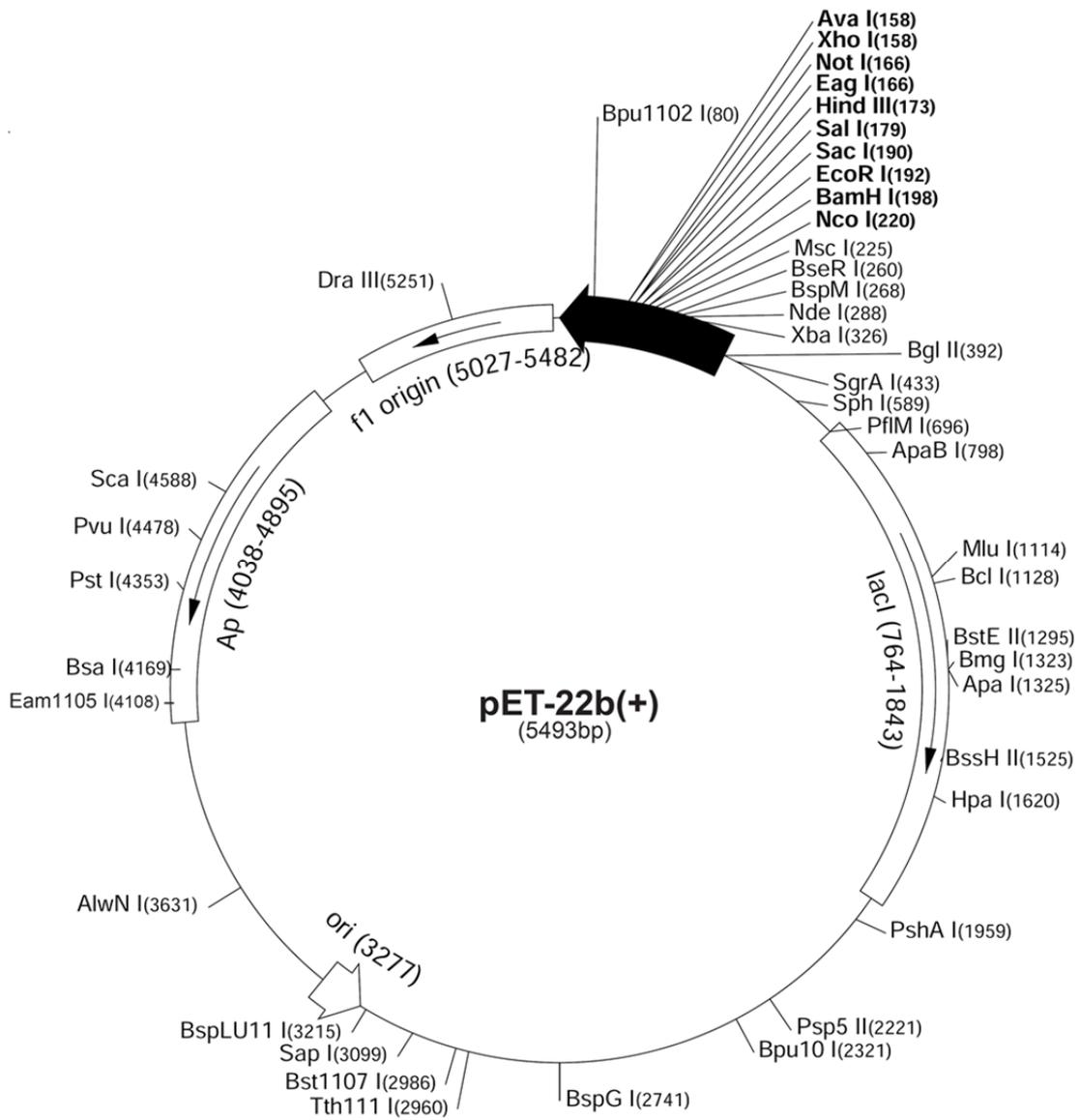


Abbildung 7-6: Vektorkarte für den Expressionsvektor pET22b(+)

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide												MW [kDa]	PI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Q8XXW2	probable signal peptide protein	1	3	1	3	2	2	2	3					19,5	10,2
Q8XPW8	alanin-rich signal peptide protein	5	2	2	2	2	2	2					17,1	10,3	
Q8XWF3	probable DNA-binding protein HU-beta	7	10	7	7	7	9	8	8	9	8	11	9,8	10,5	
Q8Y0I6	periplasmatic protease signal peptide protein	9	11	2	2	3	11	3	3	11	3	53	9,7		
Q8XQR1	lipoprotein signal peptidase	2	2	1	7	3	2	3	2	6	6	19,1	9,6		
Q8Y0Z3	Putative OM signal peptide protein	2	2	2	4	7	2	3	4	4	3	5	23,5	10,2	
Q8XUZ5	50S ribosomal protein L1											1	24,1	10,2	
Q8XUZ4	50S ribosomal protein L11					1				3	2	14,8	10,6		
Q8Y0V7	50S ribosomal protein L19			2					2			14,6	10,9		
Q8XV23	50S ribosomal protein L24				3							10,6	11,1		
Q8XVK9	50S ribosomal protein L27					1	1	1	3	4	6	9	11,2		
Q8XV20	50S ribosomal protein L29					3					4	7,3	10,9		
Q8Y0J6	50S ribosomal protein L32										1	6,7	10,9		
Q8XWM8	50S ribosomal protein L33										2	6,4	10,6		
Q8XV29	30S ribosomal protein S5					1	2	3	2	6	10	2	18,2	10,6	
Q8XZI8	ribosomal recycling factor	2	2									20,8	9		
Q8XZV6	translation initiation factor IF-2				2					3		103,3	6		

Tabelle 7-2: Sequenzierungsdaten der Proteinbanden aus Gelfiltration und Anionenaustausch des Zellextraktes (Abbildung 3-16)

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide											MW [kDa]	PI	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11			12
Q8XWC5	nucleotide-binding protein				2									18,1	9,7
Q8Y1F4	probable peptidoglycan-associated lipoprotein				3							1		18,6	7,7
Q8Y3B1	signal peptide protein			3										41,3	7,9
Q8Y1E7	phospho-2-dehydr-3-deoxyheptonate aldolase							1						42,4	6,7
Q8XTS5	putative HNS-like transcription regulator protein							2						10,7	10,4
Q8Y259	hypothetical protein RSc0477				2									14,8	10
Q8XZ01	hypothetical protein RSc1605							2			3			20,3	7,8
Q8Y175	hypothetical protein RSc0815				3									14,8	10,2
Q8XW13	putative signal peptide protein	2	3	3	3	3	3	3	3	3	2			6,6	10,7
Q8Y2D2	hypothetical signal peptide protein			3	2									14,1	10,5
Q8XPH0	hypothetical signal peptide protein							1						11,8	10,5
Q8XVE8	putative signal peptide protein								2					15,4	11,4
Q8XUT1	putative calcium binding signal peptide protein	5	5	2										20,8	6,5
Q8XQX0	putative hns-like transcription regulator protein			2	2						1	2		11,2	10,1

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide												MW [kDa]	PI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Q8XRT9	putative lipoprotein							3						22,3	10
Q8XYL3	hypothetical protein RSc1745								1	6				10,2	8
Q8XRN0	hypothetical protein RS01906				5	5	6	4	4	5	4			18,1	9,9
Q8XXX7	hypothetical protein RSc1986					2	3	2	2	2				99,1	4,7
Q8XXN3	probable transmembrane protein							4						29,3	11,3
Q8XXZ7	putative hemin uptake protein								3					10	11,6

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide																				MW [kDa]	PI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Q8XPW8	alanin-rich signal peptide protein	3	2	6	5	4	1	1	1	1	1	4	7	12	8	5	2	1	1	1	17,1	9,6	
Q8XXW2	probable signal peptide protein	1	1	2	6	6	2	1	1	1	3	5	8	10	8	1					19,5	9,5	
Q8Y0I6	periplasmic protease signal peptide protein	3	9	3	1	3	3			7											53,0	9,2	
Q8Y1F3	probable transmembrane protein						1	7	2	4	1										30,6	9,6	
Q8Y2P2	hypothetical signal peptide protein								1	2	2	1						1			12,3	9,2	
Q8XWN2	putative amino acid-binding periplasmic abc transporter	1	1	2	2	1	1	2	3	2	3	2	1	2	2	1	2	2	2	2	4	41,8	5,7
Q8Y2D2	hypothetical signal peptide protein	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	14,2	9,7	
Q8Y2P9	probable cell division ftsn transmembrane protein							1	4	3											25,2	10,0	
Q8XWF3	probable DNA-binding protein HU-beta	2	2	2	3	1	1	3	2	3	3	2	2	2	1	2	2	2	3	2	9,8	10,5	
F6G497	putative uncharacterized protein	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	14,9	9,7	
Q8XUQ8	putative NAD ⁺ dependent acetaldehyde dehydrogenase oxidoreductase protein	2	3	2	1	2	2	3	1	3	1	3	3	1	2	1	2	1	1	3	55,0	6,0	

Tabelle 7-3: Sequenzierungsdaten der Proteinbanden der Anionenaustauschchromatographien A und B (Abbildung 3-17)

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide																				MW [kDa]	PI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
Q8XWM8	50S ribosomal protein L33															1	2	2	2	1	6,4	10,1	
Q8XRF4	secreted protein popf2						1	1	3	6	2							2			78,1	7,1	
Q8XVE8	putative signal peptide protein						1									6					15,4	9,6	
Q8XGZ0	Elongation factor Tu	2	1	2	1	2	1	1	3				2	2	1	1	2	4	2		43,1	5,4	
Q8Y0Z3	putative OM signal peptide protein	1	1	1	2	1	2	2	1	2		2	1	1	2	2	2	2	2	1	23,5	9,5	
Q8Y180	probable redox protein, regulator of disulfide bond formation	1					2	3									1				30,0	8,9	
Q8Y1F4	probable peptidoglycan-associated lipoprotein	2					2	4	2			2					2	3	3	2	18,7	6,8	
Q8XUD3	putative uncharacterized protein						1	4	2												11,3	9,0	
Q8XV33	Translation initiation factor IF-1 1								1								4	1			8,2	9,6	
Q8XPH0	hypothetical signal peptide protein															1	2				11,8	10,0	
Q8Y1R8	putative uncharacterized protein						4	1	1												9,4	9,7	
Q8XQX0	putative hns-like transcription regulator protein																2	1			11,2	9,7	
Q8XUG3	putative uncharacterized protein																6				9,8	9,8	

Acc	Protein	Anzahl gefundener Peptide																			MW [kDa]	PI
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		
Q8XXN3	probable transmembrane protein				2																29,3	10,7
Q8XV27	50S ribosomal protein L6							2	3	2											18,9	9,9
F6G8L4	putative uncharacterized protein	2	1							1	3	4	1	1	1						15,9	
Q8XZ41	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase					4	3														14,5	9,3
Q8XZQ9	probable sulfate-binding signal peptide protein							2	1								1	1			36,4	9,2
Q8Y1D6	probable antioxidant (Peroxidase) oxidoreductase protein							2	3												24,4	6,6
Q8Y0J1	acyl carrier protein 1			2					1											1	8,7	4,1
Q8XXY5	probable transmembrane protein			3	1		1	1													29,1	9,8
Q8Y038	probable lipoprotein		1			1	4														28,8	9,5
Q8XUZ4	50S ribosomal protein L11								1												14,9	10,0
Q8XV25	30S ribosomal protein S14																1	1	1		11,6	10,8
Q8Y0X7	putative signal peptide protein							2	3	1										1	11,0	9,8

Danksagung

Herr Prof. Dr. Nürnberger vertraute mir dieses interessante und spannende Thema an, stellte mir für die Bearbeitung ein hervorragend ausgestattetes Labor zur Verfügung und war darüber hinaus stets mit anregenden Diskussionen, kritischem Hinterfragen der Ergebnisse und motivierendem Rat ein Förderer meiner Arbeit. Für all dies möchte ich mich sehr herzlich bedanken.

Für die Erstellung des zweiten Gutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. Georg Felix. Zudem waren seine Gedankenanstöße inspirierend, und er fand immer eine Frage, die ich mir selbst noch nicht gestellt hatte.

Desweiteren wäre diese Arbeit nicht ohne die Mitarbeiter der Abteilung Pflanzenbiochemie des ZMBP möglich gewesen. Darum danke ich Frau Dr. Andrea Gust, Frau Dr. Birgitt Kemmerling und Herrn Dr. Frederik Brunner und all ihren Mitarbeitern für Anregungen, Unterstützung und Beistand. Besonderen Dank gilt dabei meinen Kollegen des Labors N3, die in beruflicher und privater Hinsicht immer ein offenes Ohr hatten und mich mit hilfreichen Worten unterstützten.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Partnerin Kirsten Scharr für ihre Motivation, Geduld und Liebe bedanken, ohne die die Arbeit der letzten Jahre nicht möglich gewesen wäre. Danke.