

**Polarisation des pflanzlichen
Aktinzytoskeletts bei Infektion –
Profiline in *Arabidopsis thaliana* und
*Petroselinum crispum***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
an der
Universität zu Köln

vorgelegt von
Ingeborg Schütz
aus Jena

Köln 2003

Berichterstatter: PD Dr. Elmon Schmelzer
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 2. 2004

Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Profilin, seinem Vorkommen in *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* und seiner Rolle bei der Pathogenabwehr in zwei Modellsystemen.

Es wurden vier vollständige cDNA-Sequenzen von Profilinen aus *Petroselinum crispum* neu kloniert. Ihre abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigen Ähnlichkeit zu bekannten pflanzlichen Profilinen, wobei sie stärkere Ähnlichkeit zur Klasse der somatisch exprimierten Profileine als zu der in reproduktiven Geweben exprimierten Profileine zeigen. Vier von ihnen teilen jedoch ein Sequenzmerkmal mit Profilinen, die in reproduktiven Geweben exprimiert werden. Mittels Immunlokalisation wurde ein starkes Vorkommen von Profilin in sich entwickelnden Pollen in Blütenknospen von *Petroselinum crispum* gefunden.

Die subzelluläre Lokalisation von Profilin wurde durch Fusion mit einem green fluorescent protein (GFP) untersucht. In Protoplasten, die Profilin-GFP überexprimierten, veränderte sich die Morphologie des Zytoplasmas, es waren keine Zytoplasmastränge sichtbar. Mittels PTGS (post-transcriptional gene silencing) sollte der zelluläre Profilin-Gehalt reduziert werden. In Zellen, deren Profilin-Gehalt mittels dsRNAi reduziert wurde, blieben GFP-markierte Aktinfilamente länger sichtbar als in Kontrollzellen.

In zwei Modellsystemen wurden zytologische Veränderungen bei der Interaktion zwischen Pflanzen und Nichtwirtspathogenen untersucht. Ein Schwerpunkt war die intrazelluläre Lokalisation von Profilin. Durch immunzytologische Färbung konnte die Akkumulation von Profilin an der Infektionsstelle in infizierten Suspensionskulturzellen gezeigt werden. Nach Infektion mit einem Nichtwirtspathogen war kein Anstieg der mRNA von Profilin zu verzeichnen. Um die Funktion von Profilin bei der Infektionsabwehr zu klären, wurde der zelluläre Profilin-Gehalt mittels dsRNAi reduziert. So behandelte Zellen zeigten wenig verändertes Verhalten bei Infektion mit einem Nichtwirtspathogen.

Außer Profilin wurden Aktin, PIP₂ und kleine GTPasen als an der Pathogenabwehr beteiligte Komponenten untersucht. Die Ausrichtung zellulärer Aktinfilamente zur Infektionsstelle konnte mittels transgener Linien auch für *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Es konnte die Lokalisation von GTPase-ähnlichen Proteinen an der Infektionsstelle in infizierten Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* nachgewiesen werden. Funktionelle Untersuchungen mittels aktivitätsveränderter Mutanten der Proteine AtRac2 und AtRac7 ergaben eine mögliche Beteiligung kleiner GTPasen an der Kalloseablagerung in infizierten Zellen.

Es konnten keine Profilin-Mutanten in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden.

Abstract

This work deals with profilins which are important actin binding proteins in plants, animals and viruses.

Four profilin cDNAs from parsley were cloned. Fusion of one parsley profilin with a green fluorescent protein (PcPRF1-GFP) revealed profilin distribution in the cytoplasm.

The predicted amino acid sequences show similarities to known plant profilins. They have higher similarities to plant profilins which are expressed in vegetative tissue than to those of reproductive tissue. On the other hand, four of the five parsley profilins share one sequence characteristic with profilins from pollen, an insertion of two amino acids at a characteristic position.

Immunolocalization revealed high profilin content in developing pollen grains in flowers of *Petroselinum crispum*.

Double-stranded RNA interference, a method of post-transcriptional gene silencing (PTGS) was employed to reduce cellular biosynthesis of profilin in *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal cells. Cells with reduced profilin content showed longer prevalence of GFP-labeled actin filaments in detached leaves.

In the second part of this work, intracellular changes upon infection with a non-host pathogen were monitored using transgenic *Arabidopsis* lines and cultured parsley cells infected with *Blumeria graminis* and *Phytophthora infestans*, respectively. In *Arabidopsis*, rearrangement of GFP-labeled actin filaments towards the site of attempted fungal penetration was found. In infected parsley cells from suspension culture, accumulation of profilin at the infection site was shown by use of affinity-purified anti-profilin antibodies. No changes in profilin transcript level were found after infection of *Arabidopsis thaliana* with *Blumeria graminis*.

Transient transformation of *Arabidopsis* leaf epidermal cells with PRF-dsRNAi did not reveal changes in cell behavior against the pathogen.

In infected suspension cultured cells, PIP₂ was localized to the nucleus, but not to the infection site. A protein with similarity to the AtRop4 was localized at the infection site in infected parsley cells.

Mutant versions of two small GTPases (AtRac2 and AtRac7) of *Arabidopsis thaliana* were generated resulting in constitutive active and dominant negative protein variants. They were transiently transformed into *Arabidopsis thaliana* leaf epidermal cells followed by infection with the non-host pathogen *Blumeria graminis* (single cell assay). Results point to an involvement of Rac in the process of callose deposition.

No profilin expression mutants of *Arabidopsis thaliana* were found.

Abkürzungsverzeichnis

ADF	“actin depolymerizing factor” (Aktin-bindendes Protein)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CAP	Cyclase-assoziiertes Protein
DAG	Diazylglyzerol
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	“diphenyl iodonium”
ECL	Enhanced Chemiluminescence Detection
F-Aktin	Aktinfilament, filamentöses Aktin
FH	“Formin-Homology”; gemeint sind Proteine, die eine Domäne mit Formin-Homology enthalten
G-Aktin	Aktin-Monomer (globuläres Aktin)
GFP	“green fluorescent protein” grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	β -Glukuronidase
HR	Hypersensitivitätsreaktion
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
JA	Jasmonsäure
LB	“liquid broth” Luria-Bertani-Medium
LRR	leucine rich repeat
LZ	leucine zipper
PBS	“phosphate buffered saline” Phosphat enthaltender Puffer
PcPRF	Profilin aus <i>Petroselinum crispum</i>
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat
PLC	Phospholipase C
PLP	Poly-L-Prolin
PRF	Profilin aus <i>Arabidopsis thaliana</i>
PR-Gene	“pathogenesis related genes”
RNA	Ribonukleinsäure
Rop	“Rho of plant” – GTP-bindendes Protein
rpm	“revolutions per minute” Umdrehungen pro Minute
R-Gen	Resistenzgen
RT	Raumtemperatur
SA	Salizylsäure
SAR	“systemic acquired resistance”
TB	terrific broth

TBS	“Tris buffered saline” Tris enthaltender Puffer
u.v.a.	und viele andere
VASP	“Vasodilator-activated phosphoprotein”
v/v	“volume per volume” Volumenverhältnis
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein
w/v	“weight per volume” Masse pro Volumen
WRKY	Transkriptionsfaktor
x-Gluc	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure
x-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Pathogene und Resistenz	1
1.1.1 Resistenz, kompatible und inkompatible Interaktion, <i>R</i> -Gene	1
1.1.2 Auslöser und Modulatoren der Abwehrreaktion	2
1.1.3 In dieser Arbeit verwendete Pathosysteme	3
1.2 Pathogenbefall: Vorgänge auf zellulärer Ebene	4
1.2.1 Papillen	5
1.2.2 Transport und Fusion von Vesikeln	6
1.2.3 Veränderungen des Zytoskeletts und Kernwanderung	7
1.2.4 Hypersensitiver Zelltod einer oder mehrerer Zellen	8
1.2.5 Signalmoleküle und Genexpression	9
1.3 Aktin	10
1.3.1 Dynamik von Aktinfilamenten	10
1.3.2 Funktionen des Aktinskeletts	10
1.3.3 Eigenschaften von Aktinen, ihre Gene und ihre Expression	12
1.3.4 Aktin-bindende Proteine	12
1.4 Profilin	17
1.4.1 Wechselwirkungen zwischen Aktin und Profilin	17
1.4.2 Molekülaufbau, Bindungsstellen und Bindungspartner	19
1.4.3 Profilin als Teil von Signaltransduktionswegen	22
1.4.4 Vorkommen, Expression und Lokalisation	23
1.5 Regulation von Wachstumsprozessen	23
1.5.1 Polares Wachstum und seine Abhängigkeit vom Aktinskelett	24
1.5.2 Steuerung durch Signalmoleküle	25
1.6 Ziele der Arbeit	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide	28
2.1.1 Verwendete Pflanzen, Pathogene und Bakterien	28
2.1.2 Plasmide	29
2.1.3 Oligonukleotide	29
2.2 Chemikalien, Medien, Puffer	33
2.2.1 Verwendete Chemikalien	33
2.2.2 Medien	34
2.2.3 Puffer und Lösungen	35
2.3 Kultivierung von Pflanzen und Mikroorganismen	37
2.3.1 Oberflächensterilisation von Samen	37
2.3.2 Pflanzen in Sterilkultur	37
2.3.3 Pikieren von Keimlingen und jungen Pflanzen	38

2.3.4	Pflanzen in Kultivationskammern	38
2.3.5	Pflanzen im Gewächshaus	38
2.3.6	Zellen in Suspensionskultur	38
2.3.7	<i>Phytophthora infestans</i> in Kultur	38
2.3.8	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei (Stamm K1) in Kultur . .	39
2.3.9	Bakterien in Flüssigkultur	39
2.3.10	Bakterien auf festem Medium	39
2.3.11	Anlegen von Stammkulturen	39
2.4	Infektionen	39
2.4.1	Infektion von Suspensionskulturzellen mit Sporen von <i>Phy-</i> <i>tophthora infestans</i>	39
2.4.2	Infektion von <i>Arabidopsis thaliana</i> mit Konidien von <i>Blu-</i> <i>meria graminis</i>	40
2.5	Transformationen	41
2.5.1	Vorbereiten und Transformationen von Bakterien	41
2.5.2	Biologische Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> – “Particle Bombardment”	41
2.5.3	Transiente Transformation von Protoplasten von <i>Petrose-</i> <i>linum crispum</i>	42
2.6	Isolation von Nukleinsäuren	43
2.6.1	Isolation genomischer DNA aus Pflanzen und Suspensions- kulturzellen	43
2.6.2	Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien	44
2.6.3	Isolation von RNA aus Blättern	44
2.7	Methoden der Analyse von Nukleinsäuren	45
2.7.1	Quantifizieren von DNA – Konzentrationsbestimmung . .	45
2.7.2	Quantifizieren von RNA	45
2.7.3	Elektrophoretische Trennung von DNA nach ihrer Größe .	45
2.7.4	Präparation von DNA aus dem Agarosegel	45
2.7.5	Transfer von DNA aus dem Gel auf eine Membran – “Southern Blot”	46
2.7.6	Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter Sonde	46
2.7.7	“Screening” einer cDNA-Bank	47
2.7.8	Sequenzanalyse	48
2.7.9	Computergestützter Sequenzvergleich	48
2.8	DNA-Modifikationen	48
2.8.1	Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mittels Re- striktionsendonukleasen	48
2.8.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden	49
2.8.3	Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase	49
2.8.4	Ligation mittels Rekombinase – Gateway-Klonierung . . .	49
2.8.5	Reverse Transkription	50
2.8.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	50

2.9	Proteinbiochemie	51
2.9.1	Proteinextraktion	51
2.9.2	Präparation von Membranproteinen	51
2.9.3	Elektrophoretische Trennung der Proteine	51
2.9.4	Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran – “Western Blot”	51
2.9.5	Antikörpergewinnung und Antikörperreinigung	52
2.9.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen	54
2.10	Indirekte immunzytochemische Färbung	55
2.10.1	Immunlokalisation in infizierten Suspensionskulturzellen	55
2.10.2	Immunlokalisation in Wurzeln	56
2.10.3	Immunlokalisation in Blüten	56
2.11	Färbetechniken	58
2.11.1	Färben der Pilze	58
2.11.2	GUS-Färbung	58
2.11.3	Färben der Zellkerne	58
2.12	Mikroskopie	58
2.12.1	Mikroskope und Filter	58
2.12.2	Bildverarbeitung	59
3	Ergebnisse	60
3.1	Profiline	60
3.1.1	Gewinnung und Reinigung von Antikörpern	60
3.1.2	Expressionsanalyse mittels Western Blot	62
3.1.3	Immunlokalisation von Profilin in Blüten von <i>Petroselinum crispum</i>	64
3.1.4	Intrazelluläre Lokalisation mittels Profilin-GFP	65
3.1.5	Untersuchung der Profilin-Genfamilie in <i>Petroselinum cris- pum</i> – Southern Blot	67
3.1.6	Klonierung weiterer Profiline aus <i>Petroselinum crispum</i> – “Colony Screening”	68
3.1.7	Profilin-dsRNAi in Protoplasten von <i>Petroselinum crispum</i>	70
3.1.8	Klonierung der Profiline aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
3.1.9	Aktinfilamente in mit Profilin-dsRNAi transient transfor- mierten Epidermiszellen	73
3.1.10	Suche nach Mutanten	76
3.2	Zytologie der Infektion	77
3.2.1	Immunlokalisation von Profilin in infizierten Zellen von <i>Pe- troselinum crispum</i>	77
3.2.2	Expression der Profiline in <i>Arabidopsis thaliana</i> nach In- fektion mit <i>Blumeria graminis</i> f. sp. hordei	81
3.2.3	Profilin-dsRNAi in <i>Arabidopsis thaliana</i> bei Infektion	83

3.2.4	Immunlokalisation von Aktinfilamenten in infizierten Zellen von <i>Petroselinum crispum</i>	85
3.2.5	Aktinfilamente in <i>Arabidopsis thaliana</i> bei Infektion	87
3.2.6	PIP ₂ bei der Infektionsabwehr? – Antikörpertest in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i>	90
3.2.7	Immunlokalisation von PIP ₂ in infizierten Zellen von <i>Petroselinum crispum</i>	91
3.2.8	Beteiligung kleiner GTPasen an der Infektionsabwehr – Antikörpertest im Western Blot	93
3.2.9	Rop in Wurzeln von <i>Arabidopsis thaliana</i> und <i>Petroselinum crispum</i>	94
3.2.10	Immunlokalisation von Rop in infizierten Zellen von <i>Petroselinum crispum</i>	96
3.2.11	Rop-Aktivitätsmutanten bei Infektion	97
4	Diskussion	101
4.1	Profiline: Expression, Lokalisation und Funktion	101
4.1.1	Expression von Profilin in <i>Petroselinum crispum</i>	101
4.1.2	Nachweis und Klonierung von Profilinen aus <i>Petroselinum crispum</i>	102
4.1.3	Profiline im Zytosol – PRF-dsRNAi und Überexpression von PRF-GFP	105
4.1.4	Suche nach Mutanten	110
4.2	Profiline bei der Infektionsabwehr	111
4.2.1	Intrazelluläre Lokalisation von Profilin bei Infektion	111
4.2.2	Profilin-Expression bei Pathogenbefall	114
4.2.3	Verringerte Profilin-Expression – Einfluß auf die Pathogenabwehr	115
4.3	Zellpolarisation: Infektion und Spitzenwachstum	117
4.3.1	Zytologie der Infektion	117
4.3.2	Analogien zum Spitzenwachstum?	122
A	cDNA-Sequenzen der Profiline	126
	Literaturverzeichnis	133

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Pathogene und Resistenz

Eine der auffälligsten Fähigkeiten tierischer Organismen ist den meisten Pflanzen nicht gegeben: Sie können sich nicht aktiv fortbewegen. Das bedeutet, daß sie sich, um zu überleben, ihrem Standort und dessen Bedingungen anpassen müssen. Die Anforderungen sind vielfältig, außer knappen Ressourcen können Konkurrenten, Fraßfeinde und Pathogene das Leben der Pflanze bedrohen. Pflanzen haben im Laufe der Evolution Strategien entwickelt, um sich trotz Konkurrenten und knappen Nährstoffen entwickeln zu können, manche können sich gegen Fraßfeinde wehren. Gegen Pathogenbefall haben Pflanzen vielfältige Abwehrstrategien entwickelt [32]. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Pflanzenzellen mit pilzlichen Pathogenen untersucht.

1.1.1 Resistenz, kompatible und inkompatible Interaktion, *R*-Gene

Alle Pflanzen sind gegenüber der übergroßen Mehrzahl potentieller Pathogene resistent, diese Pathogene können die Pflanze nicht befallen, nicht auf ihr wachsen und sich nicht vermehren, man spricht von Breitband- oder Grundresistenz [69].

Im Gegensatz zur Grundresistenz steht die Wirtsresistenz, die eigentlich einen Spezialfall einer Wirtsbeziehung darstellt. Pilze können die Pflanzen, auf die sie spezialisiert sind, befallen, auf ihnen wachsen und sich vermehren. Diese Pflanzen stellen für diese Pilze Wirte dar. Innerhalb einer gegenüber einem Pathogen ansonsten suszeptiblen, d.h. anfälligen Art oder Gattung treten manchmal Resistenzen einzelner Arten, oft aber nur Sorten oder Kultivare auf, die dann oft auch nur gegen einzelne Isolate eines Pilzes wirksam sind. Diese Resistenz innerhalb einer ansonsten suszeptiblen Gattung oder Art nennt man Wirtsresistenz oder inkompatible Interaktion [69]. Eine kompatible Interaktion liegt dann vor, wenn der Pilz die Pflanze erfolgreich kolonialisieren kann. Der Unterschied zwi-

schen resistent und suszeptibel kann sehr klein sein, er kann nur in einem einzigen Gen bestehen, dessen Vorhandensein oder Fehlen über Resistenz oder Suszeptibilität entscheidet. Solche Gene werden Resistenz- oder kurz *R*-Gene genannt. Ihre Genprodukte interagieren entweder direkt mit Substanzen, die vom Pathogen produziert werden (z.B. durch die *avr*-, die sogenannten Avirulenz-Gene) oder sie stellen einen Teil eines Signalkomplexes dar, der Substanzen des Pathogens erkennt und Verteidigungsmechanismen in Gang setzt [33, 160].

R-Gene sind aus einer Anzahl ähnlicher Module aufgebaut, dazu gehören LRR (Leucin-reiche Abschnitte) und LZ (“leucin zipper”, andere Leucin enthaltende Abschnitte), Kinase-Domänen, NBS (Nukleotidbindungsstellen) und TIR-Domänen (mit Homologien zu tierischen Toll/Interleukin-Rezeptoren) [40]. Ihre Entstehung beinhaltet Genduplikationen und Punktmutationen ebenso wie Duplikation und Deletion kürzerer DNA-Sequenzen [38].

Im Gegensatz zur *R*-Gen-vermittelten Wirtsresistenz wird die oben schon erwähnte Grundresistenz Nichtwirtsresistenz genannt – obwohl sie viel häufiger auftritt, wird sie nach einem Spezialfall der Resistenz benannt. Die Grund- oder Nichtwirtsresistenz beruht auf vielen verschiedenen Genen. Man kann sich zwei verschiedene Funktionsprinzipien vorstellen: Das eine ist eine Art passiver Resistenz, durch ihre Konstitution dient die befallene Pflanze nicht als Wachstumsgrundlage für das Pathogen. Die andere Art ist die aktive Verteidigung und setzt eine Erkennung des potentiellen Pathogens voraus [166]. Thordal-Christensen ordnet die verschiedenen möglichen Resistenzmerkmale einer Pflanze hierarchisch. In seiner Darstellung wird *R*-Gen-vermittelte Resistenz erst wirksam, wenn es dem Pathogen gelingt, alle Hindernisse, die die Pflanze anderen Nichtwirtspathogenen in den Weg legt, zu überwinden [184].

Ein potentieller Verteidigungsmechanismus ist nur dann ein wirklicher, wenn durch ihn das Pathogen vernichtend angegriffen wird. Das kann differentielle Reaktionen auf verschiedene Pathogene beinhalten, trotzdem gibt es Komponenten und Maßnahmen, die gegen eine Reihe von Pathogenen wirksam sind. So sind häufige Resistenzreaktionen in Nichtwirtsbeziehungen wie bei Wirtsresistenz die Synthese von Phytoalexinen, antimikrobiell wirksamen Substanzen, die Bildung einer Papille, einer mechanischen Barriere, die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmoleküle (ROI) und der hypersensitive Zelltod der befallenen Zelle [69]. Manche Pilze wiederum können die Verteidigungsreaktionen der Pflanze spezifisch unterdrücken [69, 164].

1.1.2 Auslöser und Modulatoren der Abwehrreaktion

Oben erwähnt wurden schon die *avr*-Gene, deren Genprodukte mit denen der pflanzlichen *R*-Gene interagieren und so die Erkennung des Pathogens ermöglichen [132]. Es gibt noch weitere Faktoren, die zur Erkennung des Pathogens führen [136]. In Säugerzellen sind das sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) [143]. Charakteristisch für diese Strukturen ist ihre starke

Konservierung. Man nimmt an, daß es essentielle Moleküle des Pathogens sind und solche, die während der Infektion entstehen und wichtig für die Infektion sind. Darum können sie nicht modifiziert werden, um eine Erkennung durch den Wirt zu umgehen. Der Oomycet *Phytophthora sojae* produziert eine Peptidsequenz Pep-13, die Teil einer kalziumabhängigen Transglukanase ist. Solche Glukansasen kommen in allen *Phytophthora*-Arten, aber nicht in anderen Oomyceten und nicht in Pflanzen vor. Dadurch kann Pep-13 die Erkennung des Pathogens durch die Pflanze bewirken. Seine Konservierung innerhalb der Gattung *Phytophthora* läßt vermuten, daß es für Leben oder Infektion des Oomyceten essentiell ist. Es wirkt als Elizitor und ruft in Pflanzen, die damit behandelt werden, Abwehrreaktionen hervor [143].

Auch Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand, die bei der Infektion entstehen, wirken als Elizitoren der Verteidigungsreaktion [69].

Als die ersten pflanzlichen Reaktionen nach der Erkennung des Pathogens wurden veränderte Ionenströme über die Plasmamembran, ein starkes Ansteigen der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration und die Bildung reaktiver Sauerstoffmoleküle (u.a. H_2O_2) durch die Pflanzenzelle beschrieben [116]. Außerdem werden Veränderungen im Phosphorylierungsstatus von Proteinen beobachtet und Änderungen im Expressionsmuster von Genen (zusammengefaßt in [54]). Typische pathogenassoziierte Gene sind die PR-Gene ("pathogenesis related" [43, 174]).

Um nach Pathogenerkennung tatsächlich Resistenz zu vermitteln, sind außer dem *R*-Gen seine Interaktionspartner nötig [75]. Zum Beispiel funktionieren die meisten der *Mla*-Gene in Gerste, wie die mit Resistenz gegenüber *Blumeria* im Zusammenhang stehenden *R*-Gene dort heißen, nur zusammen mit den Produkten zweier weiterer Gene, mit *Rar1* und *Rar2* [164]. In *Arabidopsis thaliana* sind *eds1* und *ndr1* für die Funktion einer gewissen Klasse von *R*-Genen unersetzlich [40].

Auch für die Ausbildung der Nichtwirtsresistenz sind mehrere Genprodukte nötig. Auf die jüngst beschriebenen Mutanten, die in *Arabidopsis thaliana* und *Hordeum vulgare* Resistenz vermitteln, wird in Abschnitt 1.2.2 eingegangen. Noch nicht beschrieben wurde die Mutante *pen2* von *Arabidopsis thaliana*, bei der Nichtwirtspathogene eine erhöhte Penetrationsrate zeigen [105]. Sie wurde für Teile dieser Arbeit verwendet.

1.1.3 In dieser Arbeit verwendete Pathosysteme

In den Teilen dieser Arbeit, in denen die Interaktion zwischen Pflanze und pilzlichem Pathogen untersucht wurde, kamen zwei Pflanze-Pathogen-Systeme zum Einsatz. Beide sind Nichtwirtssysteme und wurden schon beschrieben. Das erste Pflanze-Pathogen-Paar wird gebildet aus Keimlingen des Oomyceten *Phytophthora infestans* und in Suspensionskultur kultivierten Zellen von *Petroselinum crispum* gebildet. Dieses Modellsystem wurde zum ersten Mal von Gross et al. [50] beschrieben. Natürliche Wirte von *Phytophthora infestans* sind Kartoffelpflanzen,

bei denen er die Kraut- und Knollenfäule verursacht. Petersilie ist kein Wirt von *Phytophthora infestans*. Vorgänge, die beim Befall von *Petroselinum crispum* mit *Phytophthora infestans* ablaufen, sind auch in Petersiliezellen aus Suspensionskultur zu beobachten, wenn diese mit dem Pilz infiziert werden. Dazu gehören zelluläre Veränderungen wie das Rearrangement des Zytoskeletts, die Induktion verteidigungsrelevanter Gene und, in manchen Fällen, ein Absterben der betroffenen Zelle [43].

Dieses häufig verwendete System reduzierter Komplexität ermöglicht die Beobachtung intrazellulärer Vorgänge unter relativ einfachen Bedingungen im Labor. Zysten von *Phytophthora* haften während ihrer Keimung an der Oberfläche beschichteter Objektträger. Dadurch werden auch die von ihnen infizierten *Petroselinum*-Zellen aus Suspensionskultur immobilisiert. Nicht infizierte Zellen können durch Spülen entfernt und so die infizierten Zellen und Mikrokalli angereichert werden.

Für Immunlokalisationsstudien wurde dieses System verwendet, in dem eine Behandlung und Beobachtung der infizierten Zellen leicht möglich sind.

Für funktionelle Untersuchungen wurde ein anderes Pflanze-Pathogen-Paar verwendet. *Arabidopsis*-Pflanzen wurden mit Konidiosporen des Ascomyceten *Blumeria graminis* f. sp. hordei, dem Verursacher von Mehltau in Gerste, inokuliert. *Arabidopsis thaliana* stellt für ihn ebenfalls keinen Wirt dar. Konidiosporen von *Blumeria graminis* keimen trotzdem auf Blättern von *Arabidopsis thaliana*. In jüngster Vergangenheit sind zwei Artikel erschienen, die dieses Nichtwirtssystem beschreiben [28, 78]. Es können Infektionsversuche des Pilzes ebenso wie pflanzliche Abwehrmaßnahmen beobachtet werden. Der Vorteil, den *Arabidopsis thaliana* gegenüber *Petroselinum crispum* hat, ist das Vorliegen der (nahezu) vollständigen Genomsequenzinformation, wodurch genetische Untersuchungen leichter möglich sind. Die Beobachtung intrazellulärer Veränderungen wurde in einem Fall auch in *Arabidopsis thaliana* vorgenommen, ansonsten diente dieses System zu genetischen und funktionellen Untersuchungen.

1.2 Pathogenbefall: Vorgänge auf zellulärer Ebene

Über den Erfolg der Infektion durch ein pilzliches Pathogen bzw. den Erfolg der Abwehr derselben durch die Pflanze wird auf zellulärer Ebene entschieden [68, 129, 160]. Zunächst wird hier beispielhaft ein Infektionsversuch des Ascomyceten *Blumeria graminis* beschrieben. Nach Kontakt des Konidiums mit der Kutikula eines Gerstenblattes werden folgende pilzliche Strukturen während der ersten 24 hpi (Stunden nach Inokulation) gebildet:

- Die Konidiospore bildet den primären Keimschlauch innerhalb von 1-2 hpi, er dient der Anheftung der Spore am Blatt der Wirtspflanze.

- An einer anderen Stelle wächst aus der Konidiospore der sekundäre Keimschlauch aus. Er wird auch Appressorium-Keimschlauch genannt und bildet das Appressorium innerhalb von 10-12 hpi.
- Der vom Appressorium gebildete Penetrationskeil durchdringt innerhalb von 16-24 hpi die Zellwand. Es bildet sich das Haustorium, über das die dann auswachsenden Hyphen mit Nährstoffen versorgt werden.

Die Bildung weiteren Myzels an der Blattoberfläche und die Sporulation treten 5 bis 7 Tage nach Inokulation auf [55]. Die Ausbildung von zwei Keimschläuchen ist eine Besonderheit von *Blumeria graminis*, meist werden Anheftung und Appressorienbildung von der selben Struktur, vom Keimschlauch übernommen.

Infektionen können von der Pflanzenzelle in den allermeisten Fällen abgewehrt werden, ohne daß die Pflanze größeren Schaden nimmt. Naton et al. unterscheiden zwei Stadien, in denen das Wachstum des Pilzes aufgehalten werden kann:

- Die infizierte Zelle bildet schnell eine mechanische Barriere an der Zellwand innerhalb der Zelle unterhalb des pilzlichen Appressoriums. Diese wird Papille genannt. Sie verhindert die Infektion der Zelle und das weitere Pilzwachstum.
- Die infizierte Zelle stirbt nach Beginn der Infektion ab und verhindert so das weitere Wachstum des Pilzes (“hypersensitiver Zelltod”, HR) [129].

Die Bildung einer Papille ist ein meist wirkungsvolles Mittel, um die Infektion abzuwehren. Auf sie wird im folgenden näher eingegangen.

1.2.1 Papillen

Lokale Zellwandverdickungen an der Penetrationsstelle als Phänomen der Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen sind seit über hundert Jahren bekannt [1]. Das Auftreten dieser Papille genannten Ablagerung korreliert oft mit einem Mißerfolg der pilzlichen Invasion und unterbindet die weitere Entwicklung des Pilzes. Die Bildung einer Papille wird sowohl bei Nichtwirtsresistenz, als auch in inkompatiblen Interaktionen beobachtet. Besonders bei der auf mlo basierenden Grundresistenz von Gerste gegen Mehltau ist die Bildung einer Papille ein Resistenzkriterium, denn HR wird dort selten beobachtet [160]. Struktur und chemische Zusammensetzung der Papille zeigen große Variabilität, sie enthalten aber meist phenolische Komponenten und Kallose. Andere Papillenbestandteile können Lignin, Zellulose, Pektin, Suberin, Chitin, Lipide und sogar Silikat sein [160]. Auch Proteine wie Peroxidasen oder hydroxyprolinreiche Glykoproteine werden in Papillen an der Zellwand gefunden. Mit der Verdickung der Zellwand einher geht oft auch eine Verbräunung, zumindest unterhalb der Penetrationsstelle, was auf die Ablagerung phenolischer Komponenten schließen läßt [160].

Die Elizitoren der pflanzlichen Abwehrreaktion, und somit der Papillenbildung, können Zellwandkomponenten sein, die entstehen, wenn der Pilz die Zellwand angreift, oder der der Pflanzenzelle entstehende mechanische Schaden [69].

In vielen Fällen wurde im Zusammenhang mit der Papillenbildung das Auftreten von Vesikeln beobachtet, die unterhalb der Penetrationsstelle in der Zelle akkumulierten [55, 164, 172].

Über die genetische Basis von Papillenfunktion und Papillenbildung ist bislang wenig bekannt. Dieser Prozeß der Papillenbildung beinhaltet stark koordinierte und gerichtete Vorgänge wie die Synthese, den Transport, die Sekretion oder die lokalisierte Ablagerung von Verbindungen an oder den Einbau einer großen Vielzahl von Materialien in die Zellwand. Zytologische Daten zeigen, daß das Zytoskelett eine essentielle Funktionen bei der Papillenbildung hat, nicht nur, was Transport, sondern auch, was Signalweiterleitung und Koordination angeht [160].

1.2.2 Transport und Fusion von Vesikeln

Das häufig beobachtete Auftreten von Vesikeln im Zusammenhang mit der Bildung einer Papille läßt die Frage nach ihrer Funktion und ihrem Inhalt aufkommen. So wird bei der Infektion von Hirse mit dem Pilz *Colletotrichum graminicola* die Akkumulation von Vesikeln unterhalb der Penetrationsstelle beobachtet, die miteinander verschmelzen. Sie enthalten antimikrobiell wirksame Substanzen [172]. In Gerste sind die gebildeten Papillen von einem Ring von Vesikeln umgeben, die Zellwandmaterial für die lokale Verstärkung der Zellwand an der Infektionsstelle liefern. Färbung mit Diaminobenzidin (DAB) zeigt, daß diese Vesikel H_2O_2 enthalten. Auch Vesikel, die kein H_2O_2 enthalten, zeigen Autofluoreszenz und enthalten also wahrscheinlich phenolische Komponenten [55].

Der Transport von Vesikeln innerhalb einer Zelle geschieht zielgerichtet von einer Ausgangsmembran zu einer Zielmembran. An der Ausgangsmembran werden Vesikel durch Abschnürung erzeugt. In den Transport von Vesikeln sind viele Proteine involviert [9, 157]. Das erste Protein, das als für den Vesikeltransport notwendig identifiziert wurde, ist NSF (*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein), eine zytosolische ATPase. NSF ist über α -SNAP (“soluble NSF-attachment protein”) mit der Membran assoziiert. α -SNAP interagiert mit SNAP-Rezeptoren, die SNAREs genannt werden [37, 156]. Die von Söllner et al. aufgestellte Hypothese zum Vesikeltransport besagt, daß die Verbindung von Vesikeln mit spezifischen Zielmembranen durch verschiedene Typen von SNAREs ermöglicht werden, nämlich durch die Interaktion von Vesikel-SNAREs (*v*-SNARE) mit Ziel-SNAREs (Target-SNARE. *t*-SNARE) [173]. Zu den *v*-SNAREs an der Membran von Vesikeln gehört Synaptobrevin, zu den *t*-SNAREs an der Plasmamembran gehören Syntaxin und SNAP-25 [37]. Collins et al. zeigten in einem kürzlich erschienenen Artikel, daß SNARE-Proteine auch für die erfolgreiche Pathogenabwehr von entscheidender Bedeutung sind [28]. Sie verglichen die Mutante *pen1* aus *Arabi-*

dopsis thaliana, die ein Defizit in der Nichtwirtsresistenz aufweist, mit der Mutante *ror2* aus *Hordeum vulgare*. Beide haben einen Defekt in einem Syntaxin. Das deutet darauf hin, daß es nicht nur evolutionär konservierte, sondern auch funktionale Gemeinsamkeiten zwischen Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis thaliana* und Grundresistenz in Gerste gibt.

In Wurzelhaaren ist ein funktionierender Vesikletransport ganz entscheidend für das Wachstum des Wurzelhaares an der Zellspitze [124]. Ebenso ist das Wachstum von Pollenschläuchen auf den Transport von Vesikeln, die das Material für den Aufbau der Zellwand zur Spitze der wachsenden Zelle bringen, angewiesen [190].

1.2.3 Veränderungen des Zytoskeletts und Kernwanderung

An der Infektionsstelle gehen in der betroffenen Zelle dynamische metabolische und strukturelle Veränderungen vor sich. Diese wurden von vielen Autoren untersucht [54, 128, 161, 168]. Trotz der Unterschiede zwischen den verwendeten Modellsystemen zeigen sich auffällige Ähnlichkeiten. So zeigen Kobayashi et al. [92] die Zunahme der Zytoplasmastränge bei der Infektion von Gerste mit Sporen von *E. graminis* (Wirtspathogen) und *E. pisi* (Nichtwirtspathogen). Nicht nur die Anzahl der beobachteten Zytoplasmastränge, vor allem ihre Orientierung verändert sich [169]. Besonders eindrucksvoll sind die Experimente von Gus-Mayer et al. [54]. Sie simulieren die Infektion einzelner Zellen durch Mikromanipulation. Dabei werden eingebettete Zellen mit einer Wolframnadel, deren Durchmesser dem einer Pilzhyphe entspricht, leicht berührt, aber nicht verletzt. Dieser Druck löst die aus vielen Pathosystemen bekannten Reaktionen der Zelle aus, u.a. die Reorientierung der Zytoplasmastränge. Die Zytoplasmastränge nehmen Kontakt zu der Stelle auf, an der die Nadel die Zelle berührt. Ein Großteil der Zytoplasmastränge orientierte sich in dieser Weise [54].

Mit der veränderten Orientierung geht eine starke Zunahme der Zytoplasmaströmung einher [43]. Starke Zytoplasmaströmung ist auch von Zellen bekannt, die sich durch Spitzenwachstum ausdehnen. Starke Zytoplasmaströmung ist ein Charakteristikum wachsender Pollenschläuche, auch wachsende Wurzelhaare zeigen zur Spitze gerichtete Zytoplasmaströmung [42, 190]. Ähnlich wie in letzteren, wo der Zellkern in das wachsende Wurzelhaar einwandert und immer in der Nähe der Spitze bleibt [6], wandert auch in infizierten Zellen – und solchen, in denen die Infektion mechanisch simuliert wird – der Zellkern zusammen mit einem Teil des Zytoplasmas in die Nähe der Infektionsstelle [54, 67]. Über die Bedeutung dessen kann bisher nur spekuliert werden. Sie könnte in der Verkürzung der Wege zwischen dem Zellkern und der metabolisch aktiven Stelle liegen, was die Kontrolle der Vorgänge ebenso wie den Transport von Substanzen erleichtern würde [160]. Außer Proteinen und Metaboliten ist möglicherweise mRNA zu transportieren.

So könnte die Lokalisation von Proteinen durch die Lokalisation ihrer mRNA und lokale Proteinsynthese verursacht werden. Spezifische Lokalisation von mRNA an der Spitze wachsender Wurzelhaare wurde auch von Baluška et al. beschrieben [6].

In den Experimenten von Gus-Mayer et al. konnte die durch Berührung der Zelle mit einer Nadel ausgelöste Kernwanderung durch Behandlung mit dem Inhibitor Cytochalasin unterbunden werden [54].

E. pisi ist für Gerstenpflanzen ein Nichtwirtspathogen, dem Pilz gelingt es nicht, in Epidermiszellen der Pflanze einzudringen. Werden die Pflanzen aber mit Cytochalasinen, Inhibitoren der Aktin-Polymerisation, behandelt, gelingt es *E. pisi*, Zellen erfolgreich zu penetrieren [91]. Ebenso wie die Kernwanderung wird die Ablagerung von Kallose durch Inhibitoren des Zytoskeletts unterbunden [131].

Auch bei der Interaktion von Leguminosen mit Rhizobiumbakterien ist die schnelle Depolymerisation der Aktinfilamente ein notwendiger Schritt für ein erfolgreiches Eindringen der Symbionten in die Wurzelhaare der Pflanze. Sie wird durch *Nod*-Faktoren (Lipo-chitooligosaccharide) induziert [131].

Inhibitoren der Mikrotubuli-Polymerisation zeigen einen geringeren oder gar keinen Effekt auf Kernwanderung und Infektionsverhalten von Pilzen. Diese Daten belegen die fundamentale Bedeutung intakter Aktinfilamente für die erfolgreiche Pathogenabwehr.

1.2.4 Hypersensitiver Zelltod einer oder mehrerer Zellen

Nach der Bildung der Papille ist der hypersensitive Zelltod ein häufig eingesetztes Mittel zur effektiven Abwehr des eindringenden Pilzes [151, 161]. Damit opfert die Pflanze eine, nämlich die betroffene Zelle, um das eindringende Pathogen zu isolieren und abzutöten und so die ganze Pflanze vor der Kolonialisierung durch das Pathogen zu bewahren [145]. Apoptose ist auch in tierischen Organismen ein Mittel der aktiven zellautonomen Pathogenabwehr [69]. Der Mechanismus, der in Pflanzen zum hypersensitiven Zelltod führt, ist weitgehend unbekannt [129]. Die Vorgänge beim Tod befallener Zellen ähneln sich zwischen den Pflanzenarten, können aber in unterschiedlichem Tempo ablaufen. So sterben befallene Kartoffelzellen recht schnell ab, zu beobachten sind eine Verlangsamung der Zytoplasmaströmung, die zum Erliegen kommt, und Veränderungen des Zytoplasmas, dessen Erscheinungsbild zunehmen granulär wird, bis schließlich der Protoplast kollabiert [160]. Dem Pilz wird dadurch, sofern er durch diesen Vorgang nicht direkt betroffen ist, die Nahrungsgrundlage entzogen [23].

In Gerstenpflanzen kann in einigen Fällen die Infektion auch durch Absterben der Mesophyllzellen unterhalb der befallenen Epidermiszelle abgewehrt werden [55]. Da biotrophe Pilze auf lebende Wirtszellen als Nahrungsgrundlage angewiesen sind, können einige von ihnen den Zelltod in der Wirtspflanze aktiv unterdrücken. Das zeigt der sogenannte "green island effect". Dort verhindert die

Infektion mit *Blumeria graminis* den Chlorophyllabbau in infizierten Zellen, der in den übrigen Zellen stattfindet, wenn grüne infizierte Blätter einige Tage im Dunkeln inkubiert werden und etiolieren [164].

Daß der Zelltod infizierter Zellen ein aktives Programm und nicht eine passive Folge der Infektion ist, zeigt die Notwendigkeit der Proteinsynthese für die Hypersensitivitätsreaktion [161].

1.2.5 Signalmoleküle und Genexpression

Da die von der Pflanze eingesetzten Mittel zur Pathogenabwehr zwar meist erfolgreich, aber wahrscheinlich sehr energieintensiv sind, muß die Pflanze versuchen, nur die wirklich erforderlichen Maßnahmen zu ergreifen und erfolgreich einzusetzen, um die damit verbundenen "Kosten", Energieverbrauch und Reduktion der "Fitness" der ganzen Pflanze, so gering wie möglich zu halten [160].

Zu den Signalen, die die pflanzlichen Abwehrreaktionen hervorrufen, gehören die vom Pilz produzierten Elizitoren, die Verletzung der Zellwand durch das Pathogen und auch der vom Pilz ausgeübte mechanische Druck (siehe Abschnitte 1.2.1 und 1.2.3). Die Koordination der zellulären Antwort erfolgt aber durch interne, pflanzliche Signale, zu denen sowohl die Erhöhung der zellulären Kalziumkonzentration [16, 86] als auch die Erzeugung reaktiver Sauerstoffmoleküle gehören [119].

Man kann zwei Wellen von H_2O_2 -Entwicklung in Nichtwirtsbeziehungen beobachten. Die erste H_2O_2 -Entwicklung ist sehr lokal und tritt an der Stelle der versuchten Penetration auf [50, 164]. Hückelhoven et al. zeigen, daß bei Infektionen, die durch Papillenbildung erfolgreich abgewehrt werden, die Bildung effektiver Papillen mit dem Auftreten von H_2O_2 an diesen Stellen einhergeht. Dabei ist nicht die Papillenbildung als solche mit dem Auftreten von H_2O_2 korreliert, Papillen werden auch ohne lokale H_2O_2 -Entwicklung gebildet. Die Pilzentwicklung wird aber nur durch die Papillen zum Stillstand gebracht, bei deren Bildung H_2O_2 entwickelt wurde [55].

Der Entwicklung von H_2O_2 werden mehrere Funktionen zugemessen: Einerseits kann H_2O_2 direkt toxisch auf den Pilz wirken, zum anderen können reaktive Sauerstoffmoleküle die Papillen durch oxidative Vernetzung ihrer Komponenten verstärken [2, 69]. Die Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle wirkt auch als Signal [66, 77]. Sie induziert die Expression verteidigungsrelevanter Gene. Dazu gehören die PR-Gene wie PR1 in *Petroselinum crispum* und PR1-1 in *Solanum tuberosum*, außerdem u.a. PAL (Phenylalanin-Ammonium-Lyase) und 4CL (4-Coumarat:CoA-Ligase) [31, 44, 58]. Außerdem ist der hypersensitive Zelltod mit dem Auftreten von H_2O_2 in Konzentrationen korreliert, die für die Zelle noch nicht direkt toxisch wirken [69, 76, 116].

1.3 Aktin

Wie wichtig ein intaktes und funktionierendes Zytoskelett ist, zeigte schon der Abschnitt 1.2.3. Seine Funktionen sind aber viel umfassender. Hier wird weniger auf Mikrotubuli, sondern mehr auf Aktinfilamente eingegangen.

1.3.1 Dynamik von Aktinfilamenten

Aktinfilamente sind aus Untereinheiten, aus monomeren Aktinmolekülen (“globular actin”, G-Aktin), aufgebaut. Im Filament (F-Aktin) haben die Monomere die gleiche polare Orientierung, sie bilden ein doppelsträngiges gewundenes Seil mit einem Wiederholungsabstand von 38 nm, was ca. 13 Monomeren entspricht. Die polare Orientierung der Monomere führt zu einer Polarität des Filaments, das ein schnell wachsendes (Plus-) und ein langsam oder gar nicht wachsendes (Minus-)Ende besitzt. Die Filamente werden ständig umgebaut, Aktin polymerisiert aus dem Pool von G-Aktin, beim Filamentabbau entstehende Monomere kehren wieder in diesen zurück [153].

Die Polymerisation von Aktin verläuft am Plus-Ende effizienter. Unpolymerisiertes Aktin ist in der Zelle an ADP oder ATP gebunden, ATP-Aktin polymerisiert leichter als ADP-Aktin [153]. Wahrscheinlich liefert die Hydrolyse von Aktin-gebundenem ATP die Energie, die zum Filamentaufbau nötig ist [182]. ATP-gebundenes Aktin wird an das Filamentende angelagert, ATP wird zu ADP hydrolysiert, dann dissoziiert der inorganische Phosphatrest langsam. Diese Dissoziation markiert das Alter des Aktinfilaments und ist ein Signal zum Abbau, besonders von Filamentverzweigungen [13]. Bemerkenswert ist, daß Aktin an einer Stelle in der Zelle zu Filamenten polymerisieren kann und die Filamente an einer anderen Stelle derselben Zelle statisch sind oder sogar abgebaut werden.

1.3.2 Funktionen des Aktinskeletts

Das Zytoskelett verbindet zytosolische Komponenten mit der Plasmamembran. Es gewährt Anschluß zu den Rezeptoren, leitet Signale weiter und beeinflusst zelluläre Antworten. Es ist Gerüst und Signalapparat eukaryotischer Zellen [153, 193]. In der Interphase bilden Aktinfilamente Netzwerke und dehnen sich durch das gesamte Zytoplasma aus, womit sie die Grundlage für die Zytoplasmaströmung bilden [153]. Die Aktinfilamente bilden ein Netz um den Nukleus, von wo aus sie in Bündeln zur Peripherie “strahlen”, dort bilden sie subkortikale Bündel und liegen in einzelnen Strängen entlang der Mikrotubuli. Obwohl sich die meisten Pflanzenzellen nicht bewegen und eine starre Zellwand haben, kann die intrazelluläre Bewegung sehr stark sein. [153].

Zu den umfassenden Funktionen des Aktinskeletts gehören:

- die Bereitstellung dynamischer Bahnen für die Zytoplasmaströmung

- die Koordination von Entwicklung und Zellwandablagerungen
- die Etablierung der Zellpolarität
- die Zellelongation und das Spitzenwachstum
- die Positionierung von Rezeptoren und der Transmembrantransport
- der intrazelluläre Protein- und mRNA-Transport
- die Orientierung der Chloroplasten in Abhängigkeit vom Licht, die Positionierung von Zellkern und Organellen
- die Reaktion der Zelle auf Pathogenbefall [115, 118].

Aktin wirkt entscheidend am Zellwachstum und an der Gestaltung der Zellmorphologie mit [113]. Damit hat das zelluläre Aktinskelett auch Einfluß auf die Morphologie der gesamten Pflanze, da Wachstumsprozesse ein Zusammenspiel aus Zellteilung, Zelldifferenzierung und Zellwachstum darstellen [115, 118]. Das Wachstum einer einzelnen Zelle wiederum ist ein Zusammenspiel von Ausdehnung der Zelle und Zellwandaufbau [111]. Beides wird durch das Zytoskelett gesteuert und koordiniert [131]. Bei der Ausdehnung der Zelle wirken der Turgor und das Aktinskelett zusammen, das auch die Adhäsion von Zytoskelett und Plasmamembran vermittelt [150]. Neuere Überlegungen gehen davon aus, daß auch pflanzliche Wachstumsprozesse eine Art Bewegung darstellen, bei denen die Membran durch das Filamentwachstum in eine bestimmte Richtungen gedrängt wird [6, 7]. Aktinfilamente zeigen während des Spitzenwachstums in Pollenschläuchen und Wurzelhaaren eine spezielle Lokalisation, auf die Abschnitt 1.5 noch eingegangen werden wird.

Das Zytoskelett verändert sich während des Zellzyklus. Aktinfilamente reagieren auf interne und externe Stimuli. Während der Wachstumsphase wachsen auch die Filamente selbst. Trotzdem muß das Zytoskelett auf externe Stimuli wie Gravitropismus, Pathogene und Symbionten reagieren. Eine wichtige Komponente der Aktinfilamentregulation ist die gerichtete lokale Polymerisation und damit Elongation von Filamenten [153, 175].

Häufig findet man in der Zelle eine Kolokalisation von Aktinfilamenten und Mikrotubuli [153]. Im Gegensatz zu tierischen Zellen benutzen verschiedene Organellen in Pflanzen Aktinfilamente bzw. -filamentbündel und nicht Mikrotubuli als Bahnen für ihre intrazelluläre Bewegung. Manche Organellen können zwischen Aktinfilamenten und Mikrotubuli als Basis für ihre Bewegung wechseln. So wirken die Komponenten des Zytoskeletts kooperativ und nicht exklusiv bei der Organellbewegung [112].

1.3.3 Eigenschaften von Aktinen, ihre Gene und ihre Expression

Aktine treten in allen untersuchten Eukaryoten auf, sie haben ein Molekulargewicht zwischen 42 und 45 kDa und einen isoelektrischen Punkt um pH 5,8 [153]. Ihre Sequenz ist, auch zwischen Tier- und Pflanzenreich, stark konserviert, so findet man Sequenzhomologien um 80 % [153]. Besonders in Pflanzen werden Aktine durch auffallend große Genfamilien kodiert, Petunien haben bis zu einhundert Aktinegene [115]. In *Arabidopsis thaliana* gibt es zehn Aktinegene, acht davon werden tatsächlich exprimiert. Diese acht Gene können hinsichtlich ihrer Sequenz in zwei Klassen eingeteilt werden, in vegetativ und reproduktiv exprimierte Aktinegene [115]. Die Expression der Aktinegene ist in *Arabidopsis thaliana* gut untersucht. Zu den vegetativ exprimierten Genen gehören AtACT2 und AtACT8, deren Expression in den meisten Geweben überwiegt und relativ konstant ist. Das dritte der vegetativen Aktinegene aus *Arabidopsis thaliana*, AtACT7, wird stark in jungen, wachsenden Geweben exprimiert. Seine Expression kann durch eine Reihe von Stimuli beeinflusst werden, zu diesen gehören die meisten Phytohormone [117]. Auch Verwundung kann seine Expression induzieren. Jin et al. gelang die Identifikation eines Aktinogens aus Malve, dessen Expression beim Befall der Pflanze mit dem Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* induziert wird. Es fällt beim Vergleich mit den Aktinogenen aus *Arabidopsis thaliana* in die Unterklasse der vegetativ exprimierten Gene und zeigt die größte Homologie zu AtACT7 [80]. Dies ist der erste Report eines durch Pathogenbefall induzierten Aktinogens. Er zeigt gleichzeitig die evolutionäre Konservierung von Sequenz, Expression und möglicher Funktion.

Die Expression einzelner Gene der großen Aktinogenfamilien überlappt, d.h. in einem Gewebetyp, sogar in einer Zelle werden verschiedene Aktinegene exprimiert. Die funktionelle Bedeutung des Vorhandenseins mehrerer Isoformen in einer Zelle ist noch nicht verstanden, zwei verschiedene Erklärungsmöglichkeiten bieten sich an: Einerseits gewährt die Expression mehrerer ähnlicher Gene ein gewisses Maß an Stabilität und Robustheit, andererseits ist auch die Annahme berechtigt, daß verschiedene Aktine tatsächlich verschiedene Funktionen wahrnehmen und eine sehr feine Regulation des Zytoskeletts ermöglichen [117, 131].

1.3.4 Aktin-bindende Proteine

Es gibt eine große Vielzahl Aktin-bindender Proteine.

Aktin-bindende Proteine regulieren die Größe und Aktivität des Pools und die Umsatzrate von Aktin-Untereinheiten, die Nukleation von Filamenten, die subzelluläre Lokalisation dieses Prozesses und die Organisation von Aktin in Strukturen höherer Ordnung (Bündel o.ä.) [115]. Aktin kommt in der Zelle als Monomer, als Filament und als Filamentaggregat vor. Die große Vielzahl bekannter Aktin-bindender Proteine kann man durch Einteilung in verschiedene Klassen sortieren

[176], es gibt Proteine, die

- Aktinmonomere binden, sie dienen der Regulation der Polymerisation und Depolymerisation von Aktin
- an die Enden bestehender Filamente binden, sie verhindern die Verlängerung dieser Filamente ebenso wie den Verlust von Monomeren vom Filamentende
- seitlich an Aktinfilamente binden, sie stabilisieren die Filamente oder bewirken ihren Abbau, vernetzen sie zu Netzwerken oder Filamentbündeln oder bewirken den Transport entlang der Filamente.

Die Interaktion zwischen Aktin-bindenden Proteinen und Aktin in Filamenten bzw. Aktinmonomeren ist nötig, um die Organisation und die Dynamik des Aktinskeletts zu modulieren [175]. Signale, die die Zellmorphogenese betreffen, modifizieren das Aktinskelett. Aktin-bindende Proteine sind Zwischenglieder zwischen Signaltransduktion und der Reorganisation des Zytoskeletts [115, 153].

Proteine, die an Monomere und Filamentenden binden

Aktinfilamente polymerisieren und depolymerisieren ständig aus einem Pool von Aktinmonomeren. Die Interaktion von Aktinmonomeren mit Aktin-bindenden Proteinen steuert die Dynamik von Aktin [29, 153].

Zu den Aktin-bindenden Proteinen, die Aktinmonomere binden, gehört Profilin, dem wegen seiner Bedeutung für diese Arbeit ein ganzer Abschnitt (Abschnitt 1.4) gewidmet wird, außerdem das aus tierischen Organismen bekannte Thymosin und ADF (actin depolymerising factor), der weiter unten diskutiert wird. Thymosin $\beta 4$ bindet G-Aktin. Durch die Bindung an Thymosin werden die Aktinmonomere dem Gleichgewicht zwischen G- und F-Aktin entzogen, was die Polymerisation von Aktin behindert. Auch auf die Wirkung von Thymosin wird im Abschnitt 1.4.1 nochmals eingegangen.

Zu den Aktin-bindenden Proteinen, die an die Enden bestehender Filamente binden, gehören die sogenannten "Capping Proteine". Ihre Bindung an das Filamentende verhindert die Anlagerung weiterer Aktinmonomere und somit die Verlängerung der Filamente. Sie verhindert auch die Anlagerung von Aktinfragmenten, wie sie beim Abbau von Filamentverzweigungen oder beim Filamentabbau unter Beteiligung von ADF entstehen [13].

Die Besetzung einzelner Filamentenden kann die Aktinpolymerisation an anderen Stellen fördern, da so die vorhandenen Monomere gezielt zur Filamentverlängerung eingesetzt werden können. Sie regulieren also nicht nur die Dynamik der Filamente, an die sie binden und deren Elongation sie verhindern, sondern auch die Dynamik anderer Filamente, deren Elongation sie indirekt fördern. Gelsolin als ein Capping Protein stellt durch seine Bindung an das Filamentende eine

Verbindung des Aktinskeletts mit der Plasmamembran her [108]. Gelsolin wird durch Kalzium und das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-diphosphat (PIP_2) reguliert [190]. Gelsoline wirken beim Pollenschlauchwachstum mit [153, 190]. Bewegung auf der Basis von Aktinpolymerisation läuft in der Gegenwart von Gelsolin schneller ab [141].

ADF

ADF ist ein Aktin-bindendes Protein, das am Umbau der Aktinfilamente, und insbesondere an ihrem Abbau, beteiligt ist. ADF kann sowohl Aktinmonomere als auch F-Aktin binden [153]. Seine Wirkung auf Aktinfilamente ist abhängig vom pH-Wert. Bei saurem pH bindet ADF an Filamente, bei basischem pH fördert es deren Depolymerisation [53, 176, 190]. Nichtpflanzliche ADF werden oft Cofiline genannt. ADF und Cofiline werden als zu einer Familie gehörig betrachtet [153]. Diese Proteine haben eine Größe zwischen 15 und 22 kDa [115]. Sie werden in Tieren und Pflanzen exprimiert. In *Arabidopsis thaliana* und Mais bilden ADFs kleine Genfamilien, in *Arabidopsis thaliana* gibt es mindestens sechs Isoformen. In Mais gibt es mindestens drei ADFs, die in konstitutiv und pollenspezifisch exprimierte Isoformen unterteilt werden können [176]. Auf Sequenzebene ist die Ähnlichkeit zwischen tierischen und pflanzlichen ADFs gering, aber Aminosäuren an der Phosphorylierungsstelle und an den Positionen, die zur Aktinbindung oder zur Bindung anderer Partner beitragen, sind konserviert [153]. Außerdem wird die Aktivität von ADF durch Phosphoinositide reguliert [115].

ADF kann, ebenso wie Profilin, außer Aktin auch PIP_2 binden und dieses Phospholipid vor der Hydrolyse durch die Phospholipase C (PLC) schützen [53]. Durch die Bindung von PIP_2 wird die Bindung von ADF an Aktin inhibiert. Auch die Phosphorylierung von ADF behindert seine Bindung an und seine depolymerisierende Wirkung auf Aktin [115]. ADFs werden am C-terminalen Serin phosphoryliert [14, 115, 131, 176].

ADF tragen durch die Depolymerisation und den Abbau älterer Filamente zur Erhöhung des Aktinumsatzes in der Zelle bei [120]. ADF1 aus *Arabidopsis thaliana* (AtADF1) hat ausschließlich depolymerisierende Wirkung [115]. Actophorin, auch ein ADF, bewirkt die schnellere Dissoziation des Phosphatrestes, der bei der Hydrolyse von ATP zu ADP im Aktinfilament entsteht [13]. Das fördert die Depolymerisation und speziell den Abbau von Verzweigungen von Aktinfilamenten [13]. Man nimmt an, daß ADF bestehende Filamente zerreißen kann, denn die bei niedrigem pH mit ADF besetzten Filamente depolymerisieren sehr rasch bei Erhöhung des pH-Wertes [115]. Dadurch erhöht sich wiederum die Anzahl von Filamentenden, die zur Elongation zur Verfügung stehen [120]. ADF inhibiert den Nukleotidaustausch am G-Aktin [153].

Die physiologische Wirkung von ADF bei Mikroinjektion in Staubblatthaarzellen von *Tradescantia* ist die Zerstörung der Zytoplasmastränge und der Zytoplasmaströmung. Im Gegensatz zur Injektion von Profilin können diese sich aber

erholen, innerhalb von 25-40 min sind die ersten Aktinfilamente wieder sichtbar [74]. In wachsenden Wurzelhaaren ist ADF schon ganz zu Beginn, wenn der Trichoblast die Bildung des Wurzelhaares initiiert, an der Stelle zu sehen, an der das Wurzelhaar auswachsen wird [79]. Von tierischen ADFs ist bekannt, daß sie zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern pendeln [8]. Auch ADF aus *Zea mays* (ZmADF3) wird im Zellkern gefunden [79]. Obwohl von ADF selbst keine filamentbündelnde Wirkung bekannt ist, scheint ADF trotzdem die Filamentbündelung zu fördern. Die Überexpression von ADF führt in *Dictyostelium discoideum* zur Bildung dicker Filamentbündel [74].

Es ist vorstellbar, daß lokale Änderungen im pH-Wert oder von pH-Gradienten, z.B. beim Spitzenwachstum von Pollenschläuchen, die Aktivität von ADF modulieren [53]. ADF-Funktion ist für die Motilität auf der Basis von Aktin(-Polymerisation) zwingend erforderlich [120]. Profilin und ADF erhöhen beide die Dynamik von Aktinfilamenten als Antwort auf externe und endogene Stimuli, aber durch verschiedene Mechanismen [6]. ADF vergrößert den Pool von Aktinmonomeren. ADF ist *in vivo* im gesamten Zytoplasma verteilt und vor allem da zu finden, wo Aktinfilamente akkumulieren und der Durchsatz hoch ist [153].

Vernetzung von Aktinfilamenten

Aktinfilamente liegen in drei verschiedenen räumlichen Ordnungen vor: als einzelne Filamente, als Netzwerke oder als Bündel. Die Bildung von Aktinnetzwerken und Bündeln erfordert die Gegenwart quervernetzender Proteine. Diese müssen mindestens zwei Aktinbindungsstellen haben oder mindestens als Dimere funktionieren. Im allgemeinen sind quervernetzende Proteine, die Aktin in Netzwerken organisieren, lange Moleküle von hohem Molekulargewicht. Sie bilden selbst Brücken zwischen den Filamenten und führen zur Bildung loser Netzwerke [153]. Proteine, die Aktin bündeln, sind kleiner und von globulärer Form, sie bringen die Filamente in dichtgepackte Bündel [140].

Zur Gruppe der Vernetzer gehört u.a. die Spektrin-Familie. Spektrine sind multifunktionale Aktin-bindende Proteine. Ihre Aufgabe ist der Erhalt von Form und mechanischen Eigenschaften der Zelle. Sie regulieren den Transport von Vesikeln und deren Interaktion mit Membranen. In Pflanzenzellen wurden Spektrine bzw. Spektrin-ähnliche Proteine in Zellen von *Vicia faba* entlang der Plasmamembran gefunden [153]. Da Spektrin-ähnliche Proteine an der Plasmamembran vornehmlich in wachsenden Zellen gefunden werden, hat sich der Einsatz von Antikörpern gegen Spektrine als guter Marker für Zellwachstum etabliert. Das Spektrin-ähnliche Epitop ist an der Spitze von wachsenden Wurzelhaaren zu finden, nicht aber in ausgewachsenen Haaren [153]. Fimbrin und das actin bundling protein (P-135-ABP) sind Aktin-bindende Proteine, die in Pflanzen identifiziert wurden [98, 201]. Auch Talin gehört zu den Aktin-vernetzenden Proteinen [162].

Bewegung durch Aktinfilamente

Aktinfilamente bilden die Basis für die Zytoplasmaströmung in der Zelle. Sie wird verursacht durch die Bewegung von Organellen entlang der Aktinfilamente. Zytoplasmaströmung verläuft in der Richtung des Plusendes der Aktinfilamente [190]. Myosinbesetzte Organellen werden entlang der Filamente oder Filamentbündel bewegt. Diese Bewegung kann durch die kalziumabhängige Phosphorylierung von Myosin verhindert werden [178]. Man nimmt an, daß die myosingetriebene Organellbewegung die Zytoplasmaströmung und so den Stoff- und Gasaustausch innerhalb der Zelle bewirkt [117].

Myosine sind aktinbasierte Motorproteine und haben eine konservierte Motor-domäne, die für die Bindung an Aktin verantwortlich ist. Die Schwanzdomänen sind variabel, so können wahrscheinlich verschiedene Partner gebunden werden [131]. In Pflanzen bilden Myosine große Genfamilien [117]. Allerdings unterscheiden sich die pflanzlichen Myosine von den aus Tieren bekannten [131]. Die myosinabhängige Bewegung läuft unter Energieverbrauch ab, die Energie wird durch die Hydrolyse von ATP zu ADP am Myosin zur Verfügung gestellt [131].

Myosine sind zwar wichtig für die Bewegung von Organellen in der Zelle, es gibt aber auch verschiedene Arten myosinunabhängiger Bewegung. So beschreiben Mathur et al. [112] die Bewegung von Peroxisomen in der Zelle, die wahrscheinlich durch die Polymerisation von Aktin und weniger durch Myosine angetrieben wird, wie Inhibitorstudien zeigen. Auch die Bewegung von Mitochondrien in Hefezellen wird durch die Aktinpolymerisation angetrieben.

Außer der aktinbasierten Bewegung gibt es Bewegung entlang der Mikrotubuli, die durch Motorproteine wie Dynein und Kinesin angetrieben wird. Auch diese beiden Proteine haben ATPase-Funktion [131].

Verzweigung und Nukleation von Aktinfilamenten

Der aus sieben verschiedenen Proteinen bestehende Arp2/3-Komplex ist nach zwei seiner Bestandteile benannt, nach den aktinähnlichen Proteinen Arp2 und Arp3 (actin related protein) [107]. Der Arp2/3-Komplex kann mit Profilin interagieren, deshalb wird in Abschnitt 1.4 nochmals auf ihn eingegangen.

Der Arp2/3-Komplex erfüllt mehrere wichtige Funktionen, er

- fördert die Aktinpolymerisation *in vitro*
- initiiert die Bildung neuer Aktinfilamente
- bewirkt Verzweigungen von Aktinfilamenten
- ist essentiell für Aktinpolymerisation und Lebensfähigkeit der Zelle
- ist entscheidend für die Myosin-unabhängige Bewegung auf der Basis der Aktinfilamente

- führt zur Bildung und Bewegung von Membranfortsätzen
- wirkt an der intrazellulären Fortbewegung von Parasiten mit [12, 114, 195]

Die durch den Arp2/3-Komplex vermittelte Verzweigung von Aktinfilamenten ist entscheidend für die myosinunabhängige Bewegung. Aktinfilamente treiben allein durch die Kraft ihrer Polymerisation die Membran der Zelle vor sich her [120]. In Säugerzellen wird der Arp2/3-Komplex u.a. durch WASP (Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein), aber auch durch PIP_2 und kleine GTPasen aktiviert [13, 108].

Auch in Pflanzen wurden Teile des Arp2/3-Komplexes gefunden. Klahre und Chua beschreiben die Isolation eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, das Ähnlichkeit zu Arp2 aufweist. Dieses Protein zeigt, wie andere Arps, zwischen 35 und 55 % Homologie mit bekannten konventionellen Aktinen, die Arps sind aber untereinander stark konserviert [87]. Arp2 wird in allen untersuchten Geweben, wenn auch nur auf geringem Niveau, exprimiert, starke Expression wird in Pollen und den Nachbarzellen des Xylems gefunden. Baluška et al. zitieren unveröffentlichte Daten, nach denen der Arp2/3-Komplex auch in Wurzelhaaren von Mais und dort besonders an der Zellspitze gefunden wird [6].

1.4 Profilin

Das erste Profilin wurde 1977 von Carlsson et al. als Aktin-bindendes Protein beschrieben [21]. Heute sind Profiline aus vielen Eukaryoten bekannt ([84], [123], [189], [197] u.v.a.). Die Tertiärstruktur mehrerer Profiline wurde aufgeklärt, z.B. von Profilinen aus Rindermilz, vom Menschen und von *Acanthamoeba*. Profiline zeigen, trotz geringer Sequenzhomologie, große Ähnlichkeit in ihrer räumlichen Struktur ([158] und Referenzen darin). Auch die Wechselwirkungen von Profilinen mit anderen Proteinen wurden untersucht. Sie stellen sich heute viel komplexer dar als zunächst angenommen [21].

Valenta et al. identifizierten das erste pflanzliche Profilin, als sie in Birkenpollen nach den Proteinen suchten, die für Allergien gegen Pollen verantwortlich sind [185].

1.4.1 Wechselwirkungen zwischen Aktin und Profilin

Die Elongation bestehender Filamente läuft in der Gegenwart von Profilin als dreistufiger Prozeß ab: Profilin bindet G-Aktin, der Komplex aus Profilin und G-Aktin wird an das Plusende eines Filaments angelagert, das Filament ist um eine Aktinuntereinheit länger und Profilin wird freigesetzt [182]. Dieser Prozeß läuft unter physiologischen Bedingungen besser ab als die Polymerisation von Aktin allein [158].

Die Polymerisation von Aktin läuft unter Energieverbrauch ab. Die Energie kann durch die Hydrolyse von ATP zu ADP bereitgestellt werden. Aktinmonomere können an ADP oder ATP gebunden vorliegen; ATP-Aktin polymerisiert leichter als ADP-Aktin. Dabei wird ATP-Aktin an ein Filamentende angelagert und ATP wird hydrolysiert [182]. Profilin kann den Austausch von ADP zu ATP am Aktinmolekül fördern. Es ist das einzige bekannte Aktin-bindende Protein, das als Nukleotidaustauschfaktor wirken kann [158]. Die Förderung des Austauschs von ADP- zu ATP-Aktin ist auch eine Förderung der Aktinpolymerisation. Es gibt aber widersprüchliche Berichte darüber, ob Profilin den Austausch von ADP- zu ATP-Aktin tatsächlich fördert [83, 97, 115, 120, 182, 190]. Profilin kann aber Aktinpolymerisation auch ohne Förderung des Nukleotidaustauschs fördern [146].

Auch die Wirkung von Profilin auf Aktinfilamente wird kontrovers diskutiert.

Ein Teil der Daten zur physiologischen Wirkung von Profilin legt eine Hemmung der Aktinpolymerisation nahe. Die Initiation neuer Filamente stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Aktinpolymerisation dar. Sie wird durch Profilin gehemmt [190].

Mikroinjektion von Profilin in Staubblatthaarzellen von *Tradescantia blossfeldiana* führt zu einer schnellen Zerstörung einzelner Aktinfilamente [48]. In Mutanten von *Dictyostelium discoideum*, die kein Profilin exprimieren, ist ein Anstieg des Gehaltes an F-Aktin um 70 % zu beobachten. Damit einher gehen eine Einschränkung der Motilität, vergrößerte Zellen und eine Behinderung der Zytokinese [158]. Auch *in vitro*-Experimente zeigen, daß Profilin Aktin sequestriert. Wird Profilin zu ADP-Aktin gegeben, dann wirkt es als sequestrierendes Protein [182].

Die eigentliche Bedeutung von Profilin wird erst klar, wenn auch Thymosin betrachtet wird [182]. Thymosin $\beta 4$ ist ein kleines Aktin-bindendes Protein. Thymosin verhindert, ähnlich wie Profilin, die Polymerisation von Aktin durch seine Bindung an G-Aktin [83]. Wird eine geringe Menge Profilin zu einer Mischung aus Aktin und Thymosin $\beta 4$ gegeben, nimmt die Menge an F-Aktin zu, hier wirkt Profilin also polymerisationsfördernd. Sind aber die Enden der Aktinfilamente durch andere Aktin-bindende Proteine besetzt und darum einer Filamentelongation nicht zugänglich, wirkt Profilin wiederum sequestrierend [182]. Thymosin $\beta 4$ behindert den Nukleotidaustausch am Aktinmonomer fast vollständig [182].

In höheren Eukaryoten wird die Aktinsequestrierung wahrscheinlich nicht von Profilin, sondern ganz oder teilweise von Thymosin übernommen. Die Funktion von Profilin ist dann eher die Modulation der Aktindynamik. So wird Profilin weniger entlang stabiler Aktinfilamente, sondern in zellulären Regionen mit starkem Filamentwachstum, z.B. in Lamellipodien, gefunden [20].

Die Aktinfilamente einer Zelle können unterschiedlich auf Profilin reagieren, möglicherweise in Abhängigkeit von ihrer subzellulären Lokalisation und anderen Faktoren. Wird Profilin in Fibroblasten von Ratten injiziert, wird nur ein Teil der Aktinfilamente zerstört, während andere intakt bleiben [158]. In CHO(Chinese Hamster Ovary)-Zellen führt eine Überexpression von Profilin zu einer Stabilisierung des polymerisierten Aktins. In BHK(Baby Hamster Kidney)-Zellen stabi-

lisiert die Überexpression von Profilin Aktinfilamente gegenüber der Zerstörung durch Latrunkulin oder Cytochalasin D [158].

Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*, die kein Profilin exprimieren, können zwar auch ohne Profilin in meßbaren Mengen überleben, haben aber starke Defizite bei Wachstum und Knospung [57]. Sie haben keinerlei detektierbare Aktinfilamente, und ihre Zytokinese ist gestört. In *S. pombe* führt die Überexpression ebenso wie eine verringerte Expression von Profilin zu Defekten in der Zytokinese [158].

Die hier zitierten Daten scheinen widersprüchlich. Sie zeigen, daß sich die Wirkung von Profilin nicht nur zwischen den untersuchten Organismen unterscheidet, sondern auch von den Gegebenheiten in der Zelle, insbesondere von der Menge des vorhandenen Aktins, abhängt. Die Überexpression von Aktin in *S. cerevisiae* hat gravierende Folgen. Diese können aber durch die Überexpression von Profilin ausgeglichen werden [158].

1.4.2 Molekülaufbau, Bindungsstellen und Bindungspartner

Obwohl sich Profileine in ihrer Aminosäuresequenz sehr unterscheiden können, ähneln sich die Tertiärstrukturen von Profilinen auch aus sehr entfernt verwandten Organismen [158]. Abb. 1.1 zeigt den schematisierten Aufbau des Profilinmoleküls. Es ist ein globuläres Molekül, das aus insgesamt sieben β -Faltblättern besteht, die den Hauptteil des Proteins ausmachen. Die N- und C-terminalen Enden des Proteins werden jeweils durch eine α -Helix gebildet, diese Helices stehen in Nachbarschaft und häufig parallel zueinander. Der Winkel zwischen diesen beiden Helices ist aber variabel, je nach Klasse des Profilins können sie sogar fast senkrecht zueinander stehen [158].

Alle aus Eukaryoten bekannten Profileine haben Bindungsstellen für drei verschiedene Liganden (siehe Abb. 1.1): Profileine können mit G-Aktin Komplexe bilden, können an PIP_2 binden und haben außerdem eine Bindungsstelle für Poly-L-Prolin (PLP) als Peptidsequenz, das heißt Abschnitte in Proteinen, die ausschließlich oder fast ausschließlich aus der Aminosäure Prolin bestehen [158]. Zur Bindung an PLP tragen die N- und C-terminalen α -Helices bei. Profileine aus Birke zeigen unterschiedliche Affinitäten für PLP, diese Profileine unterscheiden sich auch in der Stellung dieser Helices zueinander [176].

In Abb. 1.1 ist die Bindungsstelle für Aktin blau unterlegt. Sie befindet sich an der der Bindungsstelle für PLP gegenüberliegenden Seite des Profilin-Moleküls. Zur Aktinbindung tragen mehrere, in der Primärstruktur von Profilin nicht benachbarte Aminosäuren bei. Die Bindungsstelle für Aktin überlappt mit der Bindungsstelle für PIP_2 . Schon aus dieser räumlichen Anordnung wird klar, daß sich die Bindung von Profilin an Aktin und an PIP_2 gegenseitig ausschließen. Profilin kann also entweder an PIP_2 oder an Aktin, nicht aber gleichzeitig an beide

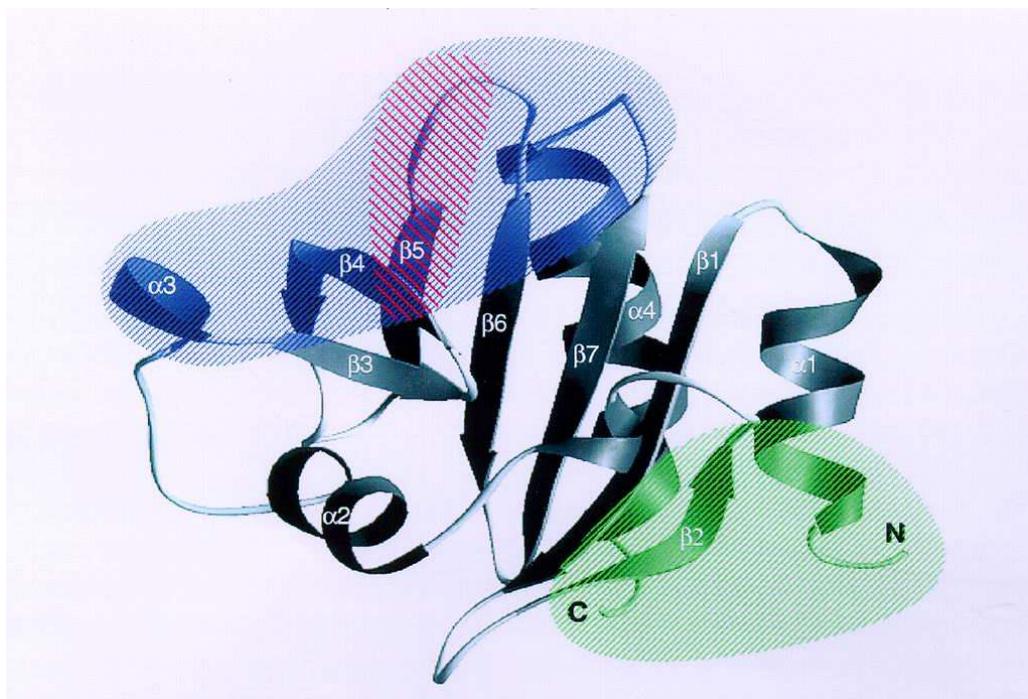


Abb. 1.1: Schematische Darstellung eines Profilin-Moleküls. Markiert sind die Bindungsstellen für Aktin (blau), PIP_2 (rot) und PLP (grün). Entnommen aus [158]. Weitere Erläuterungen im Text.

gebunden sein. Hingegen beeinflusst die Bindung von PLP nicht die Bindung von Profilin an Aktin [158]. Die Lokalisation und Funktionsweise dieser Bindungsstellen wurde durch NMR (Magnetresonanzspektroskopie) und Röntgenstrukturanalysen und durch "Cross-Linking"- und Mutationsexperimente aufgeklärt und bestätigt ([158] und Referenzen darin).

Die Bindung von Profilin an PLP in Molekülen ist vor allem in tierischen Organismen gezeigt, wo es mehrere Proteine mit einer PLP-Domäne gibt. Eines davon ist VASP (Vasodilator-activated Phosphoprotein), der erste gefundene natürliche Ligand für die PLP-Bindungsstelle des Profilinmoleküls [152]. Es ist ein Phosphoprotein, das eine Prolin-reiche Domäne in der Molekülmitte trägt, wo eine Folge von 15 Prolinen nur durch drei Glycine unterbrochen wird. VASP ist Substrat cGMP- und cAMP-abhängiger Proteinkinasen. Von diesen Proteinkinasen weiß man, daß sie essentiell für die Aktivierung der Blutplättchen, also Teil einer Signaltransduktionskette sind. Möglicherweise wird Profilin so selbst zum Bestandteil der Signaltransduktionskette [158]. Außerdem kolokalisiert VASP mit Aktinfilamenten [49]. In Säugern sind viele weitere Moleküle identifiziert worden, die ein Prolin-reiches Sequenzmotiv tragen. Dazu gehören VASP-ähnliche Proteine, aber auch Proteine anderer Klassen, z. B. Formin-ähnliche Proteine, die für

die Etablierung der Zellpolarität und die Zytokinese in *Drosophila* und anderen Organismen mit verantwortlich sind. Auch CAP (Cyclase-assoziiertes Protein) enthält eine PLP-Domäne [135]. Daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen Profilin und CAP besteht, zeigen Mutationsexperimente in Hefe, in denen die Überexpression von Profilin die durch den Mangel an CAP verursachten Defekte ausgleichen kann [158].

Inzwischen wurden auch aus Pflanzen Proteine mit Prolin-reichen Abschnitten isoliert bzw. deren Sequenz identifiziert, nämlich aus der Familie der Proteine, die Formin-Homologie-Domänen (FH) enthalten [115]. Mindestens eines davon interagiert tatsächlich mit Profilin im Hefe-Zwei-Hybrid-System.

Die Interaktion von Profilin mit Aktin ist auf die Gegenwart bestimmter Ionen angewiesen und wird durch sie beeinflusst. Profilin erhöht nur in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen die Rate des Aktin-Umbaus. Die Aktin-sequestrierende Funktion von Profilin ist in Gegenwart von Ca^{2+} stärker ausgeprägt. Da Profilin selbst keine Bindungsstellen für Kationen hat, kann sich die Gegenwart der Kationen nur über eine Konformationsänderung des Aktins, an das sie binden, auswirken [5].

Die Bindung von Aktin an Profilin beeinflusst nicht nur die Interaktion von letzterem mit PIP_2 [5].

Außer den oben aufgezählten Liganden können noch weitere Moleküle mit Profilin interagieren. Dazu gehört ein Komplex, der aus zwei Aktin-ähnlichen Proteinen (actin related proteins Arp2 und Arp3) und weiteren fünf Proteinen besteht (siehe Abschnitt 1.3.4). Er wurde von Machesky et al. identifiziert [107]. Der heptamere Komplex besteht aus Proteinen, die bis dahin unbekannt waren, sie wurden darum nach ihrer Größe genannt: 35 kDa-, 40 kDa-, 44 kDa- und 47 kDa-Proteine treten in gleichen Verhältnissen auf. In abweichenden Mengenverhältnissen treten die 13 kDa-, 18 kDa- und 19 kDa-Proteine auf. Das 40 kDa-Protein ist einem Motiv (WD40-Motiv) der β -Untereinheit der heterotrimeren GTPase aus *Dictyostelium discoideum* ähnlich. Das 47 kDa-Protein ist den (unkonventionellen) Aktinen aus *S. cerevisiae* und *S. pombe* sehr ähnlich [107]. Vermutlich vermitteln die Aktin-ähnlichen Proteine, oder eines davon, die Interaktion des Arp2/3-Komplex mit Profilin [158].

Eine ganz andere Art der Interaktion von Profilin beschreiben Mittermann et al. [121], nämlich die Oligomerisierung von Profilin. Dabei können auch evolutionär sehr verschiedene Profile aus Birke, dem Menschen und Hefezellen Dimere und auch untereinander Heterooligomere bilden. Unter den reduzierenden Bedingungen der Zelle kommt diese Multimerbildung wahrscheinlich nicht vor, relevant könnte sie aber außerhalb von Zellen sein. Profile können an der Außenseite von Pollen nachgewiesen werden. Wenn Allergiker mit Pollen oder anderen Profilinhaltigen Quellen in Berührung kommen, können Profile freigesetzt und so der Oxidation ausgesetzt werden (z.B. auf Schleimhäuten der Atemwege), was zur Bildung von Multimeren führen kann und möglicherweise die bekannten Allergiesymptome auslöst [121].

1.4.3 Profilin als Teil von Signaltransduktionswegen

Unter der großen und weiter wachsenden Anzahl von Profilin-Liganden sind viele, die Teile einer Signaltransduktionskette sind. IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) und DAG (Diazylglyzerol), die bei der Hydrolyse von PIP_2 entstehen, sind Botenmoleküle. Die Freisetzung von IP_3 von der Membran führt zur Freisetzung von Kalziumionen aus intrazellulären Speichern und somit zu einem Anstieg der zellulären Kalziumkonzentration [36]. Die Bindung von Profilin schützt PIP_2 vor der Hydrolyse durch die Phospholipase $C\gamma$. Ist dieses Enzym phosphoryliert, kann es auch Profilin gebundenes PIP_2 hydrolysieren und die Freisetzung von IP_3 und DAG bewirken. Auch Profilin wird dabei freigesetzt [158].

Die Aktin-sequestrierende Wirkung von Profilin wird durch Kalzium moduliert (Abschnitt 1.4.2). In wachsenden Pollenschläuchen findet man einen starken Kalziumgradienten mit hoher Kalziumkonzentration an der Spitze. Die Aufrechterhaltung des Kalziumgradienten ist unabdingbar für das Pollenschlauchwachstum, mehr noch, die Kalziumkonzentration variiert mit der Zeit, der Gradient oszilliert. Das Vorkommen von Profilin in Pollenschläuchen wurde nachgewiesen, Profileine sind besonders an der Spitze des Pollenschlauches lokalisiert [42]. Welche Rolle sie dort spielen und ob und wie sie am Wechselspiel von Kalziumkonzentration und Elongation der Aktinfilamente beteiligt sind, konnte noch nicht geklärt werden. Es ist vorstellbar, daß Profilin, in Abhängigkeit von der Kalziumkonzentration, Aktinmonomere sequestriert und, bei geringer werdender Kalziumkonzentration, Aktinmonomere an die Plusenden bestehender Filamente anlagert [115].

Proteine, die mit der PLP-Bindungsstelle von Profilin interagieren, wurden schon erwähnt (Abschnitt 1.4.2). Die Proteine VASP und CAP enthalten PLP-Bindungsdomänen und sind Teil von Signaltransduktionswegen oder interagierend zumindest mit Proteinen, die ihrerseits zu Signalketten gehören. Sie verbinden Profilin mit der Signaltransduktionskette, wodurch Profilin möglicherweise selbst Teil einer Signaltransduktionskette wird. Außerdem kann Profilin durch VASP und CAP zu bestimmten subzellulären Regionen dirigiert werden [158]. Viele der vorhergesagten Proteine der FH-Familie enthalten ein Signalpeptid und/oder ein transmembranales Motiv, was die Vermutung nahelegt, daß sie für die Aktinregulation an der oder über die Membran zuständig oder zumindest an ihr beteiligt sind [115].

Profilin kann, zumindest in Hefe, mit dem Ras-Signalweg interagieren, denn die Überexpression von Profilin führte zu normaler Morphologie in Zellen, die in einem Ras-Effektor gestört waren [182].

Profilin interagiert mit Phospholipiden, nicht nur mit PIP_2 , sondern auch mit den sehr ähnlichen Molekülen Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat [158]. Es gibt einen Bericht über ein pflanzliches Profilin, das phosphoryliert wird [52]. Profilin kann außerdem mit einer Untereinheit der Phosphoinositid-3-Kinase interagieren und so möglicherweise die Aktivität dieses Enzyms beeinflussen [158, 167]. Auch beeinflusst Profilin

den Phosphorylierungsstatus von Proteinen in Pollenextrakten [26].

Profilin scheint Teil von Signaltransduktionswegen zu sein, ohne daß man seine Funktion in diesen genau kennt.

1.4.4 Vorkommen, Expression und Lokalisation

Profiline kommen in allen daraufhin untersuchten Eukaryoten, in Tieren, Pflanzen und in Hefen vor ([158] und Referenzen darin). Sogar in dem Virus *Vaccinia* wurde ein Profilin nachgewiesen [15]. Dieses Profilin unterscheidet sich aber von anderen bekannten Profilinen, da es nicht mit PLP interagieren kann [158].

Im Vergleich zu tierischen Organismen verfügen Pflanzen über eine größere Anzahl von Profilinen, z.B. gibt es mindestens fünf Profiline in *Arabidopsis thaliana* [118]. Tierische Profiline können bezüglich ihrer Sequenz und ihrer biochemischen Eigenschaften in zwei Klassen unterteilt werden [158]. Auch pflanzliche Profiline können in zwei Klassen eingeteilt werden, deren auffälligstes Unterscheidungsmerkmal ihre Expression ist. Sie können in somatisch und blütenspezifisch exprimierte Profiline unterschieden werden. Die Profiline dieser Klassen unterscheiden sich auch in ihren biochemischen Eigenschaften [115].

Die intrazelluläre Lokalisation von Profilin ist schwierig zu bestimmen [158]. In *Acanthamoeba*, *Schizosaccharomyces* und beweglichen Säugerzellen wird Profilin vornehmlich in subzellulären Regionen mit hoher Dynamik und starkem Wachstum von Aktinfilamenten gefunden, im Zellkortex von Säugerzellen, in Lamellipodien, Filopodien und "membran ruffings" an der "leading edge" [20, 158]. In menschlichen Blutplättchen und Leukozyten wurde Profilin entlang der Plasmamembran in Gegenden, die anscheinend keine Aktinfilamente enthielten, gefunden. Man nimmt an, daß sie in diesen Fällen über PIP₂ mit der Plasmamembran verbunden sind [158]. In wachsenden Wurzelhaaren wird Profilin an der Zellspitze, am Wachstumspol, gefunden. Dort lokalisiert auch seine mRNA [6].

Die Bedeutung von Profilin wird durch Mutationsexperimente belegt. Mäuse, die eines der Profiline nicht exprimieren können, sterben schon sehr zeitig in der Embryonalentwicklung, im Zweizellstadium, ab [197]. Auch in *Drosophila* führt die Ausschaltung eines Profilines zum Absterben im Embryonalstadium [189].

1.5 Regulation von Wachstumsprozessen

Das Wachstum einer Pflanze wird durch zelluläre Wachstumsprozesse bestimmt. Die starre Zellwand gibt der Zelle Gestalt und bestimmt so auch die Gestalt des gesamten Organismus [131].

1.5.1 Polares Wachstum und seine Abhängigkeit vom Aktinskelett

Wachstum in Pflanzen bestimmt mit der Größe und der Form der Zelle gleichzeitig die Form des Organismus [131]. Beim Wachstum einer Zelle wirken zwei Prozesse zusammen, der eine ist die Ausdehnung der Zelle, der andere ist die Synthese des Zellwandmaterials und seine Ablagerung [6]. Die Ausdehnung der Zelle wird, bei Lockerung der bestehenden Zellwand, durch den Turgor vorangetrieben [6, 111]. Neuere Überlegungen gehen davon aus, daß das Zellwachstum, und besonders das Spitzenwachstum, eine spezialisierte Form der Bewegung darstellen könnte [7]: in tierischen Organismen wird die Fortbewegung einer Zelle durch die Polymerisation von Aktin angetrieben. Die Aktinfilamente treiben durch ihre Polymerisation die Membran vor sich her, so entsteht Bewegung [120, 195]. Eine sehr feine Steuerung dieses Prozesses ermöglicht eine gerichtete Bewegung.

Wie sieht das nun in Pflanzen aus? Zellen, die sich durch Spitzenwachstum ausdehnen, zeigen eine besondere Aktinverteilung. Zum Beispiel ist an der Spitze wachsender Wurzelhaare eine sogenannte Aktinkappe zu finden, die durch feine Aktinfilamente gebildet wird. Rückwärtig schließt sich eine anscheinend aktinfreie Zone an, bis zu der sich die longitudinalen Aktinfilamente, die das gesamte restliche Wurzelhaar in seiner Länge durchziehen, ausdehnen [190]. Ähnlich wie in wachsenden Wurzelhaaren ist in wachsenden Pollenschläuchen eine starke Zytoplasmaströmung zu beobachten. Sie erscheint als umgekehrte Fontäne. Sie verläuft entlang der Plasmamembran und in der sich anschließenden Zellregion zur Spitze des Pollenschlauches, zum Wachstumspol hin, während sie in der Zellmitte zurück, von der Spitze weg verläuft [190]. Die Gegenwart von Aktinbindenden Proteinen (Profilin, Myosin, ADF) in wachsenden Pollenschläuchen wurde nachgewiesen [42]. Da myosintriebene Zytoplasmaströmung entlang der Aktinfilamente von der Polarität dieser abhängt, kann man schließen, daß auch die Polarität der longitudinalen Filamente (und damit die Aktinpolymerisation) einer genauen Regulation unterliegt [190].

Das Spitzenwachstum ist abhängig vom intrazellulären Transport. Insbesondere müssen sekretorische Vesikel, die das Zellwandmaterial bzw. seine Vorläufer enthalten, zur Zellspitze gebracht werden [111]. Dort verschmelzen die Vesikel mit der Plasmamembran und ihr Inhalt kann in die wachsende Zellwand eingebaut werden. Sekretion ist häufig mit einer hohen oder hohen lokalen Kalziumkonzentration verbunden [42].

Inhibitorstudien zeigen, daß Mikrotubuli für Prozesse des Spitzenwachstums von Pollenschläuchen nur eine untergeordnete Rolle spielen. Sie können depolymerisiert werden, ohne daß das Spitzenwachstum dadurch nachhaltig gestört wird [82]. Grundlegend anders wirkt sich, ähnlich der Situation bei der Pathogenabwehr, die Depolymerisation von Aktinfilamenten aus, durch sie kommt das Spitzenwachstum sofort zum Erliegen, auch die intrazelluläre Verteilung von Komponenten und Molekülen verändert sich. Durch Aktindepolymerisation verschwindet

das an der Spitze wachsender Wurzelhaare lokalisierte Profilin von dort ebenso wie die Aktinkappe [18]. Interessanterweise wirken sich auch Inhibitorkonzentrationen hemmend auf das Spitzenwachstum aus, die noch nicht zu einer Depolymerisation der longitudinalen Aktinfilamente führen. Das Wachstum kommt schon bei Konzentrationen von Latrunculin B zum Erliegen, die die Zytoplasmaströmung noch nicht beeinflussen. Möglicherweise werden dadurch die feinen Aktinfilamente an der Zellspitze depolymerisiert [190]. Das zeigt, daß für das Wachstum nicht nur der intrazelluläre Transport, sondern wahrscheinlich auch die feinen Aktinfilamente an der Zellspitze wichtig sind. Ihre Depolymerisation hat entweder eine Signalwirkung, die das Einstellen des Wachstums bewirkt, oder hat mechanische Auswirkungen dahingehend, daß sie die Zellausdehnung nicht mehr direkt vorantreiben können.

1.5.2 Steuerung durch Signalmoleküle

Häufig wird das Aktinskelett einer Zelle auch als ihr Signalapparat angesehen [153, 193]. An der Regulation des Spitzenwachstums sind außerdem andere Signalmoleküle beteiligt, die das Aktinskelett ebenso wie sich wahrscheinlich gegenseitig beeinflussen. Die molekulare Basis der Zellpolarität in Pflanzen ist aber noch wenig verstanden [82]. Mehrere Moleküle sind an ihrer Regulation und Aufrechterhaltung beteiligt.

Als wichtiges Molekül mit Signalfunktion wurde Kalzium schon erwähnt (Abschnitt 1.5.1). Wachsende Pollenschläuche zeichnen sich durch einen starken, zur Spitze gerichteten Kalziumgradienten aus, der für das Wachstum unabdingbar ist und auch nur so lange besteht, wie die Zelle tatsächlich wächst [42]. Er ist anscheinend nötig für die polare Sekretion von Zellwandmaterial. Wahrscheinlich beeinflußt er andere zelluläre Komponenten oder wird durch sie beeinflußt. So wurde gezeigt, daß die aktindepolymerisierende Wirkung von Profilin *in vitro* von der Kalziumkonzentration abhängt [97].

Die Gegenwart und Notwendigkeit anderer Signalmoleküle wurde in vielen Experimenten belegt [18, 95, 104]. Zu ihnen gehören die kleinen GTPasen. Kleine GTPasen der Rho-Familie sind als Regulatoren zellulärer Prozesse wie der Polarität, der Sekretion und der Aktindynamik aus tierischen Organismen und Hefezellen bekannt [59, 203].

Die Rho-Familie der GTPasen wird in die Unterfamilien Rac, Rho und Cdc42 unterteilt. Außerdem gehört dazu die Unterfamilie der Rops (Rho of plants), die eine pflanzenspezifische Unterfamilie darstellt. Sie umfaßt viele Mitglieder und ist der Unterfamilie der tierischen Racs am ähnlichsten, deswegen werden Rops auch häufig als Racs bezeichnet. Mitglieder der pflanzenspezifischen Rops zeichnen sich aber durch pflanzenspezifische Merkmale aus, die in anderen Rac-Proteinen nicht gefunden werden, weshalb eine Gruppierung der Rops in eine eigene Unterfamilie berechtigt erscheint [9]. Zwar ist die Unterfamilie der Rops auffallend umfangreich, dafür scheinen aber alle anderen Mitglieder der Rho-

Familie in Pflanzen zu fehlen, bisher wurden in Pflanzen noch keine Rhos und Cdc42s nachgewiesen, auch keine Racs, die nicht in die Unterfamilie der Rops gehörten [9, 46].

Welche Rolle spielen Rops nun bei der Regulation zellulärer Prozesse wie dem Spitzenwachstum? Eine Spitzenlokalisation der GTPase PsRop1 wurde zuerst von Lin et al. in wachsenden Pollenschläuchen von Erbse beschrieben [103]. Kost et al. zeigen die funktionelle Notwendigkeit der kleinen GTPasen für das korrekte Wachstum von Pollenschläuchen in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana*. Die Expression von aktivitätsveränderten Mutanten führt zu abnormem Pollenschlauchwachstum und vor allem zu einer veränderten Aktinverteilung in den Pollenschläuchen [95].

In Hefe sind die Mitglieder der verschiedenen Unterfamilien an der Regulation der Polarität beteiligt. Cdc42 ist für die Etablierung der Zellpolarität verantwortlich [203]. Die Zellpolarität wird durch polare Sekretion aufrechterhalten, diese wird von Rho1 gesteuert [82]. In Pflanzen scheinen die Mitglieder der hier erwähnten Unterfamilien zu fehlen [9]. Trotzdem sind GTPasen an Etablierung und Erhalt der Polarität beteiligt, wie die schon erwähnten Experimente von Kost et al. [95] zeigten. Andere Belege werden von Fu und Yang zitiert: AtRop2 ist sowohl an der Selektion der Stelle, an der ein Wurzelhaar aus dem Trichoblasten auswachsen soll, beteiligt, als auch an der Etablierung und am Erhalt seiner Polarität, wie Mutationsexperimente zeigten [46].

Wie können nun die GTPasen die Regulation des Aktinskeletts beeinflussen? Erklärungsansätze werden wiederum durch Parallelen zu tierischen Systemen ermöglicht. Hartwig et al. zeigen, daß das Phospholipid PIP₂ eine Komponente des Signalweges ist, mit dem Rac2 in menschlichen Blutplättchen äußere Stimuli in Änderungen des Aktinskeletts übersetzt. Die Aktivierung von Rac2 induziert dabei die Synthese von PIP₂ [63]. Kost et al. zeigen, daß auch in Pollenschläuchen die GTPase vom Rho-Typ (AtRac2) mit dem Enzym der PIP₂-Synthese, mit einer Phosphatidylinositolmonophosphatkinase, interagiert [95] und belegten damit die Existenz eines in Tieren wirksamen Signalwegs auch in Pflanzen.

Das hier beschriebene Wissen sollte helfen, die Abläufe bei der Verteidigung von Pflanzenzellen gegen Pathogene zu untersuchen und ihre Regulation zu verstehen.

1.6 Ziele der Arbeit

Die auffallenden Parallelen zwischen den Prozessen, die beim Spitzenwachstum stark polarisierter Zellen ablaufen und dem, was über die pflanzliche Pathogenabwehr bekannt ist, sollten die Untersuchungen zur Funktionsweise der Pathogenabwehr inspirieren.

Diese Arbeit besteht aus zwei Teilen.

Im ersten Teil sollten Expression und Funktion von Profilin untersucht und

charakterisiert werden. Mittels Southern Blot sollte die Größe der Profilingenfamilie in *Petroselinum crispum*, mittels Western Blot die Expression in verschiedenen Pflanzengeweben und mittels immunzytochemischer Färbung und Fusion an das grün fluoreszierende Protein GFP die intrazelluläre Lokalisation untersucht werden. Die Funktion von Profilin sollte untersucht werden, indem die Auswirkungen veränderten zellulären Profiltingehaltes auf die Zytoarchitektur studiert wurden.

Die im ersten Teil gewonnen Erkenntnisse sollten im zweiten Teil eingesetzt werden, in dem die der Pathogenabwehr zugrundeliegenden Mechanismen untersucht wurden. Hauptaugenmerk sollte dabei auf das Aktin-bindende Protein Profilin gelegt werden.

Besonderer Wert lag auf der zytologischen Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Pflanze und Pathogen in zwei Modellsystemen. Untersucht werden sollten strukturelle Komponenten der Pathogenabwehr wie Aktin als der relevante Teil des Zytoskeletts und Profilin als wichtiges Aktin-bindendes Protein. Desweiteren sollten mögliche Signalkomponenten, die an der Abwehrreaktion beteiligt sind, untersucht werden. Ziel war es, an der Pathogenabwehr beteiligte Signalkomponenten, Proteine und Nicht-Proteine, zu identifizieren. Es sollte die Lokalisation des Phospholipids PIP_2 und kleiner GTPasen vom Rop-Typ während der Infektion mittels Immunlokalisation untersucht werden. Darüber hinaus sollten die funktionale Notwendigkeit von Profilin und kleiner GTPasen von Rop-Typ für die Pathogenabwehr untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Organismen, Plasmide und Oligonukleotide

2.1.1 Verwendete Pflanzen, Pathogene und Bakterien

Pflanzen

Arabidopsis thaliana (L.) Heinh., Ökotyp Columbia

Petroselinum crispum (Mill.) Nyman ex A. W. Hill, Hamburger Schnitt

Petroselinum crispum (Mill.) Nyman ex A. W. Hill, Zellen in Suspensionkultur,
Linien Pc 5, Pc 5/3, Pc 5/5, Pc 5/6

Phytopathogene

Phytophthora infestans (Mont.) de Bary, Rasse 1 (Stamm Pi1)

Blumeria graminis (DC) Speer forma specialis hordei (Stamm K1)

Bakterien

Escherichia coli Stamm DH5 α : F⁻ *endA1 hsdR17* (r_K⁻m_K⁺) *supE*⁴⁴ *thi-1 recA1*
U169 ϕ 80d *lacZ* Δ M15 [60]

Escherichia coli Stamm GM2163: NewEngland BoiLabs, Schwalbach

Escherichia coli Stamm TOP10: Invitrogen, Karlsruhe

Escherichia coli Stamm DB3.1: Invitrogen, Karlsruhe

Escherichia coli Stamm XL1 Blue: Stratagene, La Jolla, CA, USA

2.1.2 Plasmide

pBlue2KS	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pBT10-GUS	Feldbrügge et al. [39]
pcatGFP	pcatGFP und Polylinkersequenz aus pBlue2KS (Stratagene, La Jolla, CA, USA) in pRT101, Birgit Görnhardt, unveröffentlicht
pDONR	Invitrogen, Karlsruhe
pQE-31	Qiagen, Hilden
pGJ1425	Guido Jach, unveröffentlicht
pGJ351	Guido Jach, unveröffentlicht
pJawohl3	Bekir Ülker, unveröffentlicht
pJawohl8	Bekir Ülker, unveröffentlicht
pRT101	Töpfer et al. [180]
pRT-GFP-Li	pcatGFP, Stop-Codon mutiert, Glycin-Linker, pBlue2KS-Polylinkersequenz in pRT101, Birgit Goernhardt, unveröffentlicht
pTALIN-GFP	mTALIN in pam-smRSGFP-I/LWEQ, Volker Lipka, unveröffentlicht, nach [96]
pYAVOLL1	Bekir Ülker, unveröffentlicht

2.1.3 Oligonukleotide

Alle hier aufgeführten Oligonukleotide waren Didesoxyolidonukleotide zur Verwendung als Primer bei PCR (siehe Abschnitt 2.8.6), die durch die Firmen Metabion (Metabion GmbH, Martinsried), GibcoBRL/Invitrogen (Karlsruhe) oder MWG (MWG-Biotech AG, Ebersberg) auf Bestellung synthetisiert wurden.

Oligonukleotid für die reverse Transkription

IS-SKT17 5'-TCT AGA ACT AGT GGA TCA AGC TTT TTT
TTT TTT TTT TT-3'

Oligonukleotide zur Identifikation von Mutanten

ISEn205 5'-AGA AGC ACG ACG GCT GTA GAA TAG GA-3'
ISEn8130 5'-GAG CGT CGG TCC CCA CAC TTC TAT AC-3'

Oligonukleotide zum Sequenzieren

ISIntron5	5'-CTT ACG TTA GCA GAG GAG GAG-3'
ISIntron3	5'-GGT TCT AGC TTC TCC AAC CAC-3'
IS-funi	5'-GTT TTC CCA GTC ACG AC-3'
IS-frev	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'
pYAVOLLpA363	5'-TAG ATT TGT AGA GAG AGA CTG GTG-3'
pYAVOLL35S5917	5'-CAC TAT CCT TCG GAA GAC CCT TCC-3'
IS8	5'-TCT CCA CTG ACG TAA GGG-3'
IS9	5'-TCC TGT TGA CGA GGG TGT-3'

Oligonukleotide zur Herstellung von DNA-Fragmenten zur Klonierung mittels LR-Rekombinase – Gateway-Klonierung

Die *attB*-Erkennungssequenzen zur Klonierung mittels Rekombinase (Invitrogen, Karlsruhe) sind fettgedruckt.

IS75PRF33hindGateway	5'- GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTA AGCTTA AGT TTC AGA GCC CCG ATT C-3'
IS70PRF45pstGateway	5'- GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT GCA GGG CAC TTA ACG TAT AGA TCA TAA AC-3'
IS71PRF43bamGateway	5'- GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTG GAT CCG GTG GTG GAA CAT TGT AAG AAG-3'
IS72PRF55hindGateway	5'- GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAA GCT TGC AGA GTA AAA GCA AAA AGA AGA AG-3'
IS73PRF53pstGateway	5'- GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTC TGC AGA AAG AGA TAT AAA ACA TTG TAG ATG GTT C-3'
IS68PRF15Gateway	5'- GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAG TCG ACG GAG AAA TCA GTA-3'
IS65PRF33Gateway	5'- GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTG CAA TAT GAA TTC AGT AGA AGC TTA AG-3'
IS64PRF35Gateway	5'- GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGC AGA TCG ATA GTA AAG AAG AAG-3'

IS66PRF25Gateway	5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCA GTC TCA TCT CTC TAG AGA AG-3'
IS67PRF23Gateway	5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTT GAA GCA CAT CGA TTG AAC TTA G-3'
IS69PRF13Gateway	5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA AGC TGG GTG AAG ATC TAG AAA TGA AAC CTT GG-3'

Weitere Oligonukleotide

ISubi10-5	5'-AAC TTT CTC TCA ATT CTC TCT ACC-3'
ISubi10-3	5'-CTT CTT AAG CAT AAC AGA GAC GAG-3'
Actin2-1	5'-TCC CTC AAT CTC ATC TTC TTC C-3'
Actin2-2	5'-GAC CTG CCT CAT CAT ACT CG-3'

Oligonukleotide zur Klonierung von Profilinen

IS57PRF23cla	5'-GAA ATT TGT TTG AAG CAC ATC GAT TGA ACT TAG-3'
IS58PRF15sal	5'-AGT CGA CGG AGA AAT CAG TAC TCG CCG AAG-3'
IS59PRF13xba	5'-GTT AAG AAG ATC TAG AAA TGA AAC CTT GGT TTT AG-3'
IS63PRF15spe	5'-CGG AGA AAC TAG TAC TCG CCG AAG-3'
IS54PRF35cla	5'-GAA GAA GCA GAT CGA TAG TAA AGA AGA AGA AG-3'
IS55PRF33eco	5'-GCA ATA TGA ATT CAG TAG AAG CTT AAG TTT CAG-3'
IS56PRF25xba	5'-GAA GAA ACA GTCTCA TCT CTC TAG AGA AG-3'
IS18Nxbhovorn	5'-ATC TCT CGA GAT GTC TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS20Nbambvorn	5'-ATC TGG ATC CAT GTC TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS29Necovorn	5'-ATC TGA ATT CAT GTC TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS27xhhohinten	5'-ATC TCT CGA GTT CAG ACT CGA TAA G-3'

IS28ecomitte	5'-ATC TGA ATT CTC GGT GGC GAA AAA TAC-3'
IS29ecovorn	5'-ATC TGA ATT CAT GTG TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS30bamhinten	5'-ATC TGG ATC CGA GTT CAG ACT CGA TAA G-3'
IS20bamvorn	5'-ATC TGG ATC CAT GTG TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS21ecohinten	5'-ATC TGA ATT CGA GTT CAG ACT CGA TAA G-3'
IS18xhovorn	5'-ATC TCT CGA GAT GTG TTG GCA ATC ATA CGT C-3'
IS19hindten	5'-ATC TAA GCT TGA GTT CAG ACT CGA TAA G-3'
IS5	5'-CGA ATT CAG AGA GGA TGT CGT GGC AAG CAT AT-3'
IS1	5'-CGG ATG GAT CCG GGA TGT CGT GGC AAG CAT ATG-3'
IS2	5'-TTA AGC TTG GAT CCA GAA GAA GCC-3'
IS3	5'-CGG ATC CCA TGG CGA TGT CGT GGC AAG CAT ATG-3'
IS4	5'-AAT TAA CCA TGG CTG CAG AAG AAG CCA AGA GG-3'

Oligonukleotide zur Klonierung und Mutation kleiner GTPasen

IS53Rac25xho	5'-GCT CGA AGA AGC TCG AGA AGA GGC AAT G-3'
IS52Rac23xma	5'-GCT TCT TCC CGG GCA TGA GTG CTA TTA C-3'
IS49Rac77xho	5'-GAG TTT TCT CGA GGG ACT AAG AGA ATG-3'
IS48Rac73xma	5'-GAG TCA CGA ATC CCG GGT TGT TGA AAC TTT TC-3'
IS44Rac7akt5	5'-GCG TGT TGG AAA GAC ATG TAT GC-3'
IS45Rac2akt5	5'-CGC TGT TGG AAA AAC CTG TTT GCT G-3'
IS46Rac2neg5	5'-CTG TTT GCT GAT TTC TTA TAC CAG-3'
IS47Rac7neg5	5'- GTA TGC TTA TCT GTT ACA CTA GCA ACA AG-3'
IS43Rac25	5'-GCT CGA AGA AGA AGC TTA AGA GGC AAT G-3'

IS42Rac23	5'-GCT TCT TGA ATT CCA TGA GTG CTA TTA C-3'
IS41Rac2akt3	5'-ACC AAC AGC GAC GTC ACC AAC-3'
IS40Rac2neg3	5'-CAG CAA ACA GTT TTT ACC AAC AGC-3'
IS39Rac75	5'-GAG TTT TAA GCT TGG ACT AAG AGA ATG-3'
IS38Rac73	5'-GAG TCA CGA ATG AAT TCT TGT TGA AAC TTT TC-3'
IS37Rac7neg3	5'-CAG ATA AGC ATA CAG TTC TTC CCA AC-3'

2.2 Chemikalien, Medien, Puffer

2.2.1 Verwendete Chemikalien

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, falls nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Darmstadt und Sigma, München bezogen und hatten den Reinheitsgrad p.A.

Verwendete Enzyme und Spezialchemikalien

Ampicilin	Sigma, München
BSA	Sigma, München
Cellulase Onozuka RS	Serva, Heidelberg und Sigma, München
DMSO	Sigma, München
ECL	Amersham, Braunschweig
IPTG	Biomol GmbH, Hamburg
Kanamycin	Sigma, München
Ligase	Invitrogen, Karlsruhe und NewEngland BioLabs, Schwalbach
Lysozym	Sigma, München
Mazerozym	Serva, Heidelberg
MBS	Sigma, München
PMSF Restriktionsenzyme	Roche, Mannheim und NewEngland BioLabs, Schwalbach
RNAsin (RNase-Inhibitor)	Promega, Mannheim
SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase)	USB, Cleveland, USA
SuperscriptII (Reverse Transkriptase)	GibcoBRL/Invitrogen GmbH, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	NewEngland BioLabs
Taq DNA Polymerase	Roche, Mannheim und Invitrogen GmbH, Karlsruhe
x-GAL	Biomol GmbH, Hamburg
x-Gluc	Biomol GmbH, Hamburg

2.2.2 Medien

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Zutaten auf 1 l fertigen Mediums, das mit destilliertem Wasser aufgefüllt wurde.

B5-Medium mit Saccharose B5 ohne Auxin (Sigma, München) für 1 l Medium, 10 ml 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (Stammlösung 10 % (w/v) in Wasser, zur Herstellung dieser Stammlösung 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure in kleinster Menge 70 % Ethanol lösen, mit Wasser auffüllen), 0,34 M Saccharose, pH 5,5 mit NaOH

Gemüsesaftagar 200 ml Gemüsesaft (Granini Gute Ernte) filtrieren, 3 g CaCO₃, 20 g Bactoagar, autoklavieren, beim Gießen in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) immer wieder aufrühren

LB-Medium für 800 ml Medium 8 g Bactotrypton, 4 g Hefeextrakt, 8 g NaCl in aqua dest. aufnehmen, pH 7,5 mit 5 N NaOH einstellen, autoklavieren,

LB + Antibiotikum LB-Medium wird nach dem Autoklavieren Antibiotikum zugesetzt, z.B. Ampicilin (100 mg/l in destilliertem Wasser, sterilfiltriert) oder Kanamycin (60 mg/l in destilliertem Wasser, sterilfiltriert)

2×LB : für 400 ml 8 g Bactotrypton, 4 g Hefeextrakt, 4 g NaCl auffüllen mit aqua dest., pH 7,0 mit NaOH, autoklavieren

LB-Agar zu 800 ml flüssigem LB-Medium 12 g Agar geben, autoklavieren

L+-Medium LB-Medium, Zusatz von MgSO₄ zur Endkonzentration 10 mM und Maltose

MS-Agar 10 g Saccharose, 0,5× MS-Salze, 0,5× Gamborg's Vitaminlösung, 6 g Agar-Agar, pH 5,7 mit KOH

NZCYM 10 g NZ-Amin (enzymatisches Caseinhydrolysat), 5 g NaCl, 5 g Bacto Yeast Extract (Becton-Dickison & Company, Sparks, MD, USA), 1 g Casaminoäure, 2 g MgSO₄×7H₂O, pH 7 mit 5 N NaOH

NZYM wie NZCYM, aber ohne Casaminoäure

Roggenagar 150 g Roggenkörner (Fa. Bösen) über Nacht in wenig deionisiertem Wasser keimen lassen, 25 s zerkleinern im Waring Blender auf Stufe "low", autoklavieren, Suspension durch ein grobes Nylonnetz pressen, 50 g Saccharose zugeben, auf 2,5 l mit aqua dest. auffüllen, 15 g/l Bacto-Agar zugeben, nochmal autoklavieren, in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gießen, kurz trocknen lassen

TB-Medium und -Agar 12 g Bactotrypton (Merck, Darmstadt) 24 g Hefeextrakt, 4 ml 100 %iges Glycin, 2,32 g KH_2PO_4 , 16,44 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ oder 12,54 g K_2HPO_4 in aqua dest. aufnehmen, nötigenfalls 15 g Agar zugeben

TB + Antibiotikum dem Medium wird nach dem Autoklavieren Antibiotikum zugesetzt, siehe LB + Antibiotikum

TB-Medium für Phagen 5 g NaCl, 10 g Bactotrypton, in aqua dest. aufnehmen, pH 7,4 mit NaOH, autoklavieren, danach zugeben: steriles MgSO_4 zur Endkonzentration von 10 mM, und sterile Maltose zur Endkonzentration von 0,2 %

2.2.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, beziehen sich die Zutaten auf 1 l fertigen Mediums, aufgefüllt mit destilliertem Wasser.

Coomassie-Entfärbelösung 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

Coomassie-Färbelösung für Gele 0,05 % Coomassie Brilliant Blue, 40 % Methanol, 10 % Essigsäure

Denaturierungslösung 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

Entfärbelösung – Stammlösung (im Anschluß an GUS-Färbung) 1 Teil Milchsäure, 2 Teile Glycerol, 1 Teil Wasser

Extraktionspuffer für Proteine 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,1 % SDS, autoklavieren, kurz vor Verwendung zu 10 ml Extraktionspuffer geben: 20 μl 200 mM PMSF (Permethylenulfosid – Vorsicht, stark giftig) in Aceton, 100 μl Triton-X 100

GUS-Lösung 500 ml Lösung: 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ pH 7,0, 10 mM Na-EDTA, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat II, 5 mM Kaliumhexacyanoferrat III, 1 mg/ml α -Gluc (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Glucuronsäure, Biomol GmbH, Hamburg), 0,1 % Triton X-100, 20 % (v/v) Methanol, Aliquots zu 12 ml bei -20°C lagern.

HEPES-Puffer 50 mM HEPES, 0,5 M Sucrose, 6 mg/ml PVPP (Polyvinylpyrrolidin), 5 mM Ascorbinsäure, 1 mM Dithiothreitol, pH 7,5

Hybridisierungspuffer 5 \times SSC, 0,1 % N-Lauroylsarcosine-Na-Salz, 0,02 % SDS, 1 % Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim)

Kalium-Puffer 5 mM KPO_4 , 0,33 M Sucrose, pH 7,8

Laufpuffer nach Laemmli 25 ml 1 M Tris/HCl pH 8,3, 10 ml 10 %iges SDS, 15 g Glycin

5×MSB für 400 ml Puffer 19,6 g MES, 7,46 g KCl, 0,82 g MgCl₂-Hexahydrat, 37,6 g EGTA, 0,74 g EDTA, pH 6,7 mit 10 N KOH, Puffer wird gelb beim Autolavieren

MTSB für 500 ml 7,5 g PIPES, 0,95 g EGTA, 0,66 g MgSO₄×7H₂O, 2,5 g KOH, pH 6,9-7,0 mit KOH

Na-Phosphat-Puffer (0,067 M) 0,924 g NaH₂PO₄, 5,95 g Na₂HPO₄, pH 8,5

Neutralisierungslösung 3 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl pH 7,0

PBS 1,8 mM NaH₂PO₄, 12 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7,4

PBS-T PBS mit 0,1 % Tween 20

PEG-Lösung 25 % PEG 6000 (Serva, Heidelberg), 100 mM Ca(NO₃)₂×4H₂O, 45 mM Mannit, pH 9,0 mit KOH, sterilfiltriert (0,45 μm Porengröße, Sartorius)

4×Probenpuffer nach Laemmli für 10 ml 4×Puffer 1,6 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8, 4 ml Glycerin 3,6 ml 20 % iges SDS, 20 mg Bromphenolblau, 800 μl β-Mercaptoethanol, Aliquots zu 1 ml bei -20 °C lagern

Probenpuffer für DNA-Gele 100 mM EDTA, 0,2 % Bromphenolblau, 50 % Glycerin,

Puffer B (zur Reinigung heterolog exprimierten Proteins) 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH₂PO₄, 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0

Puffer C wie Puffer B, aber pH 6,3

Puffer E wie Puffer B, aber pH 4,5

SM-Puffer 5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄-Heptahydrat, 0,01 % Gelatine, 50 mM Tris-HCl pH 7,5

20×SSC 3 M NaCl, 0,3 M NaCitrat, pH 7,0 mit HCl

TAE 40 mM Tris-Acetat, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA pH 7,8

TBS 40 g NaCl, 1 g KCl, 15 g Tris/HCl pH 7,4; auffüllen auf 500 ml

TBS-T TBS mit 0,1 % Tween 20

TE 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

TE+RNase 4 μ l RNase (Stammlösung 10 μ g/ μ l) auf 1 ml TE

TELT (50 mM Tris/HCl pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl) für 200 ml Puffer 10 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0, 25 ml 0,5 M EDTA, 21,2 g LiCl, nach Autoklavieren 0,04 % Triton X-100 (entspricht 80 μ l) zugeben

TNE-Puffer 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl

Transfer-Puffer (15,6 mM Tris, 120 mM Glycin, 0,025 % SDS, 20 % Methanol) 2,4 g Tris, 11,2 g Glycin, 2,5 ml 10 %iges SDS, 200 ml Methanol

Waschlösung (für Southern Blot) 0,5-5 \times SSC, 0,1-0,5 % SDS

X-Gal-Stammlösung 2 % 5-Bromo-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galactosid in Dimethylformamid

2.3 Kultivierung von Pflanzen und Mikroorganismen

2.3.1 Oberflächensterilisation von Samen

Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden sterilisiert, indem sie für 10 min in einer Mischung aus 70 % Ethanol und 1 % Triton-X 100 in Wasser geschüttelt wurden, danach wurden sie dreimal in 96 %igem Ethanol gespült und zum Trocknen auf steriles Filterpapier gelegt. In getrocknetem Zustand konnten sie auf Agar-Platten ausgelegt oder gestreut werden.

Samen von *Petroselinum crispum* wurden entweder genauso behandelt oder nur mehrmals mit reichlich sterilem aqua dest. gespült. Diese Behandlung war meist ausreichend, um Kulturen von Keimlingen von *Petroselinum crispum* ausreichend frei von Pilzen zu halten.

2.3.2 Pflanzen in Sterilkultur

Arabidopsis thaliana auf Agar

Arabidopsis thaliana wurde auf MS-Agar kultiviert [127]. Zur Selektion wurden dem Agar nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums auf unter 60 °C Antibiotika (Ampicilin 80 μ g/ml oder Kanamycin 25 μ g/ml) zugesetzt. Nach dem Auslegen der Samen wurden die Platten mit Parafilm verschlossen und für drei Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert (Vernalisation). Danach wurden die Samen in Inkubationskammern (Percival Scientific, Perry, Iowa, USA) unter Kurztagbedingungen (Bedingungen wie unter 2.3.4) inkubiert und so zu Keimung gebracht.

Petroselinum crispum auf Filterpapier

Oberflächensterilisierte Samen von *Petroselinum crispum* wurden auf feuchtes Filterpapier (3MM-Papier) in Schalen ausgelegt. Die Schalen wurden verschlossen und schräg stehend im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, so daß die Wurzeln der Keimlinge entlang der Oberfläche des Filterpapiers wuchsen.

2.3.3 Pikieren von Keimlingen und jungen Pflanzen

Bei Bedarf wurden Pflänzchen im Alter von ca. zwei Wochen pikiert, d.h. in Töpfe mit VM-Erde gepflanzt und weiter unter Kurztagbedingungen im Gewächshaus kultiviert.

2.3.4 Pflanzen in Kultivationskammern

Auch junge Pflanzen in VM-Erde wurden in Inkubationsschränken (Percival) unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit, 22 °C, 66 % RH) kultiviert.

2.3.5 Pflanzen im Gewächshaus

Arabidopsis thaliana in VM-Erde wurde im Gewächshaus unter Kurztagbedingungen (8 h Licht, 16 h Dunkelheit) kultiviert. Zur Induktion der Blütenbildung wurden die Pflanzen in Langtagbedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkelheit) überführt.

Petroselinum crispum wurde im Gewächshaus, nicht unter besonderen Bedingungen, kultiviert und normal gegossen und gedüngt.

2.3.6 Zellen in Suspensionskultur

Zellen von *Petroselinum crispum* in Suspensionskultur wurden von Lydia Bollenbach betreut. Sie wurden alle sieben Tage in frisches HA-Medium überimpft. Erlenmeyerkolben mit Zellkulturen wurden im Dunkeln bei 26 °C mit ca. 120 rpm geschwenkt. Zellen aus Suspensionskultur wurden jeweils fünf Tage nach dem letzten Überimpfen in neues Medium verwendet.

2.3.7 *Phytophthora infestans* in Kultur

Myzel von *Phytophthora infestans* Stamm Pi1 wurde auf Gemüsesaftagar kultiviert. Dazu wurde ein Stück Myzel aus einer bestehenden Kultur auf eine frische Platte mit Gemüsesaftagar transferiert, die Platte wurde gut verschlossen und im Dunkeln bei 18 °C kultiviert. Nach 14 Tagen war die Platte bis zum Rand mit Myzel bedeckt. Mit einem Teil von diesem Myzel wurde erneut eine Gemüsesaft- oder Roggenagar-Platte angeimpft. Pi1 auf Roggenagar-Platten wurde unter gleichen Bedingungen kultiviert und 10 Tage nach Überimpfen verwendet.

2.3.8 *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Stamm K1) in Kultur

Blumeria graminis f. sp. hordei ist ein obligat biotropher Ascomycet [199]. Er wurde auf suszeptiblen Gerstepflanzen bei 22 °C kultiviert. Konidiosporen konnten ca. 10 Tage nach der Inokulation der Pflanzen geerntet werden.

2.3.9 Bakterien in Flüssigkultur

Zur Kultur von Bakterien wurde LB-Medium, wenn benötigt, mit Anitbiotikum versetzt, in verschiedenen Mengen, mindestens aber 2 ml, verwandt. Bakterien einer einzelner Kolonie wurden angeimpft, indem mit einem sterilen Zahnstocher ein Teil der Kolonie aufgenommen und mit diesem zusammen in das Medium gegeben wurde. Größere Mengen Medium wurden mit 1 ml Bakterienkultur, meist einer eigens hergestellten Vorkultur, angeimpft. Die Kultur der Bakterien erfolgte bei 37 °C und ca. 200 rpm über Nacht.

2.3.10 Bakterien auf festem Medium

Zum Beimpfen einer Agarplatte wurde eine kleine Menge (z.B. 100 µl) Bakterienkultur auf dem Medium ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Es wurde festes LB-Medium, meist mit Zusatz von Antibiotikum, verwendet. Zur Selektion von Transformanden (Blau-Weiß-Selektion) wurden dem Agar außerdem IPTG (Biomol GmbH, Hamburg, 0,2 mM) und X-Gal (Biomol GmbH, Hamburg, 40 mg/l) zugegeben.

2.3.11 Anlegen von Stammkulturen

Zum Anlegen einer Stammkultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß 500 µl sterilen Glycerins vorgelegt. Dazu wurden 500 µl Bakteriensuspension (z.B. frische Über-Nacht-Kultur) gegeben und durch Schütteln gründlich gemischt. Diese Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

2.4 Infektionen

2.4.1 Infektion von Suspensionskulturzellen mit Sporen von *Phytophthora infestans*

Vorbereitung der Objektträger

Damit die Zysten von *Phytophthora infestans* an der Oberfläche von Objektträgern haften blieben, mußten diese mit Gelatine beschichtet werden. In Vorbereitung dessen wurden Objektträger 1 h in 0,1 M HCl gekocht, in einem Wasserbad langsam abgekühlt (über Nacht) und unter sterilen Bedingungen mit

sterilem Wasser zweimal gespült. 3 g Gelatine wurden in sterilem aqua dest. durch Erwärmen und unter Rühren gelöst, dazu wurden 0,01 % Chromalaun ($K(CrIII)SO_4$) gegeben. In diese Lösung wurden die Objektträger für 2-3 min getaucht. Danach wurden sie über Nacht in einer Sterilbank getrocknet.

Gewinnung der Pilzsporen

Pilzsporen von Pi1 wurden gewonnen, indem ca. 10 Roggenagarplatten, auf denen ca. 10 Tage altes Myzel des Pilzes *Phytophthora infestans* Stamm Pi1 wuchs, mit jeweils 10 ml sterilem, kaltem deionisiertem Wasser überschichtet und danach für 90 min bei 4 °C gelagert wurden, was der Induktion der Sporangienbildung und dem Entlassen der Sporen aus den Sporangien dienen sollte [30]. Sporen wurden geerntet, indem die Platten kurz geschwenkt und die Überstände durch ein Nylonnetz in sterile Falkon-Röhrchen abgegossen wurden. Durch 2 min käftiges Schütteln wurde das Enzystieren der Sporen induziert, was diese widerstandsfähiger und keimbereiter machte. Die Zystensuspension wurden für 8-10 min bei 4 °C bei 2000 rpm in einer Heraeus Kühlzentrifuge zentrifugiert. Das entstehende (schwer sichtbare) Pellet wurde in sterilem kaltem Leitungswasser (gewährleistet bessere Keimfähigkeit) aufgenommen und durch Pipettieren resuspendiert. Es wurden jeweils 500 μ l Zystensuspension auf mit Gelatine beschichtete Objektträger aufgetragen.

Zugabe und Infektion der Zellen

Während 90-minütiger Inkubation (im Dunkel) bei RT keimten die Sporen soweit aus, daß sie zugegebene Petersiliezellen oder -mikrokalli aus Suspensionskultur infizieren konnten. Außerdem diente diese Inkubation dem Anhaften der Zysten an den mit Gelatine beschichteten Oberflächen der Objektträger. Es wurden fünf Tage alte Zellkulturen durch ein Stahlnetz gegossen (Abtrennen der größeren Kalli) und durch Zentrifugieren (1-2 min, 1000 rpm) in einer Minifuge (Heraeus, Hanau) bei 18 °C aufkonzentriert. Der Überstand wurde bis auf ca. 5 ml abgegossen und aufbewahrt, das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und auf die Objektträger mit den gekeimten Zysten verteilt (ca. 500 μ l pro Objektträger). Während weiterer Inkubation im Dunkeln bei RT wurde ein Teil der Petersiliezellen bzw. Mikrokalli von Pilzhyphen infiziert und so ebenfalls immobilisiert. Nach 120 min wurden die Objektträger mit HA-Medium gespült und so die nicht infizierten Zellen und Mikrokalli entfernt.

2.4.2 Infektion von *Arabidopsis thaliana* mit Konidien von *Blumeria graminis*

Zur Kultur wurde *Blumeria graminis* f. sp. hordei auf suszeptiblen Gerstenpflanzen gehalten. Zur Infektion von *Arabidopsis thaliana* wurden Gerstenpflanzen, die

sechs bis zehn Tage nach ihrer Inokulation Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. hordei in hoher Dichte trugen, über dem zu infizierenden Pflanzenmaterial (Blätter oder ganze Pflanzen) geschüttelt, wodurch die Konidiosporen auf die zu infizierenden Pflanzen herabrieselten.

2.5 Transformationen

2.5.1 Vorbereiten und Transformationen von Bakterien

Vorbereiten von Bakterienzellen zur DNA-Aufnahme – Herstellung kompetenter Zellen

Es wurde eine Vorkultur *E. coli* in 50 ml LB angeimpft und über Nacht bei max. 37 °C und 200 rpm kultiviert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurden andern- tags 400 ml 2×LB angeimpft, dazu wurde eine Spatelspitze MgSO₄ gegeben. Die Bakterien wurden bei 37 °C und 200 rpm bis zu 0,4-0,5 OD₅₉₅ kultiviert. Die Hälfte der Kultur wurde in Falcon-Röhrchen zu 50 ml aliquotiert und in einer Minifuge (Heraeus, Hanau) bei 4000 rpm und 4 °C pelletiert. Der Überstände wurden verworfen, die Pellets mit weiteren 50 ml Kultur aufgefüllt und erneut wie oben zentrifugiert. Die so entstandenen Pellets wurden in je 45 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ aufgenommen, durch Schütteln resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Pellets wurden wieder in je 45 ml eiskaltem CaCl₂ resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert, in einer gut vorgekühlten Heraeus-Minifuge zentrifugiert und danach in je 4 ml eiskaltem 0,1 M CaCl₂ mit 50 % Glycerin aufgenommen, in ebenfalls vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Transformationen von Bakterien

E. coli der Stämme DH5α, DB3.1 und GM2163 wurden transformiert, indem zu 100 bis 200 µl kompetenter Zellen 1 bis 10 µl zu rekombinanter Plasmid-DNA gegeben wurde (chemische Transformation). Die Bakterien wurden 20 bis 60 min auf Eis, danach 30 sec bei 45 °C inkubiert, für 5 min auf Eis abgekühlt, dann mit 1 ml LB-Medium versetzt, eine Stunde bei 37 °C und 200 rpm kultiviert und danach auf LB-Agar-Platten mit oder ohne Antibiotikum ausplattiert. Wenn nötig, wurden Ampicilin (100 mg/l) oder Kanamycin (60 mg/l) oder IPTG (Biomol, 0,2 mM) und X-Gal (Biomol, 40 mg/l) zugegeben.

2.5.2 Biolistische Transformation von *Arabidopsis thaliana* – “Particle Bombardment”

Bevor Microcarrier (Goldpartikel, 1 µm Durchmesser, BioRad, München) mit DNA beschichtet werden konnten, mußten sie vorbereitet werden. Das geschah,

indem 30 mg Goldpartikel in 1 ml 70 %igem Ethanol 5 min geschüttelt und durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert wurden. Danach wurden sie dreimal in je 1 ml sterilem Wasser geschüttelt, sedimentiert und danach in 500 μ l sterilem 50 %igem Glycerin (in Wasser) aufgenommen (Endkonzentration der Goldpartikel 60 mg/ml). Die so vorbehandelten Goldpartikel konnten für zwei Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Um DNA auf Microcarrier zu bringen, wurden 50 μ l dieser Suspension unter heftigem Schütteln mit 5 μ l DNA (Konzentration 1 μ g/ μ l), 50 μ l 2,5 M CaCl₂ und 20 μ l 0,1 M Spermidin (freie Base, Sigma, München) versetzt, danach weitere 3 min geschüttelt, durch kurzes Zentrifugieren (20 sec Tischzentrifuge) sedimentiert, in 140 μ l Ethanol resuspendiert, erneut abzentrifugiert und in 52 μ l Ethanol aufgenommen.

Zur Transformation wurden abgetrennte Blätter von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Das zur Transformation vorgesehene Pflanzenmaterial wurde auf Petrischalen mit Wasseragar, dem 85 mM Benzimidazol (verzögert die Blattalterung) zugesetzt war, ausgelegt und in das Particle Delivery System (Biolistic PDS-1000/He, BioRad München) gestellt (zweite Schiene von unten). Die in Ethanol suspendierten Goldpartikel wurden auf sieben Macrocarrier verteilt, diese in den Macrocarrier-Holder gelegt und eingepaßt. Der Macrocarrier und der Verteilerkopf wurden nach Herstellerangaben in das Gerät eingebaut. Die Kammer wurde bis ca. 27 inch/Hg evakuiert. Es wurden Berstscheiben verwendet, die bei 900 ψ barsten.

2.5.3 Transiente Transformation von Protoplasten von *Petroselinum crispum*

Protoplasten wurden aus Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur fünf Tage nach Überimpfen in frisches HA-Medium gewonnen. Dazu wurden 175 mg Cellulase und 35 mg Macerozym in 17,5 ml 0,24 M CaCl₂ durch Rühren (ca. 15 min) gelöst und sterilfiltriert (0,45 μ m Porengröße, Sartorius). Jeweils 3 ml dieser Enzymlösung und 6 ml 0,24 M CaCl₂ wurden in sterilen Petrischalen (Durchmesser 9 cm) vorgelegt.

20 ml Zellkultur wurden für 5 min bei 2000 rpm in einer Minifuge (Heraeus, Hanau) bei RT pelletiert und mit 0,24 M CaCl₂ auf 15 ml aufgefüllt. Die resuspendierten Zellen wurden in Aliquots zu 3 ml auf die vorbereiteten Petrischalen aufgeteilt, über Nacht bei 26 °C inkubiert und am nächsten Tag bei 40 rpm für 20 min sanft geschwenkt, um die Protoplasten von den Zellwandfragmenten zu lösen.

Durch Zentrifugation in einer Minifuge (Heraeus, Hanau) bei 1500 rpm für 5 min wurden die Protoplasten und Zellwandreste von der Enzymlösung separiert, das Pellet wurde in 20 ml 0,24 M CaCl₂ resuspendiert und erneut so zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 16 ml B5-Medium mit Saccharose auf-

genommen, geschwenkt, in Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt) überführt und in einer Heraeus-Minifuge bei 800 rpm für 5 min zentrifugiert. Die nun auf dem Medium flotierenden Protoplasten wurden mit einer Pipette mit weiter Öffnung abgenommen, die Protoplastenkonzentration durch Auszählen im Mikroskop bestimmt (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) und auf 5×10^6 bis 1×10^7 eingestellt.

Die Transformation erfolgte in Schraubdeckelröhrchen (Sarstedt) mit rundem Boden. Es wurden 40 μl DNA ($0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 350 μl PEG vorgelegt, 150 μl Protoplastensuspension zugegeben und durch leichtes Schütteln gemischt. Nach 20 min bei RT wurde die Transformation durch Zugabe von 5 ml $0,275 \text{ M Ca}(\text{NO}_3)_2$ pH 6,0 gestoppt, die Protoplasten wurden sofort für 7 min bei 800 rpm bei RT in einer Heraeus Minifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml B5-Medium mit Saccharose resuspendiert, auf zwei Petrischalen (Durchmesser 6 cm) aufgeteilt und bei $26 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. GFP-Expression begann bereits 4 h nach der Transformation sichtbar zu werden, noch weitere 24 h danach konnten Protoplasten mikroskopiert werden.

2.6 Isolation von Nukleinsäuren

2.6.1 Isolation genomischer DNA aus Pflanzen und Suspensionskulturzellen

Für die Isolierung genomischer DNA standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Entweder wurde der nucleon Phytopure Plant DNA Extraction Kit (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK) oder der Plant DNA Isolation Kit (Boehringer, Mannheim) verwendet und nach den Angaben des jeweiligen Herstellers vorgegangen, oder es wurde ein schnelles und unkompliziertes Verfahren angewendet, bei dem wenige Blättchen (ein bis zwei Blättchen entsprechend 20-40 mg) mit einem Pistill in einem 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß in 200 μl Puffer (200 mM Tris/HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS) ca. 15 s lang homogenisiert und von Hand etwas geschüttelt wurden [154]. Nach Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm, RT, Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg) wurden 150 μl des Überstandes in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, zur Fällung der Nukleinsäuren mit 150 μl Isopropanol versetzt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm, Eppendorf 5403) wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen und wieder zentrifugiert. Das Pellet, das die Nukleinsäuren enthielt, wurde getrocknet und in ca. 50 μl sterilem destilliertem Wasser aufgenommen.

2.6.2 Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Isolation von Plasmid-DNA – Minipräp nach TELT-Methode

Einzelkolonien wurden in 3 ml TB (meist mit Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert, 2 ml davon wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß abgegossen und in einer Eppendorf-Zentrifuge bei 13.000 rpm für 2 min abzentrifugiert. Zum Pellet wurden 200 μ l TELT und 20 μ l Lysozym (10 mg/ml, Sigma, München) gegeben, das Pellet darin resuspendiert und 15 min heftig geschüttelt. Nach 3 min Denaturierung bei 95 °C und 5 min Inkubation auf Eis wurde das Gemisch für 15 min bei 4 °C in einer Tischzentrifuge (Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg) bei 13.000 rpm zentrifugiert und das entstandene Pellet danach mit einem sterilen Holzzahnstocher entfernt.

Der Überstand wurde mit 100 μ l Isopropanol versetzt und 5-10 min auf Eis inkubiert. Diese Mischung wurde 30 min bei RT zentrifugiert (13.000 rpm, Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg), das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, bei RT getrocknet und in 45 μ l TE+RNase aufgenommen. Davon wurden 2 μ l zur enzymatischen Spaltung mit Restriktionsendonukleasen eingesetzt.

Isolation von Plasmid-DNA mit Plasmid-Mini-Kit

Plasmid-DNA konnte auch mit Hilfe des Plasmid-Mini-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers präpariert werden. Die von den Säulchen eluierte DNA konnte direkt weiterverwendet oder sequenziert werden.

Isolation von Plasmid-DNA – Midipräp

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien in größerem Maßstab wurde der Kit Nucleobond AX (Fa. Macherey & Nagel, Düren) verwendet.

2.6.3 Isolation von RNA aus Blättern

Zur Arbeit mit RNA wurde stets RNase-freies Wasser verwendet. Das wurde hergestellt, indem steriles destilliertes Wasser mit DEPC im Verhältnis 1:1000 versetzt wurde. Nach gründlichem Mischen und Inkubation über Nacht (Abzug!) wurde das Wasser nochmals autoklaviert (DEPC zersetzt sich dabei) [106].

Zur RNA-Isolation wurde der Kit Plant RNeasy Mini (Qiagen, Hilden) verwendet, wobei die Angaben des Herstellers befolgt wurden. Zusätzlich wurde während der Präparation der RNA ein DNA-Abbau durch DNase durchgeführt. Hierfür wurde die speziell zum Kit empfohlene DNase von Qiagen nach Herstellerangaben angewendet. Die isolierte RNA wurde in sterilem DEPC-Wasser aufgenommen.

2.7 Methoden der Analyse von Nukleinsäuren

2.7.1 Quantifizieren von DNA – Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, wobei 1 OD₂₆₀ 50 µg/ml DNA entspricht [155].

2.7.2 Quantifizieren von RNA

Hierzu wurde der Ribogreen-Kit (Molecular Probes Europe, Leiden, NL) verwendet. Die mitgelieferte RNA wurde verwendet, um einen Konzentrationsstandard herzustellen. Der Farbstoff und der mitgelieferte Puffer wurden nach Herstellerangaben mit der zu vermessenden RNA gemischt. Die Absorption bei 230, 260, 280 und 320 nm wurde im FluoroCount (Packard Bioscience Company, Downers Grove, Illinois, USA) bestimmt. Für jede RNA-Konzentration wurden drei Werte erfaßt (Dreifachmessung). Die zugehörige Konzentration konnte direkt in der RNA-Eichkurve abgelesen werden.

2.7.3 Elektrophoretische Trennung von DNA nach ihrer Größe

DNA wurde zu Analyse- und Präparationszwecken in horizontalen Agarose-Gelen elektrophoretisch getrennt. Je nach Größe des zu erwartenden DNA-Fragments wurde 0,8 % bis 2 % (w/v) SeaKem-Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und beim Erkalten in die Gelform gegossen. Die Trennung erfolgte bei 3-5 V/cm Gelbreite, wobei die Stromstärke 120 mA nicht übersteigen sollte. Zur Detektion von DNA-Fragmenten unter UV-Licht wurde der Agaroselösung 0,2 µg Ethidiumbromid pro ml zugesetzt. Den DNA-Proben wurde vor dem Auftragen 1/10 Volumen Probenpuffer zugesetzt, der Ethidiumbromid in gleicher Konzentration enthielt. Gele wurden nach dem Lauf auf einem Transilluminator unter UV-Licht (254 nm) betrachtet und fotografiert.

2.7.4 Präparation von DNA aus dem Agarosegel

Unter abgeschwächtem UV-Licht wurden DNA-Fragmente, die von nicht gewünschten DNA-Fragmenten elektrophoretisch getrennt worden waren (siehe Abschnitt 2.7.3), aus dem Agarosegel ausgeschnitten, d.h. das die gewünschte DNA enthaltende Gelstück wurde mit einem Skalpell vom restlichen Gel möglichst sorgfältig getrennt.

Das die DNA enthaltende Gelstückchen wurde entweder auf ein GenElute Spin Column MINUS EtBr (Sigma, München) plziert und der Puffer zusammen mit der DNA von der Agarose durch Zentrifugation (nach Angaben des Herstellers

der SpinColumn) getrennt. Alternativ wurde die DNA mit Hilfe des NucloeSpin-Kits (Macherey & Nagel, Düren) aus dem Gel eluiert, auch dabei wurde nach Herstellerangaben verfahren.

2.7.5 Transfer von DNA aus dem Gel auf eine Membran – “Southern Blot”

DNA wurde aus dem Gel mittels Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (Hybond-N, Amersham Buchler, Braunschweig) übertragen. Nach dem Lauf wurden Gele zuerst in Denaturierungslösung, dann in Neutralisierungslösung geschwenkt. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf ein mit zwei Pufferreservoirien, beide gefüllt mit $20\times\text{SSC}$, in Verbindung stehendes Filterpapier gelegt, die Nylonmembran wurde exakt auf Gelgröße zugeschnitten und luftblasenfrei aufgelegt, darüber wurden mehrere Lagen Zellstoffs geschichtet und beschwert, die Flüssigkeit aufnahmen und so den Transfer der DNA aus dem Gel auf die Membran bewirkten.

Die DNA wurde an die Membran kovalent gebunden, indem sie für 5 min auf einem Transilluminator mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt wurde.

2.7.6 Hybridisierung von DNA mit radioaktiv markierter Sonde

Die Membran mit der kovalent gebundenen DNA wurde 6 h lang bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rollinkubator GFL, Burgwedel) in Hybridisierungspuffer geschwenkt.

Bei der Hybridisierung diente PcPRF1 (ca. 400 bp) als Sonde. Diese wurde hergestellt, indem $45\text{ }\mu\text{l}$ einer aus einem DNA-Gel eluierten DNA mit DNA labeling beads (Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden) und $5\text{ }\mu\text{l}$ $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ ($3000\text{ }\mu\text{Ci}/\text{mmol}$, Amersham Buchler, Braunschweig) für 15 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert und danach bei $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ denaturiert wurden. Durch Zugabe der Sonde zum Hybridisierungspuffer wurde die Hybridisierung (bei $65\text{ }^{\circ}\text{C}$) gestartet.

Ca. 18 h nach Beginn der Hybridisierung wurden die Membranen bei $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ gewaschen (mind. zweimal 30 min). Die Konzentration von SDS und SSC in der Waschlösung bestimmten dabei die Stringenz der Waschung, d.h. den Grad der Homologie, die die Sonde mit der markierten DNA hat. Sie lag zwischen $3\times\text{SSC}$, 0,3 % SDS für geringe Stringenz, d.h. auch geringeren Homologiegrad und $0,3\times\text{SSC}$, 0,1 % SDS für hohe Stringenz und hohes Maß an Homologie. Die Membran wurde noch feucht auf eine Folie gelegt und zusammen mit einem Röntgenfilm (Kodak X-omat AR-5-Film, Kodak Eastman, Rochester, USA) in eine Filmkassette eingelegt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Je nach Bedarf lag der Film wenige Tage bis Wochen auf. Er wurde von Hand entwickelt.

2.7.7 “Screening” einer cDNA-Bank

Zur Gewinnung verschiedener Profilinsequenzen aus *Petroselinum crispum* wurde eine cDNA-Bibliothek durchmustert. Diese cDNA-Bibliothek wurde freundlicherweise von Dr. Imre E. Somssich zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um eine λ ZAP-Phagen-cDNA-Bank, gewonnen aus Petersiliezellen aus Suspensionskultur [94]. Es wurden zunächst Wirtsbakterien des Stammes XL1 Blue in 50 ml L+-Medium angeimpft und bei 37 °C und 240 rpm über Nacht kultiviert. Danach wurden sie aufkonzentriert, indem sie für 10 min bei 4000 rpm in einer Heraeus-Zentrifuge bei RT abzentrifugiert wurden, das entstehende Pellet wurde in (ca. 20 ml) sterilem 10 mM MgSO₄ aufgenommen und auf 2,0 OD₆₀₀ eingestellt. Diese Wirtsbakterien wurden infiziert, indem zu 100 μ l SM-Puffer 65 μ l XL1Blue in MgSO₄ und 1,4 oder 1,7 oder 2,0 μ l der Phagenbank gegeben wurden (Phagenbank vorher kräftig schütteln, dann 1 min abzentrifugieren, Phagen von oben entnehmen), Bakterien und Phagen wurden gut geschüttelt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Sie wurden zu ca. 4 ml TOP-Agar (vorgewärmt auf 45 °C) gegeben, beides wurde kurz gemischt und auf vorgewärmte (37 °C) NZYCM-Platten gegeben. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zum “Ziehen” der “Filter” wurden die Platten für 1 h bei 4 °C gekühlt. Auf jede Platte wurden nacheinander zwei Filter (Hybond-N, Amersham Buchler, Braunschweig) aufgelegt, markiert und nach 1,5 min schnell abgezogen und nacheinander für jeweils 5 min in Denaturierungslösung und Neutralisierungslösung, danach für 10 min in 2 \times SSC inkubiert, danach auf Filterpapier bei RT getrocknet und nach dem Trocknen für 2 h bei 80 °C “gebacken”.

Die Hybridisierung der Filter erfolgte ähnlich und mit der gleichen Sonde wie oben schon beschrieben (Abschnitt 2.7.6).

Anhand der entwickelten Röntgenfilme wurden Plaques ausgewählt, die Profilin-ähnliche Sequenzen zu enthalten schienen. Diese wurden mit sterilen Pasteurpipetten aus den Platten ausgestochen, das so erhaltene Agarblöckchen wurden in sterilem SM-Puffer, versetzt mit 3 Tropfen Chloroform (soll Wachstum der Bakterien verhindern), durch starkes Schütteln eluiert und bei 4 °C gelagert.

Da bei diesem Verfahren meist Phagen mehrerer Plaques gewonnen worden waren, schloß sich eine weitere Runde des “Screenens” an. Dazu wurden erneut Wirtsbakterien mit dem gewonnenen Phageneluat infiziert. Zum Feststellen der optimalen Phagenkonzentration wurden zunächst verschiedene Volumina des Überstands eingesetzt und die Dichte der entstehenden Phagenplaques verglichen. Ausplattieren, Gewinnung und Hybridisieren der Filter und Ausstechen und Elution der Plaques erfolgten wie oben beschrieben.

Die Gewinnung der DNA aus den Phagen erfolgte mit Hilfe des EXASSIST/SOLR-Systems (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers.

2.7.8 Sequenzanalyse

Sequenzen von DNA-Fragmenten wurden durch die Arbeitsgruppe Automatische DNA-Isolierung und Sequenzierung (ADIS) am MPI für Züchtungsforschung bestimmt. Die Ergebnisse wurden in elektronischer Form und auf Papier gedruckt übermittelt.

Vorbereitung der DNA zur Sequenzanalyse

Um Plasmid-DNA zum Sequenzieren vorzubereiten, mußte sie mit Na-Acetat und Ethanol gefällt werden. Dazu wurde ein Volumen DNA mit einem Volumen 4 M NH_4 -Acetat und drei Volumen reinem Ethanol versetzt, 15 min bei RT inkubiert und 30 min bei RT zentrifugiert (13.000 rpm, Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg), danach wie oben beschrieben gespült und getrocknet und in ca. 40 μl sterilem Wasser aufgenommen. Zum Sequenzieren wurde die DNA-Lösung auf eine Konzentration von 250 ng/ μl eingestellt.

2.7.9 Computergestützter Sequenzvergleich

Zum Vergleich von DNA-Sequenzen wurden Computerprogramme verwendet. Am häufigsten wurde auf das "Wisconsin Sequence Analysis Package" der Genetic Computer Group in Madison, Wisconsin zurückgegriffen (GCG, heute accelrys <http://www.accelrys.com>). Außerdem wurden die auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angebotenen Programme verwendet.

2.8 DNA-Modifikationen

2.8.1 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mittels Restriktionsendonukleasen

Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurde entweder zur Kontrolle der DNA-Sequenz (analytisch) oder zur Gewinnung spezifischer DNA-Fragmente (präparativ) eingesetzt. Bei der analytischen Spaltung wurden 2-3 μl DNA mit 1 μl jeden Restriktionsenzymen unter Verwendung des zugehörigen Puffers in 25 μl Reaktionsvolumen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Analyse auf einem Agarosegel (siehe Abschnitt 2.7.3). Dazu wurde das gesamte Reaktionsvolumen mit 2,5 μl Probenpuffer versetzt, auf ein Agarosegel aufgetragen und getrennt und unter schwachem UV-Licht betrachtet. Für die präparative DNA-Spaltung wurden alle Reagenzien in größeren Mengen eingesetzt. Nach Betrachten unter UV-Licht wurde die Bande gewünschter Größe ausgeschnitten und die DNA aus dem Gel eluiert mit Hilfe des NucleoSpin-Kits (Macherey & Nagel, Düren, siehe auch 2.7.4).

2.8.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um bei der Ligation von zwei DNA-Fragmenten die Religation des Plasmids zu verhindern und die Ligation von Plasmid und Fragment zu begünstigen, wurden die 5'-Enden der Plasmid-DNA mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. In dieser Arbeit wurde zur Dephosphorylierung Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) nach den Angaben des Herstellers (Fa. USB, Bad Homburg) verwendet.

2.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-Ligase

Zwei "glatte" Enden doppelsträngiger DNA können ebenso wie überhängende und zueinander komplementäre DNA-Enden durch das Enzym T4-DNA-Ligase miteinander ligiert werden. Dazu wurden dephosphorylierte Plasmid-DNA variabler Menge (zwischen 20 und 200 ng) und variable Mengen von zu ligierenden DNA-Fragmenten in einem Reaktionsvolumen von 10–20 μl bei 17 °C über Nacht oder für 1 h bei 37 °C ligiert.

2.8.4 Ligation mittels Rekombinase – Gateway-Klonierung

Zur Klonierung der Profilinsequenzen in das Plasmid pJawohl8 (Bekir Ülker, unveröffentlicht) wurde ein neues Verfahren der Klonierung verwendet. Dabei wurden die Schritte Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Ligation der DNA-Fragmente ersetzt durch das gleichzeitige Entfernen einer DNA-Sequenz aus dem Plasmid und Einsetzen einer anderen an gleicher Stelle mit Hilfe des Enzyms Rekombinase (Invitrogen, Karlsruhe). Das Verfahren ist dem von Wesley et al. beschriebenen ähnlich [196].

Dieses System basiert auf dem Rekombinationssystem des Lambda-Phagen. Das Enzym Rekombinase erkennt ein Paar von Erkennungssequenzen im Plasmid und ein anderes, wenn vorhanden, im DNA-Fragment. Es tauscht die zwischen den jeweiligen Paaren gelegenen DNA-Sequenzen gegeneinander aus. Die Anwendung dieses Systems setzt voraus, daß die zu klonierenden DNA-Fragmente die Erkennungssequenzen tragen. Sie wurden deshalb mittels PCR an die zu klonierenden Fragmente angehängt, indem spezifische Primer verwendet wurden, die die Erkennungssequenzen an ihrem 5'-Ende trugen (*attB*).

Profilin wurden unter Verwendung spezifischer Primer, die außerdem die *attB*-Sequenzen trugen, mittels PCR amplifiziert (siehe Abschnitt 2.1.3). Sie wurden mittels BP-Rekombination in den pDONR-Vektor übertragen, das Produkt wurde in DH5 α -Zellen transformiert (BP-Rekombinase, pDONR, DH5 α Invitrogen, Karlsruhe). Nach einer Extraktion aus diesen konnten die Profilinsequenzen mittels LR-Rekombination in den Vektor pJawohl8 übertragen werden. In diesem waren die *attL*₁- und *attL*₂-Erkennungssequenzen so angebracht, daß mit dieser einen Rekombinationsreaktion eine Sequenz entstand, deren Expression in

einer Pflanzenzelle zu dsRNAi führen konnte: Diese Sequenz trug hinter dem 35S-Promotor eine Profilinsequenz, dahinter ein Intron des WRKY44-Gens und dahinter dieselbe die Profilinsequenz in umgekehrter Orientierung. Rekombinationsreaktionen und Transformationen wurden nach Herstellerangaben ausgeführt.

2.8.5 Reverse Transkription

Aus RNA wurde durch reverse Transkription DNA hergestellt. Dazu wurden 2 μg RNA mit 2 μl des Primers SKT17 (10 pmol/ μl) versetzt und auf 11,5 μl aufgefüllt. Diese Mischung wurde für 10 min auf 70 °C erhitzt (zur Denaturierung) und dann auf 4 °C abgekühlt. Dann wurden 4 μl 5×Puffer, 2 μl DTT (beides Invitrogen, Rockville, MD, USA), 1 μl 10 mM dNTPs (Pharmacia Biotech, Stockholm, Schweden) und 0,5 μl RNasin (Promega, Mannheim) zugegeben. Nach Vorwärmen auf 42 °C für 2 min wurde 1 μl Superscript (Invitrogen) zugegeben. Die reverse Transkription erfolgte im Laufe der nächsten 53 min bei 42 °C. Danach wurde die Reaktion durch Erwärmen auf 70 °C (15 min) beendet und die Mischung auf 4 °C abgekühlt. Gelagert wurde die so entstandene cDNA bei –20 °C. Die Konzentration konnte nicht genau bestimmt werden, da die noch in der Mischung enthaltenen Proteine und Salze das Meßergebnis verfälschten. Außerdem empfahl es sich wegen zu hoher Verluste nicht, die cDNA zu reinigen.

2.8.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA oder cDNA wurde amplifiziert, indem die zu amplifizierende DNA (gewöhnlich 0,1 bis 5 μl Template je nach Konzentration) mit 1 μl jeden Primers (10 pmol/ μl , siehe Abschnitt 2.1.3), 1 μl 5 mMol dNTPs (Parma-cia, Stockholm, Schweden), 2,5 μl PCR-Puffer (Boehringer/Roche, Mannheim oder Gibco/Invitrogen), 0,75 μl MgCl (wenn nicht im Puffer enthalten, GibcoBRL/Invitrogen, Karlsruhe), 0,3 μl Taq-Polymerase (Boehringer/Roche oder GibcoBRL/Invitrogen) und Wasser bis zu einem Volumen von 25 μl versetzt wurde. Das Temperaturprogramm zur Amplifikation bestand aus einem anfänglichen Denaturierungsschritt 3 min 94 °C,

20 bis 35 Zyklen von

30 sec 94 °C (Denaturierung)

30 bis 45 sec 42 bis 65 °C (Primerpaarung)

30 bis 120 sec 72 °C (Synthese),

einem abschließenden Syntheseschritt 7 min 72 °C und einer Abkühlung auf 4 °C. PCR-Produkte wurden auf einem Agarose-Gel (0,8 % Agarose in TE-Puffer, Zusatz von 0,0025 % (v/v) Ethidiumbromid-Lösung) analysiert. Sie konnten für weitere Reaktionen eingesetzt oder bei –20 °C gelagert werden.

2.9 Proteinbiochemie

2.9.1 Proteinextraktion

Zur Extraktion von Proteinen wurden 1 g Pflanzenmaterial oder 2 g Petersilliezellen aus Suspensionskultur in flüssigem Stickstoff gründlich gemörsert, in 10 ml Extraktionspuffer aufgenommen und 30 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Aliquots zu 1200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –20 ° gelagert.

2.9.2 Präparation von Membranproteinen

Um Membran-assoziierte Proteine zu gewinnen, wurden 1 g Petersilliezellen aus Suspensionskultur oder 1 g Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* in flüssigem Stickstoff gefroren und bei 4 °C mit Sand in 3 ml HEPES-Puffer gründlich gemörsert. Das entstehende Gemisch wurde bei 4 °C und 7000 g 20 min zentrifugiert, um Sand und Zellwandreste abzutrennen, der Überstand wurde anschließend bei 4 °C und 32.000 g 30 min zentrifugiert. Das Pellet, das die Microsomen enthalten sollte, wurde in 1 ml Kaliumpuffer resuspendiert und bei –20 °C gelagert.

2.9.3 Elektrophoretische Trennung der Proteine

Proteine aus Proteinextrakten wurden mittels SDS-PAGE (SDS-Polyakrylamid-Gel-Elektrophorese) nach ihrer Größe getrennt [99]. Es wurden 10 %ige und 12 %ige Trenngele, jeweils mit einem 5 %igen Sammelgel überschichtet, verwendet. Die Zusammensetzung wurde von Sambroock et al. [155] ohne Modifikationen übernommen.

Proteinextrakte wurden mit 1/3 Volumen 4×Probenpuffer nach Laemmli versetzt, für 3 min auf 90 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Als Molekulargewichtsstandards wurden SeeBlue, Mark12 und Rainbow-Marker (alle drei NuPAGE, heute Invitrogen GmbH, Karlsruhe) verwendet. Zum Auftrennen der Proteine wurde eine Spannung zwischen 40 und 200 V angelegt.

Nach dem Lauf wurden die Proteine im Gel entweder mit Coomassie [130] gefärbt (schwenken in Färbelösung für mind. 1 h, schwenken in Entfärbelösung mindestens über Nacht) oder auf eine Membran übertragen.

2.9.4 Übertragung der Proteine aus dem Gel auf eine Membran – “Western Blot”

Proteine wurden im Naß-Blot-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran (BA85, Schleicher & Schüll) übertragen. Dazu wurden auf die Katode der Blotapparatur (Electro Eluter, BioRad, München) zwei Lagen in Transferpuffer getränkten

Filterpapiers (3MM, Whatman, Maidstone, UK), das Gel mit luftblasenfrei aufgelegter Membran und zwei weitere Lagen feuchten Filterpapiers gelegt. Filterpapier und Membran wurden vorher mit Transferpuffer getränkt. Die Übertragung der Proteine erfolgte entweder bei 80 V und ca. 350 mA für ungefähr 2 h bei 4 °C oder bei 30 V und ebenfalls 4 °C über Nacht.

2.9.5 Antikörpergewinnung und Antikörperreinigung

Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Zur Gewinnung von heterolog exprimiertem Protein wurde eine Expressionskultur von *E. coli* in 500 ml LB+Antibiotikum mit 20 ml einer Vorkultur angeimpft. Diese Vorkultur bestand aus 30 ml LB+Antibiotikum, die mit einer geringen Menge (Zahnstocherspitze) einer Stammkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert wurde. Ebenso wurde die Expressionskultur bei 37 °C und 200 rpm zunächst bis zu ca. 0,5 OD₅₉₅ kultiviert, ehe durch Zugabe von 1 ml 1 M IPTG die Expression des Proteins induziert wurde. Nach weiteren 4 h und Erreichen von ca. 2 OD₅₉₅ wurde die gesamte Kultur durch 15 min Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm in einer Minifuge (Heraeus, Hanau) in Schraubdeckelröhrchen (Falcon) pelletiert. Diese Pellets konnten bei -20 °C gelagert werden.

Während der Kultivierung konnten das Wachstum der Bakterien und die Expression des Proteins überwacht werden, indem stündlich 1 ml der Kultur abgenommen, mit 4×Probenpuffer nach Laemmli versetzt, mit SDS-PAGE getrennt und im Coomassie-gefärbten Gel betrachtet wurden.

Reinigung des Expressionsproteins

Die Aufreinigung des Expressionsproteins begann damit, daß zwei Pellets in je 5 ml Puffer B aufgelöst wurden, danach eine Stunde bei RT und über Nacht bei 4 °C inkubiert wurden. Da der Puffer große Mengen Harnstoff enthielt, der bei Kälte ausfällt, bei RT aber die Proteine stabilisiert, mußte die Suspension vor Weiterbehandlung auf RT erwärmt werden. Auch alle folgenden Schritte wurden bei RT durchgeführt. Erneute Zentrifugation (Minifuge, Heraeus, Hanau, 5000 rpm, 15 min, 4 °C) trennte die Bakterienreste von der Proteinsuspension.

Es wurden 600 µl Ni-Agarose (Pierce, Rockford, USA) umgepuffert, indem sie dreimal 1 min bei 1000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert und anschließend in 500 µl Puffer B aufgenommen wurden. Die so behandelte Ni-Agarose wurde zum Überstand der aufgelösten Bakterienkultur gegeben und 30 min bei RT geschwenkt, damit das exprimierte Protein an die Ni-Agarose binden konnte. Durch erneute Zentrifugation (Minifuge, Heraeus, Hanau, 5000 rpm, 15 min, 4 °C) wurde die Agarose zusammen mit dem gebundenen Protein pelletiert, in insgesamt 1200 µl Puffer C suspendiert, auf zwei Säulchen

(Pierce) verteilt und in einer Eppendorf 5403 (Eppendorf, Hamburg) 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Säulenmaterial (Ni-Agarose) wurde dreimal in Puffer C gespült, indem es in jeweils 600 μ l Puffer C weitestmöglich resuspendiert, 5 min inkubiert und danach bei RT in einer Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg mit 10.000 rpm abzentrifugiert wurde.

Die Elution des Proteins von der Säule erfolgte in vier Schritten und auf ähnliche Weise. Das Säulenmaterial wurde in 600 μ l Puffer E resuspendiert und danach zentrifugiert (10.000 rpm, RT, Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg). Diese beiden Schritte wurden weitere dreimal wiederholt.

Die so gewonnenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert. So wurde entschieden, welche Fraktion sich am besten zur Reinigung der Antikörper eignete.

Antikörpergewinnung

Zur Gewinnung von Antiseren wurde das Expressionsprotein als eine Bande aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill sehr fein vermahlen. Die Immunisierung zweier Kaninchen und Gewinnung der Antiseren übernahm die Firma Biogenes, Berlin.

Reinigung des Antiserums

Antiseren gegen Profilin konnten im "Western Blot" verwendet werden, für manche Anwendungen waren sie nicht spezifisch genug. Deshalb sollten die Antikörper gegen Profilin angereichert werden. Dabei kam das von Gu et al. beschriebene Verfahren mit geringer Modifikation zum Einsatz [51].

Heterolog exprimiertes Profilin wurde nach oben beschriebener Methode gereinigt. Das gereinigte Protein wurde an Nickel-Agarose (Pierce, Rockford, USA) gebunden. Dazu wurde zuerst der pH der Proteinlösung (Profilin in Puffer E) durch Zugabe von 1,5 M Tris/HCl pH 8,8 auf pH 8,0 eingestellt, um eine Bindung des Proteins an die Nickelagarose zu ermöglichen. 600 μ l Nickelagarose wurden ebenso umgepuffert durch mehrmaliges Abzentrifugieren und mischen mit mit Tris/HCl auf pH 8,0 eingestelltem Puffer E.

Die Bindung des Proteins aus der Elutionsfraktion an die Nickleagarose geschah durch Mischen der umgepufferten Nickelagarose mit der umgepufferten Elutionsfraktion (Protein aus 300 ml Expressionskultur, entsprach in dieser Arbeit einer Elutionsfraktion von 500 μ l) und Schwenken des Gemisches für 30 min bei RT. Das Gemisch wurde leicht zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. Profilin wurde so wieder an Ni-Agarose gebunden.

An das Profilin sollten diejenigen Antikörper aus dem Antiserum binden, die für Teile der Profilinsequenz spezifisch waren. Um die Bindung von Antikörper mit Antigen zu ermöglichen, mußte der Harnstoff (Harnstoff hat denaturierende Eigenschaften) entfernt werden. Deshalb wurde das Gemisch auf zwei Säul-

chen (Pierce, Rockford, USA) verteilt und leicht anzentrifugiert (dieser und die weiteren Zentrifugationsschritte: <1 min max. 10.000 rpm Eppendorf 5403, Eppendorf, Hamburg). Die Ni-Agarose wurde in je 600 μl "low-salt"-Waschpuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) aufgenommen, resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Diese Spülung wurde noch viermal wiederholt. Dann wurde das Antiserum (500 μl pro Säulchen) zugegeben, die Agarose darin suspendiert und das Gemisch 30 min bei RT geschwenkt, um Bindung von Antigen mit Antiserum zu ermöglichen. Danach wurden die nichtgebundenen Teile des Antiserums abzentrifugiert und die Ni-Agarose fünfmal mit "low-salt"-Waschpuffer gespült. Daran schlossen sich vier Waschschrte mit "high-salt"-Waschpuffer (2 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) an. Die Elution erfolgte in vier Schritten mit je 250 μl 4 M MgCl_2 .

Die Elutionsfraktionen wurden eine Stunde lang gegen destilliertes Wasser und über Nacht gegen PBS dialysiert. Nach der Dialyse wurden sie mit 1/10 Volumen 1 %iger BSA-Lösung versetzt, um die Antikörper in der Lösung zu stabilisieren (Proteinkonzentration sollte mindestens 1 mg/ml betragen), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.9.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

An eine Membran gebundene Proteine (siehe Abschnitt 2.9.4) konnten immunologisch durch Inkubation mit Antikörpern untersucht werden. Dazu mußte die Membran zunächst "geblockt" werden, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Das geschah durch Inkubation der Membran in TBS, der mit 2 % (w/v) Milchpulver (Neuform, Hamburg) versetzt war, für 30-60 min. Primäre Antikörper wurden in TBS mit Milchpulver in variablen Verhältnissen (1:10 bis 1:2000) verdünnt, in dieser Lösung wurden die Membranen meist bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ über Nacht geschwenkt, mindestens aber für eine Stunde bei RT. Danach wurden die Membranen dreimal für mindestens 10 min bei RT in TBS mit Milchpulver gespült. Um die Proteine sichtbar zu machen, schloß sich eine indirekte immunochemische Färbung mit einem sekundären Antikörper an, der mit alkalischer Phosphatase oder (Meerrettich-)Peroxidase gekoppelt war. Auch er wurde in TBS mit Milchpulver in variablen Verhältnissen verdünnt (1:100 bis 1:2000), Membranen wurden in dieser Lösung für ca. 2 h bei RT geschwenkt. Danach wurden sie in TBS-T dreimal für jeweils mindestens 10 min bei RT geschwenkt, es schlossen sich noch zwei Waschschrte (Schwenken der Membran in destilliertem Wasser für 10 min bei RT) an, bevor die Proteine detektiert wurden. Das geschah durch Zugabe der Substrate der sekundären Antikörper, entweder BCIP/NBT (Substrat der alkalischen Phosphatase, Sigma, München Deisenhoven), das nach Herstellerangaben in Wasser aufgelöst wurde, oder der Komponenten des ECL-Kits (Amersham Buchler, Braunschweig).

Die Membranen wurden so lange in BCIP/NBT-Lösung geschwenkt, bis violette Proteinbanden sichtbar wurden. Die Detektion wurde gestoppt, indem die

Membranen in destilliertes Wasser überführt und dort noch 15-30 min geschwenkt wurden.

Zur Detektion mit ECL-Kit wurden die Komponenten A und B des Kits im Verhältnis 1:1 gemischt, auf die Membran pipettiert, nach 1 min abtropfen lassen, die Membran wurde in Folie eingeschlagen. Röntgenfilme (Kodak X-omat AR-5-Film, Kodak Eastman, Rochester, USA) wurden aufgelegt und nach unterschiedlichen Zeiten entwickelt.

2.10 Indirekte immunzytochemische Färbung

2.10.1 Immunlokalisation in infizierten Suspensionskulturzellen

Die infizierten Zellen (siehe Abschnitt 2.4.1) wurden einer MBS-Behandlung unterzogen. Dafür wurden 4,8 ml des aufbewahrten Überstandes mit 1,2 ml 5×MSB und 12 μ l MBS-Stammlösung (100 mM in DMSO) gemischt. Je 1 ml davon wurde auf die Objektträger gegeben und wirkte für 20 min bei leichtem Vakuum (im Exsiccator mit Wasserstrahlpumpe) ein. Danach wurden die Objektträger dreimal mit jeweils 1 ml MSB gespült und danach mit je 750 ml eines Gemisches aus 3,75 ml aufbewahrten Überstands, 1 ml 5×MSB und 250 μ l DMSO, wieder für 20 min, bei leichtem Vakuum inkubiert.

Die Fixierung erfolgte in 4 %igem Formaldehyd. Dazu wurden 0,4 g Paraformaldehyd (Abzug!) mit 7,5 ml Wasser unter Rühren erwärmt und mit konzentrierter Natronlauge titriert, bis der weiße Niederschlag aufgelöst war. Die Lösung wurde durch ein Filterpapier gegeben, abgekühlt, mit 2 ml 5×MSB und 500 μ l DMSO versetzt und auf 10 ml aufgefüllt. Die mit DMSO behandelten Objektträger wurden dreimal mit MSB gespült und dann mit der Formaldehydlösung überschichtet. Die Inkubation erfolgte für 60 min in leichtem Vakuum, wobei der Exsiccator nur 20 min lang mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe evakuiert wurde. Nach Abschluß dieser Behandlung wurden die Objektträger wieder dreimal mit MSB gespült und über Nacht bei 4 °C aufbewahrt.

Um die Zellwände durchlässiger zu machen, schloß sich am nächsten Tag die Behandlung mit einer Enzymlösung an. Zur Herstellung dieser wurden 15 mg Cellulase (0,15 % (w/v) Endkonzentration), 5 mg Macerozym (0,05 % (w/v) Endkonzentration), 100 mg BSA (1 % (w/v) Endkonzentration), 364 mg Mannitol (Endkonzentration 0,2 M) und 2 ml 5×MSB mit sterilem destilliertem Wasser auf 10 ml aufgefüllt und so lange geschüttelt, bis sich alles gelöst hatte. Die Objektträger wurden mit MSB gespült und dann mit der Enzymlösung überschichtet, die 15 min einwirken sollte. Nach weiteren drei Spülungen mit MSB wurden die Objektträger in 5 % DMSO und 1 % Triton-X 100 in MSB für 20 min bei RT inkubiert. Nach weiteren drei Spülungen mit MSB wurden sie für 10 min mit eiskaltem Methanol überschichtet und danach sofort wieder dreimal mit MSB

gespült.

Primäre Antikörper oder Antiseren wurden in 1 % BSA in PBS in variablem Verhältnis (1:10 bis 1:200) verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37 °C. Die Objektträger wurden dreimal mit 1 % BSA in PBS gespült, danach wurde die Lösung gegen den zweiten, fluoreszenzmarkierten Antikörper (CY3 1:200; FITC 1:150), ebenfalls in 1 % BSA in PBS verdünnt, ausgetauscht, letzterer wirkte für 1 h bei 37 °C ein. Danach wurden die Objektträger mit MSB gewaschen. Sie konnten dann mikroskopisch betrachtet werden.

2.10.2 Immunlokalisierung in Wurzeln

Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* wurden fixiert, indem sie zweimal 30 min lang mit frisch hergestelltem Fixativ (4 % Paraformaldehyd in MTSB) unter leichtem Vakuum (Wasserstrahlpumpe) infiltriert wurden. Die weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei RT, wenn nicht anders angegeben, in einem InSituPro-Roboter (Intavis, Köln). Die Wurzeln wurden fünfmal mit MTSB mit 0,1 % Triton X-100 für jeweils 12 min gespült, danach fünfmal mit 0,1 % Triton X-100 in sterilem aqua dest. für jeweils 12 min.

Durch 30 min Inkubation mit 2 % Driselase in MTSB wurden die Zellwände permeabilisiert, anschließend wurde wieder fünfmal mit MTSB mit 0,1 % Triton X-100 für jeweils 12 min gespült. Die Permeabilisation der Membranen erfolgte durch zwei 30-minütige Inkubationen mit 10 % DMSO und 3 % NP-40 in MTSB, nach denen wieder fünfmal mit MTSB mit 0,1 % Triton X-100 für jeweils 12 min gespült wurde. Die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde durch einen Blocking-Schritt vorbereitet, bei dem die Wurzeln für 1 h mit 3 % BSA in MTSB inkubiert wurden.

Primäre Antikörper wurden in 3 % BSA in MTSB 1:20 bis 1:137 verdünnt, die Inkubation erfolgte für 4 h bei 37 °C, anschließend wurde achtmal mit MTSB mit 0,1 % Triton X-100 für jeweils 12 min gespült. Der sekundäre Antikörper wurde 1:200 in 3 % BSA in MTSB verdünnt. Die Wurzeln wurden darin 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie gespült, nämlich fünfmal mit MTSB mit 0,1 % Triton X-100 für jeweils 12 min und weitere fünfmal für jeweils 12 min in sterilem destilliertem Wasser.

Danach konnten die Wurzeln auf Objektträger überführt und in SlowFade (Molecular Probes Europe, Leiden, NL) eingebettet werden. Sie konnten sofort oder nach wenigen Tagen im Mikroskop betrachtet werden.

2.10.3 Immunlokalisierung in Blüten

Blüten und Blütenknospen von Petersilie wurden für 2 h in einer Mischung von 1 g Paraformaldehyd und 0,4 ml 25 %igem Glutaraldehyd in 50 ml 0,1 M Natriumphosphatpuffer auf Eis fixiert. Danach wurden sie kurz in 0,1 M Natriumphosphatpuffer gewaschen und nacheinander in 30 %igem und 50 %igem Ethanol (in

Wasser) für jeweils 20 min auf Eis und in 70 %igem Ethanol bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgten Inkubationen in 85 %igem, 90, 96 und noch einmal 96 %igem Ethanol für jeweils 20 min bei RT. Danach wurde Ethanol gegen tertiäres Buthanol ausgetauscht. Es wurden Mischungen von Ethanol und tertiärem Buthanol im Verhältnis 3:1, 1:1 und 1:3 (v/v) hergestellt und die Blüten und Blütenknospen darin für jeweils 30 min bei RT inkubiert, abschließend unter gleichen Bedingungen in 100 %igem tertiären Buthanol. Danach wurden sie in Paraplast überführt. Es wurde eine gesättigte Lösung von Paraplast in tertiärem Buthanol hergestellt und die Blüten und -knospen darin für 5 h bei 30 °C, für 30 min bei 42 °C, dann über Nacht bei 42 °C und für 30 min bei 60 °C inkubiert. Dadurch wurde das Paraplast so flüssig, daß es mit den Objekten in Petrischalen gegossen werden konnte, die wiederum für 2-3 Tage bei 60 °C offen gelagert wurden (um das Buthanol abdampfen zu lassen), danach erkaltete das Paraplast bei RT und die Schalen konnten bei 4 °C aufbewahrt werden.

Mit dem Cryothom wurden bei leichter Kühlung (15-18 °C) Schnitte von 10 μm Dicke hergestellt, auf einen Film destillierten Wassers auf einem Objektträger aufgebracht und bei 37 °C über Nacht trocknen gelassen.

Zum Deparafinisieren wurden die Objektträger mit Schnitten von Blüten und -knospen für 10 min in Xylol, für 5 min in einer 1:1-Mischung von Ethanol und Xylol und für jeweils 5 min in Ethanol absteigender Konzentration (95 %, 80 %, 60 % und 30 %) gespült. Nach dem Trocknen bei Raumtemperatur konnten sie bei 4 °C gelagert werden.

Die Objektträger mit Schnitten von Blüten und Knospen in sechs verschiedenen Stadien wurden für 5 min in PBS gespült und danach für 15 min bei RT in 1% BSA in PBS geblockt. Das Antiserum gegen Profilin (Tier 2559) und das zugehörige Präimmenserum wurden 1:100 in 1% BSA in PBS verdünnt und die Schnitte darin für 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Schnitte zweimal für je 5 min in 0,1% Tween 20 in PBS bei RT gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurde Ziege-anti-Kaninchen-IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, verwendet. Dieser Antikörper wurde 1:150 in 1% BSA in PBS verdünnt, darin wurden die Schnitte für 1 h bei 37 °C inkubiert und danach gewaschen wie oben angegeben, die letzte Spülung erfolgte in destilliertem Wasser für 5 min. Eine BCIP/NBT-Tablette (Sigma, München) wurde entsprechend den Herstellerangaben in 10 ml destillierten Wassers aufgelöst, darin wurden die Schnitte für 10 min bei RT inkubiert. Das BCIP/NBT-Substrat wurde mit destilliertem Wasser ausgewaschen (5 min bei RT).

Die Schnitte wurden mit Mowiol 4-88 (Calbiochem, Darmstadt) beschichtet, bevor die Deckgläschen aufgelegt wurden, im Lichtmikroskop betrachtet und fotografiert.

2.11 Färbetechniken

2.11.1 Färben der Pilze

Coomassie-Färbung 0,6 % Coomassie (w/v) wurden in Methanol aufgenommen. Infizierte Blätter wurden darin 1-5 min gefärbt und anschließend in Wasser gespült. Diese Färbung ließ die Pilze deutlich dunkelblau erscheinen.

Diethanol-Färbung 0,02 % (w/v) Diethanol wurden in sterilem aqua dest. aufgenommen, davon wurden einige Tropfen zum Objekt gegeben, das nach ca. 2 min Einwirkzeit mit aqua dest. gespült wurde. Bei einer Anregungswellenlänge von 365 nm fluoresziert Diethanol hellblau (Sperrfilter 420-530 nm)

Anilinblau-Färbung Abgetrennte und infizierte Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden in Färbelösung (0,05 % (w/v) Anilinblau (Wasserblau, Fluka) in 0,067 M Na-Phosphatpuffer) ca. 10 min inkubiert, gegebenenfalls unter leichtem Vakuum (Membranpumpe, Exsiccator), in Na-Phosphatpuffer gepült und unter dem Mikroskop betrachtet. Anilinblau gefärbte Pilzstrukturen erscheinen blau, unter UV-Anregung bläulich-hell fluoreszierend. Anilinblau-gefärbte Kallose erscheint gelblich fluoreszierend.

2.11.2 GUS-Färbung

Blätter wurden mit GUS-Lösung für 20 min unter leichtem Vakuum infiltriert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach konnten sie durch Inkubation in Entfärbelösung über Nacht entfärbt werden. Zur Herstellung der Entfärbelösung wurden zu einem Volumenanteil Stammlösung der Entfärbelösung zwei Volumenteile Ethanol gegeben. Das diente auch dem Entfärben der Blätter, die durch den Chlorophyllverlust heller wurden und so besser zu mikroskopieren waren.

2.11.3 Färben der Zellkerne

DAPI-Färbung Eine Lösung von 50 ng/ml DAPI (Sigma, München, Deisenhofen) in MSB wurde zu den infizierten und fixierten Zellen auf den Objektträger gegeben. Nach kurzer Einwirkzeit (ca. 5 min) wurde diese Lösung durch Spülung mit MSB entfernt. Zellen wurden im Mikroskop betrachtet, durch UV-Anregung wurden Zellkerne sichtbar.

2.12 Mikroskopie

2.12.1 Mikroskope und Filter

Es wurden Mikroskope der Firmen Zeiss (Axiophot, Axiovert), Leitz (Binokular, CLSM) und Olympus, Hamburg, CCD-Kameras (Hamamatsu, Japan) und

folgende Filter verwendet:

DsRed-Filter Excitation filter: D 546/10, Beam splitter: 565 DCLP, Emission filter: 600/40

GFP-Filter (narrow band) Excitation filter: HQ 480/20, Beam splitter: HQ 495 LP, Emission filter: HQ 510/20

UV Longpath Excitation filter: 375/15, Beam splitter: 405 LP

2.12.2 Bildverarbeitung

Zur digitalen Mikrophotographie wurden spezielle Programme verwendet, das waren TillVision (Till Photonics, Gräfelfing) und Diskus (Technisches Büro Hilgers, Königswinter). Bildverarbeitung erfolgte mit den gängigen Computerprogrammen (Adobe Photoshop, CorelDraw 8.0).

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Profiline

Das pflanzliche Zytoskelett wird aus Aktinfilamenten und Mikrotubuli gebildet. Es spielt eine essentielle Rolle bei zellulären Prozessen wie der Zellteilung, dem Zellwachstum, der Zellpolarisation, in Reaktionen der Pflanze auf Phytohormone und, ganz entscheidend, bei Pathogenbefall. Aktinfilamente unterliegen einem ständigen Umbau, ihre Dynamik wird durch Aktin-bindende Proteine reguliert [153]. Eines davon ist Profilin, es kann Aktinmonomere wie Aktinfilamente, außerdem das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) und Poly-L-Prolin-reiche Abschnitte in Proteinen binden. Profilin ist in allen Zellen zu finden [158].

Profilin bildet einen Schwerpunkt dieser Arbeit. Es sollten Vorkommen und Funktion von Profilin in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana* untersucht werden.

3.1.1 Gewinnung und Reinigung von Antikörpern

Für die Amplifikation einer Profilinsequenz aus *Petroselinum crispum* wurden degenerierte Primer verwendet. Als Matrix diente eine cDNA-Bibliothek von Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* [94]. Die Sequenz des erhaltenen DNA-Fragments wurde mittels RACE (rapid amplification of cDNA ends) vervollständigt. Der auf diese Weise erhaltene cDNA-Klon wurde freundlicherweise von Dr. Sabine Gus-Mayer zur Verfügung gestellt. Er trägt in dieser Arbeit die Bezeichnung PcPRF1.

Um die Lokalisation eines Proteins in einer Zelle sichtbar zu machen, muß es markiert werden. Eine Möglichkeit, ein Protein intrazellulär zu markieren, ist die Verwendung eines Antiserums. Zur Gewinnung eines Antiserums gegen Profilin wurde PcPRF1 als Fusion mit einem Histidin-Peptid (Hexamer) heterolog exprimiert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Profilin aus *Ambrosia artemisiifolia* (freundliche Gabe von Prof. Rudolph Valenta, Wien) wurde überprüft, daß es sich

bei dem heterolog exprimierten Protein tatsächlich um Profilin handelt. Das in großen Mengen gewonnene Protein wurde elektrophoretisch von anderen Proteinen getrennt (SDS-PAGE), aus dem Gel ausgeschnitten und zur Immunisierung von zwei Kaninchen verwendet (BioGenes, Berlin). Das so gewonnene Antiserum wurde im Western Blot getestet.

Um Profilin auf subzellulärer Ebene lokalisieren zu können, mußte der Antikörper gereinigt werden. Die Affinitätsreinigung geschah mittels Ni-Agarose-Säulchen, an die heterolog exprimiertes Profilin gebunden war. Das Ergebnis der Reinigung wurde im Western Blot überprüft. Extrakte von Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* wurden mittels SDS-PAGE separiert, auf eine Membran übertragen und mit dem affinitätsgereinigten Antiserum inkubiert. Abb. 3.1 zeigt das Ergebnis der Gewinnung und Reinigung des Antiserums. Es ist noch genau eine Bande in der zu erwartenden Größe, nämlich bei ca. 14 kDa, zu sehen.

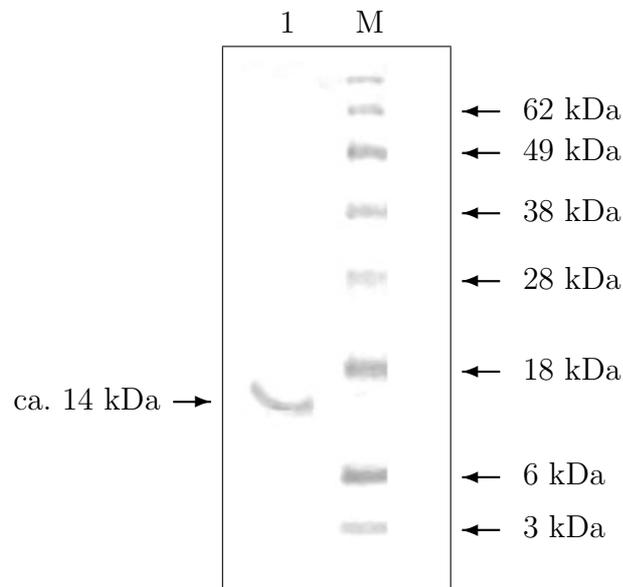


Abb. 3.1: Western Blot von SDS-PAGE-getrennten Proteinextrakt aus Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur (1), Inkubation mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin. M – Molekulargewichtsmarker.

3.1.2 Expressionsanalyse mittels Western Blot

Zunächst sollte das Vorkommen von Profilin in *Petroselinum crispum* untersucht werden. Es wurden Proteinextrakte von Pflanzenteilen, von Wurzeln, Blättern (Blattstielen und Blattspreiten) und Blüten und Extrakte von Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur mittels Western Blot untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.2 bis 3.4 dargestellt.

Alle untersuchten Gewebe zeigten eine charakteristische Bande bei ca. 14 kDa, außerdem entstanden in Extrakten von Blattstielen und Suspensionskulturzellen Signale im höheren Molekulargewichtsbereich, weniger gut sichtbar auch in Extrakten aus Blattspreiten. Auch Extrakte Suspensionskulturzellen zeigten das beschriebene Bandenmuster. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man davon ausgehen, daß Profileine in *Petroselinum crispum* nicht nur vorkommen, sondern in allen Geweben exprimiert werden.

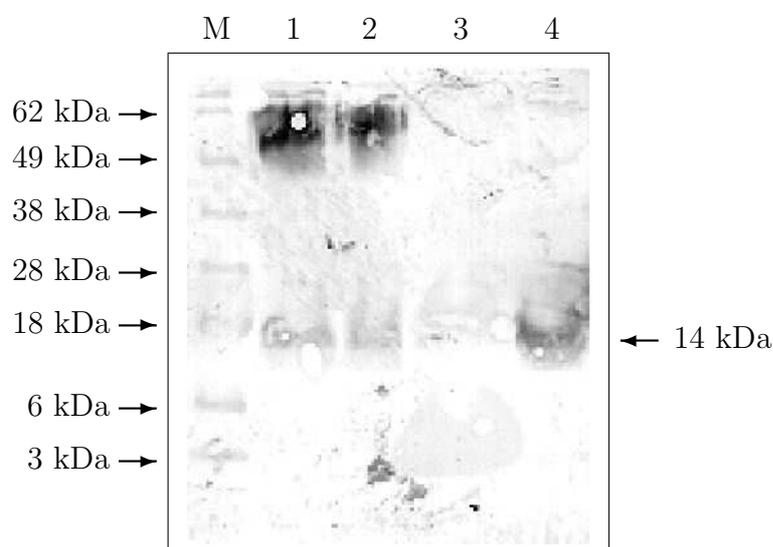


Abb. 3.2: Western Blot von SDS-PAGE-getrennten Proteinextrakten. Extrakte wurden aus Petersiliezellen aus Suspensionskultur (1 und 2), aus Blütenständen (3) und aus Blattspreiten (4) von *Petroselinum crispum* gewonnen. M – Molekulargewichtsstandard. Polyklonales Antiserum gegen Profilin.

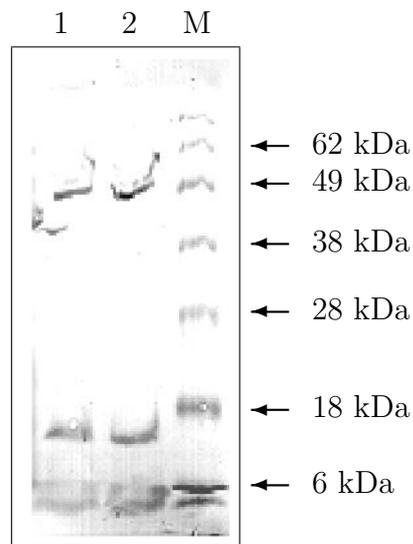


Abb. 3.3: Western Blot von SDS-PAGE-getrennten Proteinextrakten von Blattstielen (1 und 2) von *Petroselinum crispum*. M – Molekulargewichtsstandard. Polyklonales Antiserum gegen Profilin.

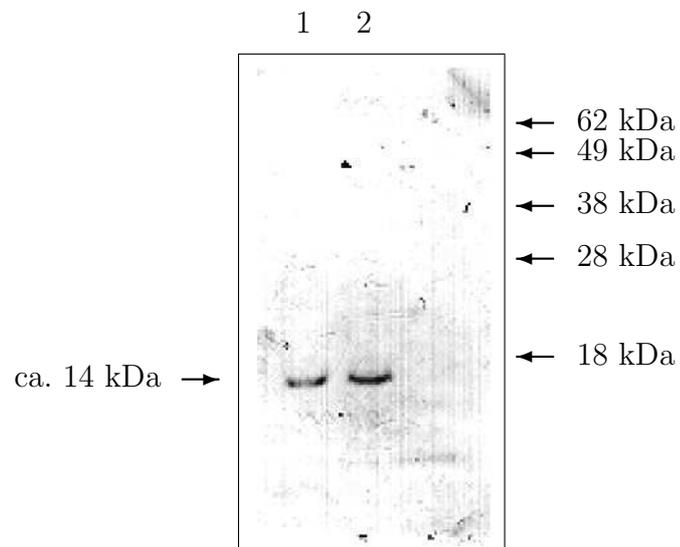


Abb. 3.4: Western Blot von SDS-PAGE-getrennten Proteinextrakten aus Wurzeln von *Petroselinum crispum* (1 und 2). Polyklonales Anti-Profilin-Serum.

3.1.3 Immunlokalisation von Profilin in Blüten von *Petroselinum crispum*

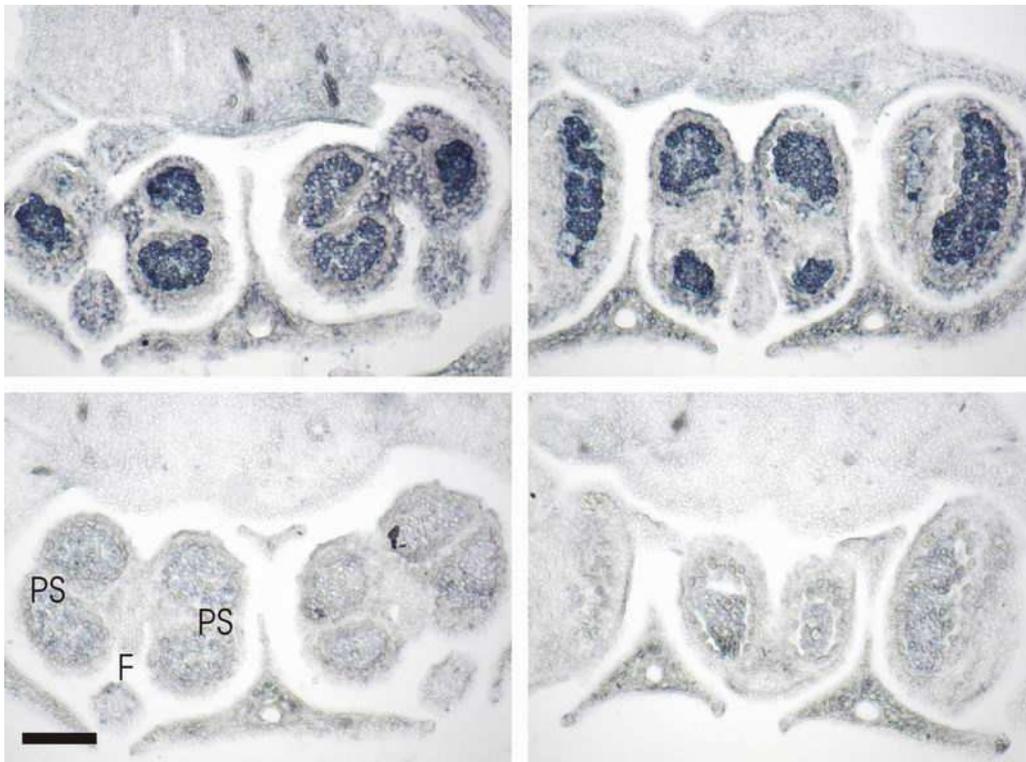


Abb. 3.5: Längsschnitte durch fixierte Blütenknospen von Petersilie. Die Schnitte wurden mit polyklonalem Antiserum gegen Profilin (obere Abbildungen) oder mit Präimmunserum (untere Abbildungen) inkubiert. F – Filament, PS – Pollensack, Maßstab 100 μm

Welche Gewebe oder Organe aber besonders viel Profilin exprimieren, sollte im nächsten Experiment untersucht werden. Dazu wurden Blüten und Blütenknospen von *Petroselinum crispum* in sechs verschiedenen Stadien fixiert, geschnitten und mit Antiserum gegen Profilin inkubiert. Abb. 3.5 zeigt ein typisches Bild einer Knospe in einem späten Stadium. Man kann feststellen, daß, verglichen mit der Kontrollinkubation, jede Zelle der Blütenknospe ein mehr oder weniger starkes Signal gibt, also Profilin exprimiert. Als Zellen mit der stärksten Profilinexpression fallen die sich entwickelnden Pollen auf. Außerdem zeigen Zellen am Übergang zwischen Filament und Pollensack und die äußerste Zellschicht der Pollensäcke stärkere Signale.

Hier nicht dargestellte Schnitte von Blütenknospen in anderen Entwicklungsstadien zeigten die Entwicklung der Profilinexpression in den reifenden Pol-

lenkörnern. Auch in Blütenknospen in früheren Entwicklungsstadien reagieren Strukturen in reifenden Pollenkörnern mit dem Antiserum gegen Profilin. Allerdings ist das Signal in jüngeren Pollenkörnern schwächer im Vergleich zu dem hier gezeigten reiferen Stadium. Auch in späteren Stadien der Blütenentwicklung läßt sich Profilin in Pollenkörnern nachweisen. Die Antikörperfärbung in Pollenkörnern ist aber nur so lange zu sehen, bis diese von der Pollenwand umschlossen werden.

Das eingesetzte Antiserum kann sehr wahrscheinlich nicht zwischen möglicherweise vorhandenen Isoformen von Profilin unterscheiden. Dieses Experiment gibt also keine Auskunft darüber, ob in Blüten von *Petroselinum crispum* mehrere Isoformen von Profilin exprimiert werden und welche das sind (siehe Abschnitt 3.1.6).

3.1.4 Intrazelluläre Lokalisation mittels Profilin-GFP

Neben dem Einsatz von Antikörpern ist eine weitere Möglichkeit der intrazellulären Lokalisation eines Proteins seine Fusion mit einem fluoreszierenden Protein, zum Beispiel dem grün fluoreszierenden Protein (green fluorescent protein – GFP) aus *Aequorea victoria* [47]. Die zelluläre Lokalisation von Profilin sollte mittels einer Fusion von PcPRF1 mit GFP untersucht werden. Dazu wurde eine translatorische Fusion hergestellt, bei der GFP C-terminal von PcPRF1 exprimiert wurde. Die DNA wurde mittels PEG in Protoplasten von *Petroselinum crispum* transformiert. Die transiente Expression konnte schon vier Stunden und bis zu ca. 30 Stunden nach Transformation im Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden.

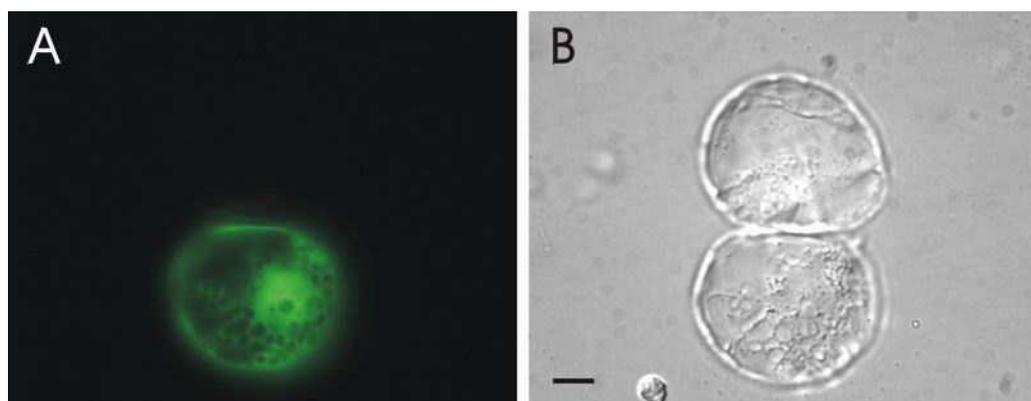


Abb. 3.6: Protoplasten von *Petroselinum crispum*, PEG-transformiert mit Profilin-GFP, A – Fluoreszenz- und B – Durchlichtbild. Maßstab 10 μm

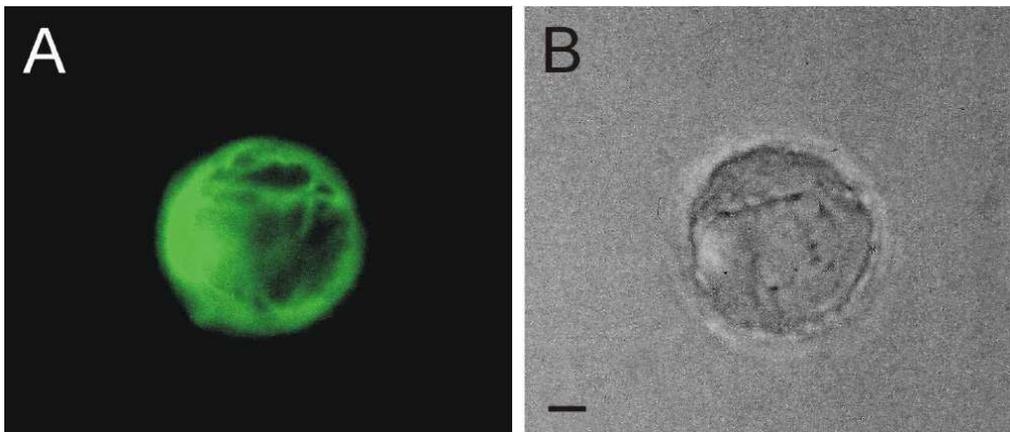


Abb. 3.7: Protoplasten von *Petroselinum crispum*, PEG-transformiert mit GFP (Positivkontrolle), A – Fluoreszenz- und B – Durchlichtbild. Maßstab 10 μm

Abb. 3.6 zeigt ein typisches Ergebnis einer Transformation von Protoplasten mit PcPRF1-GFP. Es sind im Durchlichtbild zwei Protoplasten zu sehen, von denen einer, wie das Fluoreszenzbild zeigt, das Fusionsprotein exprimiert. Im Durchlicht- wie im Fluoreszenzbild ist zu sehen, daß der Protoplast, der das Fusionsprotein exprimiert, im Gegensatz zum nicht transformierten Protoplasten daneben nicht über normale Zytoplasmastränge verfügt. Diese haben sich anscheinend aufgelöst. Im Zytoplasma erscheint eine Vielzahl kleiner bis mittelgroßer Vesikel, das Zytoplasma scheint in Form von Bläschen vorzuliegen. Dieses aberrante Erscheinungsbild des Zytoplasmas trat in mit PcPRF1-GFP transformierten Protoplasten auf, sobald GFP-Expression zu erkennen war. Später war Zytoplasma nur noch entlang der Membran des Protoplasten zu sehen, der Kern zusammen mit dem Großteil des Zytoplasmas lag an der Peripherie des Protoplasten. Es waren keinerlei Zytoplasmastränge mehr zu sehen. Folglich war auch keine gerichtete Zytoplasmaströmung mehr erkennbar.

Im Gegensatz dazu zeigten Protoplasten, die zu Kontrollzwecken nur mit GFP und nicht mit dem Fusionsprotein transformiert worden waren (siehe Abb. 3.7) über die gesamte Beobachtungszeit Zytoplasmastränge und eine normale Verteilung des Zytoplasmas.

Verschiedene Modifikationen des Experiments wurden vorgenommen, um entweder das Expressionsniveau von Profilin bzw. des Fusionsproteins geringer zu halten oder zumindest die gravierenden Auswirkungen auf die Zytoarchitektur zu vermeiden oder geringer zu halten. Es wurde weniger DNA zur Transformation eingesetzt und es wurde ein weniger starker Promotor zur Steuerung der Expression der Proteinfusion verwendet. Außerdem wurden Protoplasten möglichst kurz nach der Transformation im Mikroskop betrachtet, um dem Fusionsprotein möglichst wenig Zeit zu geben, in der Zelle zu akkumulieren. Allerdings ergab auch die Anwendung dieser drei Modifikationen kein wesentlich anderes Bild. So-

bald die Expression des Fusionsproteins anhand grüner Fluoreszenz erkennbar wurde, war das gesamte Zytoplasma davon erfüllt. Damit einher ging auch immer eine veränderte Morphologie des Zytoplasmas. Es läßt sich also vermuten, daß die Überexpression von Profilin zum Verlust von Zytoplasmasträngen und zum Zusammenbruch der Zytoplasmaströmung führte.

Eine andere Ursache für diese beiden Phänomene könnte eine unrichtige Faltung des PcPRF1-GFP-Fusionsproteines sein. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde GFP N-terminal mit PcPRF1 fusioniert. Diese zeigte in Protoplasten eine insgesamt viel geringere Expression, führte aber zu keiner wesentlich anderen intrazellulären Morphologie. Ein ebenfalls ähnliches Bild ergab die Expression eines Fusionsproteins, das zwischen PcPRF1 und GFP eine "Linker-Sequenz" von sechs Glycinresten trug.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die aberrante zytosolische Morphologie eine spezifische Folge der Überexpression von Profilin bzw. dem Fusionsprotein darstellt. Für andere Pflanzen ist gezeigt worden, daß Mikroinjektion von Profilin Zytoplasmastränge zerstört und die Zytoplasmaströmung zum Erliegen bringt, was wahrscheinlich an seiner Wechselwirkung mit Aktin liegt [178, 187, 191].

3.1.5 Untersuchung der Profilin-Genfamilie in *Petroselinum crispum* – Southern Blot

Die DNA von PcPRF1 wurde als Sonde benutzt, um die Größe der Profilin-Genfamilie in *Petroselinum crispum* mittels Southern Blot zu untersuchen. Es wurde DNA aus Petersiliepflanzen bzw. aus Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* extrahiert und mit jeweils fünf verschiedenen Restriktionsendonukleasen (BamHI, EcoRI, EcoRV, HincII und HindIII) behandelt, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Hybond-Membran übertragen. DNA mit der Sequenz von PcPRF1 wurde radioaktiv markiert. Damit wurde die Membran hybridisiert und danach gewaschen. Hier dargestellt (Abb. 3.8) ist das Ergebnis des Waschens unter moderaten Bedingungen ($2\times\text{SSC}$, 0,1 % SDS und $0,5\times\text{SSC}$, 0,1 % SDS, 58 °C).

Je nach eingesetztem Enzym zeigt der Southern Blot drei bis fünf Hauptbanden, außer diesen sind auch mehrere schwache Banden zu sehen. Profileine sind innerhalb einer Pflanzenart meist sehr ähnlich (dargestellt in Abb. 4.1), so daß zu vermuten ist, daß die starken Banden tatsächlich von Profilingenen herrühren. Die trotz des milden Waschens schwachen Banden rühren sicher nicht von Profilingenen her. Dieses Ergebnis zeigt, daß die Profilogene in *Petroselinum crispum* eine kleine, wenige Mitglieder umfassende Genfamilie bilden.

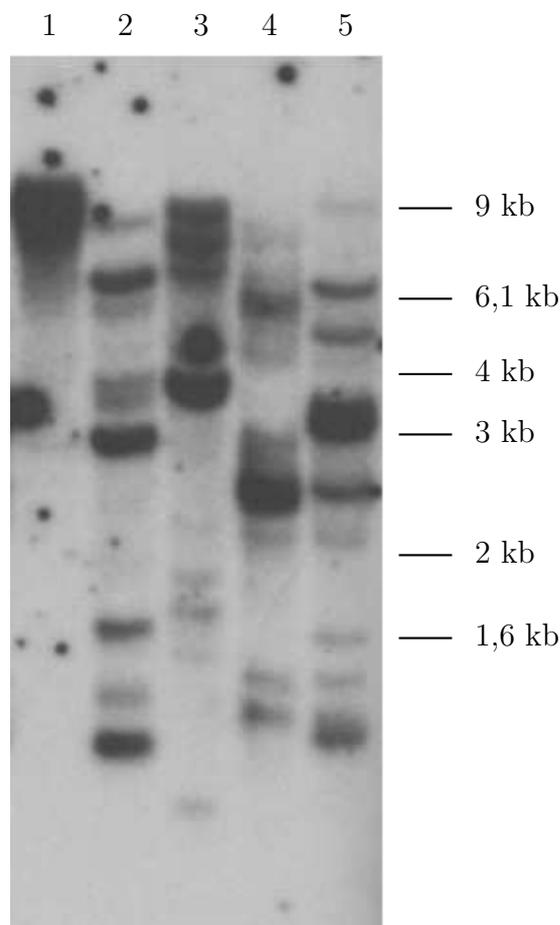


Abb. 3.8: Southern Blot. DNA aus *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Behandlung mit den Restriktionsendonukleasen BamHI (1), EcoRI (2), EcoRV (3), HincII (4) oder HindIII (5), Größe der Fragmente wie angegeben, Bedingungen im Text.

3.1.6 Klonierung weiterer Profiline aus *Petroselinum crispum* – “Colony Screening”

Als nächstes wurden weitere Profiline aus *Petroselinum crispum* kloniert. Dazu wurde eine cDNA-Bibliothek, die aus Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur hergestellt worden war [94], durchsucht. Dabei diente PcPRF1 wiederum als Sonde.

Dabei wurden vier neue Profiline gefunden und kloniert. Sie wurden PcPRF2 bis PcPRF5 genannt. Aus den cDNA-Sequenzen wurden die Aminosäure-Sequenzen abgeleitet. In Abb. 3.9 sind die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von PcPRF1 und den neu klonierten Profilen PcPRF2 bis PcPRF5 dargestellt, die

vollständigen cDNA-Sequenzen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Anhang aufgeführt (Abb. A.1-A.5). Ihre DNA- wie ihre abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind einander sehr ähnlich. Die vorhandenen untranslatierten 3'-Bereiche sind kurz. Drei der vier neu gefundenen Profile (PcPRF2 bis PcPRF4) bestehen, ebenso wie PcPRF1, aus 134 Aminosäuren, während PcPRF5 nur aus 132 Aminosäuren besteht. Bemerkenswert ist, daß sich PcPRF1 und PcPRF3 in nur zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden, PcPRF2 und PcPRF4 sogar in nur einer Aminosäure, während der Unterschied zwischen PcPRF2 und PcPRF4 zu PcPRF1 in elf bzw. zwölf Aminosäuren besteht. Relativ stark von PcPRF1-4 unterscheidet sich PcPRF5. Es besteht aus nur 132 Aminosäuren, davon sind 20 anders als bei PcPRF1, verglichen mit PcPRF4 sind es 21 Aminosäuren. Die pI-Werte der fünf Profile aus *Petroselinum crispum* wurden elektronisch berechnet und liegen zwischen 4,3 und 4,8.

Die kurzen vorhandenen 5'-UTRs von PcPRF2 und PcPRF4 sind einander sehr ähnlich, ebenso wie die 3'-UTRs, die sich aber in ihrer Länge unterscheiden. Gleiches gilt für PcPRF1 und PcPRF3.

	1				50
PcPRF2	MSWQAYVDDH	LMCEIENNPG	QTLTAAAIIG	HDGSVWAQSS	TFPQVKPEEI
PcPRF4	MSWQAYVDDH	LMCEIENNPG	QTLTAAAIIG	HDGSVWAQSS	TFPQVKPEEI
PcPRF1	MSWQAYVDDH	LLCEVEGNPG	QHLSAAAIIG	HDGSVWAQSS	SFPKFKPEEI
PcPRF3	MSWQAYVDDH	LLCEVEGNPG	QHLSAAAIIG	HDGSVWAQSS	SFPNFKPEEI
PcPRF5	MSWQSYVDDH	LMCLTE. .EG	NQLSAAAIIG	HDGSVWAQSD	TFPQFKPEEI
	51				100
PcPRF2	SGIMKDFDEP	GYLAPTGLYL	GGAKYMVIQG	EPNAVIRGKK	GSGGVTIKKT
PcPRF4	AGIMKDFDEP	GYLAPTGLYL	GGAKYMVIQG	EPNAVIRGKK	GSGGVTIKKT
PcPRF1	AGIMKDFDEP	GHLAPTGLYL	GGTKYMVIQG	EPNAVIRGKK	GSGGVTIKKT
PcPRF3	AGIMKDFDEP	GHLAPTGLYL	GGTKYMVIQG	EPNAVIRGKK	GSGGVTIKKT
PcPRF5	TAIMKDFDEP	GSLAPTGLYL	GGTKYMVIQG	EPNAVIRGKK	GSGGVTIKKS
	101			134	
PcPRF2	GLALVFGVYD	EPVTPGQCNM	IVERLGDYLI	EQGM	
PcPRF4	GLALVFGVYD	EPVTPGQCNM	IVERLGDYLI	EQGM	
PcPRF1	GLALVFGVYD	EPVTPGQCNL	IVERLGDYLI	EQGL	
PcPRF3	GLALVFGVYD	EPVTPGQCNL	IVERLGDYLI	EQGM	
PcPRF5	NQALLIGIYE	EMPPGQCNV	VVERLGDYLI	DQGL	

Abb. 3.9: Aminosäuresequenzen der aus *Petroselinum crispum* klonierten Profile PcPRF1 bis PcPRF5

3.1.7 Profilin-dsRNAi in Protoplasten von *Petroselinum crispum*

Um die Expression eines Genes transient oder dauerhaft auszuschalten, bieten sich mehrere Möglichkeiten. Eine Methode des posttranskriptionalen Gen-”Silencings” (PTGS) ist die des double-stranded RNA interference (dsRNAi) [188]. Hierbei interagiert doppelsträngige RNA spezifisch mit dem endogenen Transkript des auszuschaltenden Genes und bewirkt so den Abbau des Transkriptes [41, 165].

In dieser Arbeit wurde ein DNA-Konstrukt hergestellt, das die cDNA für PcPRF1 zweimal, nämlich in entgegengesetzter Orientierung, enthielt, so daß die transkribierte mRNA durch die Sequenzähnlichkeit bzw. -identität ihrer Teile eine doppelsträngige Struktur ausbilden und mit dem Transkript von PcPRF1 interagieren sollte.

Später wurde das DNA-Konstrukt so modifiziert, daß zwischen den beiden entgegengesetzt orientierten Sequenzen für PcPRF1 noch ein Intron des WRKY44-Genes aus *Arabidopsis thaliana* (AtWRKY44) kloniert wurde. Diese Modifikation sollte die Effizienz des ”Silencings” erhöhen [170]. Für diese Modifikation wurden die Plasmide pJawohl3 und pJawohl8 verwendet, die freundlicherweise von Dr. Bekir Ülker zur Verfügung gestellt wurden.

	PRF-GFP ohne dsRNAi	PRF-GFP und PRF-dsRNAi ohne Intron	PRF-GFP und PRF-dsRNAi mit AtWRKY44-Intron
Betrachtete Protoplasten	620	531	404
davon mit GFP- Expression	41	28	15
Anteil	6.6 %	5.3 %	3.6 %

Tabelle 3.1: Petersilie-Protoplasten wurden mit einem Reporter-Gen (PRF1-GFP) und PRF-dsRNAi-Konstrukten transient transformiert. Sechs Stunden nach Transformation wurde der Anteil GFP-exprimierender Protoplasten ausgezählt.

Zunächst wurden Protoplasten von *Petroselinum crispum* mit zwei Plasmiden kotransformiert. Das sollte dazu dienen, die Methode des dsRNAi im *Petroselinum crispum* auszuprobieren und die Effizienz des Silencings abzuschätzen. Eines der kotransformierten Plasmide trug ein Reportergen, nämlich eine translationale Fusion von PcPRF1 mit GFP (siehe 3.1.4). Das andere war DNA, die zum Ausschalten der Profilinexpression führen sollte (PcPRF1-dsRNAi). Verwendet wurden das ursprüngliche PRF-dsRNAi-Konstrukt wie das modifizierte, das Intron

von AtWRKY44 enthaltende PRF-dsRNAi-Konstrukt. Alle Konstrukte wurden mittels PEG-Transformation in Protoplasten von *Petroselinum crispum* gebracht. Zur Kontrolle wurden Protoplasten nur mit PRF-GFP transformiert. Sechs Stunden nach der Transformation wurden die Protoplasten im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurden die grün fluoreszierenden Protoplasten gezählt. Tabelle 3.1 gibt das Ergebnis eines solchen Experiments wieder.

Beim Vergleich der Zahlenwerte zeigte sich, daß von den Protoplasten, die nur mit dem Reportergen transformiert wurden, ca. 7 % fluoreszieren. Die Häufigkeit fluoreszierender Protoplasten verringerte sich, wenn gleichzeitig mit dem Reportergen ein PRF-dsRNAi-Konstrukt transformiert wurde. Das einfache PRF-dsRNAi-Konstrukt verringerte den Anteil fluoreszierender Protoplasten auf ca. 5 %. Deutlich verringert wurde die Häufigkeit fluoreszierender Protoplasten, wenn statt des einfachen PRF-dsRNAi-Konstrukts das weiterentwickelte Konstrukt verwendet wurde, das zwischen den Profilin-Genen das AtWRKY44-Intron trug. Es exprimierten nur noch ca. 4 % der betrachteten Protoplasten GFP.

Dieses Experiment gab also einen Hinweis darauf, daß die Reduktion der Expression der Profilogene mittels dsRNAi funktionieren könnte. Es zeigte sich, daß das PRF-dsRNAi-Konstrukt, daß das Intron eines fremden Genes, nämlich von AtWRKY44, trug, die Expression von PRF-GFP wesentlich stärker reduzierte als das PRF-dsRNAi-Konstrukt ohne Intron. Im weiteren wurden fast ausschließlich PRF-dsRNAi-Konstrukte verwendet, die das Intron von AtWRKY44 enthielten.

3.1.8 Klonierung der Profile aus *Arabidopsis thaliana*

Zwei Artikel beschäftigen sich mit den Profilengen und ihrer Expression in *Arabidopsis thaliana* [24, 73]. Beide sprechen von vier Profilengen, die unterschiedlich exprimiert werden. Huang et al. berichten von drei somatisch und einem in Blüten exprimierten Profilin [73]. Christensen et al. beschreiben zwei somatisch und zwei in Blüten exprimierte Profile [24]. Mit Hilfe der vorhandenen Sequenzinformation aus *Arabidopsis thaliana* konnte die Information aus beiden Artikeln verglichen und sortiert werden. Eine Zusammenstellung zeigt Tabelle 3.2.

Alle fünf Profile aus *Arabidopsis thaliana* sollten kloniert werden. Dafür wurden Primer entwickelt, die für jedes der fünf Profile spezifisch waren. Das ging nur, indem sie so gewählt wurden, daß sie zu den nichttranslatierten Bereichen der Profile homolog waren. RNA aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* wurde in cDNA umgeschrieben. Diese wurde als Template für PCR zur Amplifikation der Profile PRF1-5 verwendet. Auf diese Weise konnte aber nur DNA von PRF1-3 gewonnen werden. Das sind die Profile, die, nach Angaben aus der Literatur, in den Zellen aller Gewebetypen in *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden (siehe Tabelle 3.2 und [24, 73]). Zur Amplifikation von PRF4 und PRF5 wurde cDNA aus Blüten von *Arabidopsis thaliana* freundlicherweise von Dr. Marc Jakoby zur Verfügung gestellt. Durch Verwendung von cDNA aus Blüten als Template für eine PCR konnten auch PRF4 und PRF5 kloniert werden.

Christensen et al. [24]		Huang et al. [73]		Hier verwendeter Name
Name	Expression gefunden in	Name	Expression gefunden in	
PFN1	allen untersuchten Organen	PRF1	allen untersuchten Organen, auch Pollen	PRF1
PFN2	allen untersuchten Organen, besonders in Leitbündeln	PRF2		PRF2
PFN3	Blüten	PRF3		PRF3
PFN4	Blüten, Antheren, Pollen	PRF4	Pollen	PRF4
				PRF5

Tabelle 3.2: Profile in *Arabidopsis thaliana*. Zusammenstellung der Information aus zwei Artikeln [24, 73] und Vergleich mit der Genomsequenz von *Arabidopsis thaliana*. Außerdem werden die Namen angegeben, die die Profile aus *Arabidopsis thaliana* in dieser Arbeit bezeichnen.

cDNAs von PRF4 und PRF5 wurden hiermit zum ersten Mal aus *Arabidopsis thaliana* kloniert, die genomischen Sequenzen und die abgeleiteten Proteinsequenzen waren aber schon bekannt [73, 24].

3.1.9 Aktinfilamente in mit Profilin-dsRNAi transient transformierten Epidermiszellen

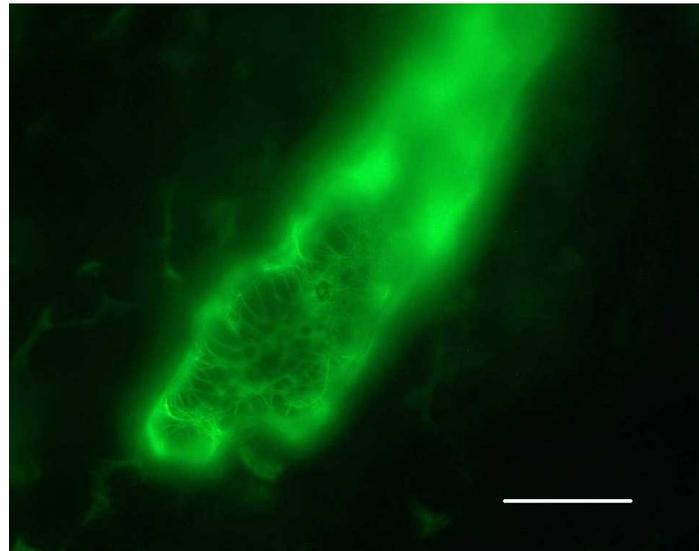


Abb. 3.10: Epidermiszelle eines mit Talin-GFP und PRF-dsRNAi transformierten *Arabidopsis*-Blattes 24 h nach Transformation. Maßstab 20 μm .

Abschnitt 3.1.7 beschreibt Wirkungsweise von dsRNAi und Wirkung von PRF-dsRNAi in Protoplasten von *Petroselinum crispum*. Bei den dort beschriebenen Versuchen wurde die Expression eines kotransformierten Reportergens reduziert. Als nächstes wurde PRF-dsRNAi in Blättern von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt, um die Auswirkung reduzierten zellulären Profilin Gehalts auf die Anatomie des Zytoskeletts untersuchen zu können.

Abgetrennte Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden mittels biolistischer Transformation transient mit PRF-dsRNAi-Konstrukten transformiert. Als Reportergen wurde diesmal ein Talin-GFP-Konstrukt verwendet. Dieses Reportergen enthielt eine Fusion der Aktin-bindenden Domäne des Aktin-bindenden Proteins Talin aus Maus [96]. Es wurde freundlicherweise von Dr. Volker Lipka zur Verfügung gestellt.

Es wurden drei verschiedene dsRNAi-Konstrukte mit Profilinsequenzen aus *Arabidopsis thaliana* hergestellt. Zur Transformation wurden PRF1-dsRNAi, PRF1PRF2PRF3-dsRNAi, das die drei genannten Profileine hintereinander und zusätzlich noch einmal in entgegengesetzter Orientierung enthielt, und PRF5-

dsRNAi- oder Kontroll- Konstrukt	PRF1	PRF5	PRF123	WRKY44	leeres Plasmid	kein Plasmid
Zellen mit Filamenten	>200	140	169	103	30	22
Zellen nur mit diffuser Fluoreszenz	1	43	48	70	155	195

Tabelle 3.3: Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden biolistisch transformiert mit Talin-GFP und den angegebenen Konstrukten. Drei Tage nach der Transformation wurden Zellen mit deutlich sichtbaren Filamenten auf jeweils einem Blatt gezählt.

dsRNAi eingesetzt. Alle enthielten das Intron von AtWRKY44. Außerdem wurden drei verschiedene Kontrolltransformationen durchgeführt, im ersten Fall wurde nur das Reportergen und keine weitere DNA, im zweiten Fall wurde das Plasmid pJawohl8-PRF-dsRNAi und im dritten Fall ein AtWRKY44-dsRNAi-Konstrukt (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Bekir Ülker), ebenfalls mit AtWRKY44-Intron, zusammen mit dem Reportergen kontrtransformiert. Dabei wirkte das Talin-GFP-Konstrukt in doppelter Weise als Reportergen: zum einen markierte es die Zellen, die transient transformiert worden waren, und zum anderen markierte es die Aktinfilamente, deren Verhalten dadurch im Laufe des Experiments beobachtet werden konnte.

Abgetrennte und transformierte Blätter konnten im Fluoreszenzmikroskop ab vier Stunden nach der Transformation betrachtet werden. Dabei wurden in den transformierten Zellen Aktinfilamente durch Talin-GFP grün markiert. Sie waren gut sichtbar und mehr oder weniger hell markiert. Ein typisches Ergebnis (24 h nach der Transformation) zeigt Abb. 3.10. In der Epidermiszelle sind die grün fluoreszierenden Filamente gut zu sehen. In der Fokusebene liegt das membran-nahe Filamentgeflecht entlang der periklinen Zellwand. Ungefähr in der Mitte der Zelle ist der Nukleus zu sehen, der von einem sehr feinen Aktinengeflecht umgeben war und dadurch sichtbar wurde. Die diffus erscheinende Fluoreszenz im oberen hier abgebildeten Teil der Zelle rührt daher, daß dieser Teil der Zelle nicht in der Fokusebene lag und darum nicht so deutlich sichtbar ist.

Zunächst waren keine Unterschiede zwischen mit PRF-dsRNAi transformierten Zellen und mit Kontrollkonstrukten transformierten Zellen erkennbar. Ungefähr drei Tage lang waren in transformierten Zellen in allen Blättern Aktinfilamente grün markiert und gut zu sehen. Unterschiede begannen sich drei bis vier Tage nach der Transformation abzuzeichnen, die Ergebnisse eines Experimentes

sind in Tabelle 3.3 zusammengefaßt.

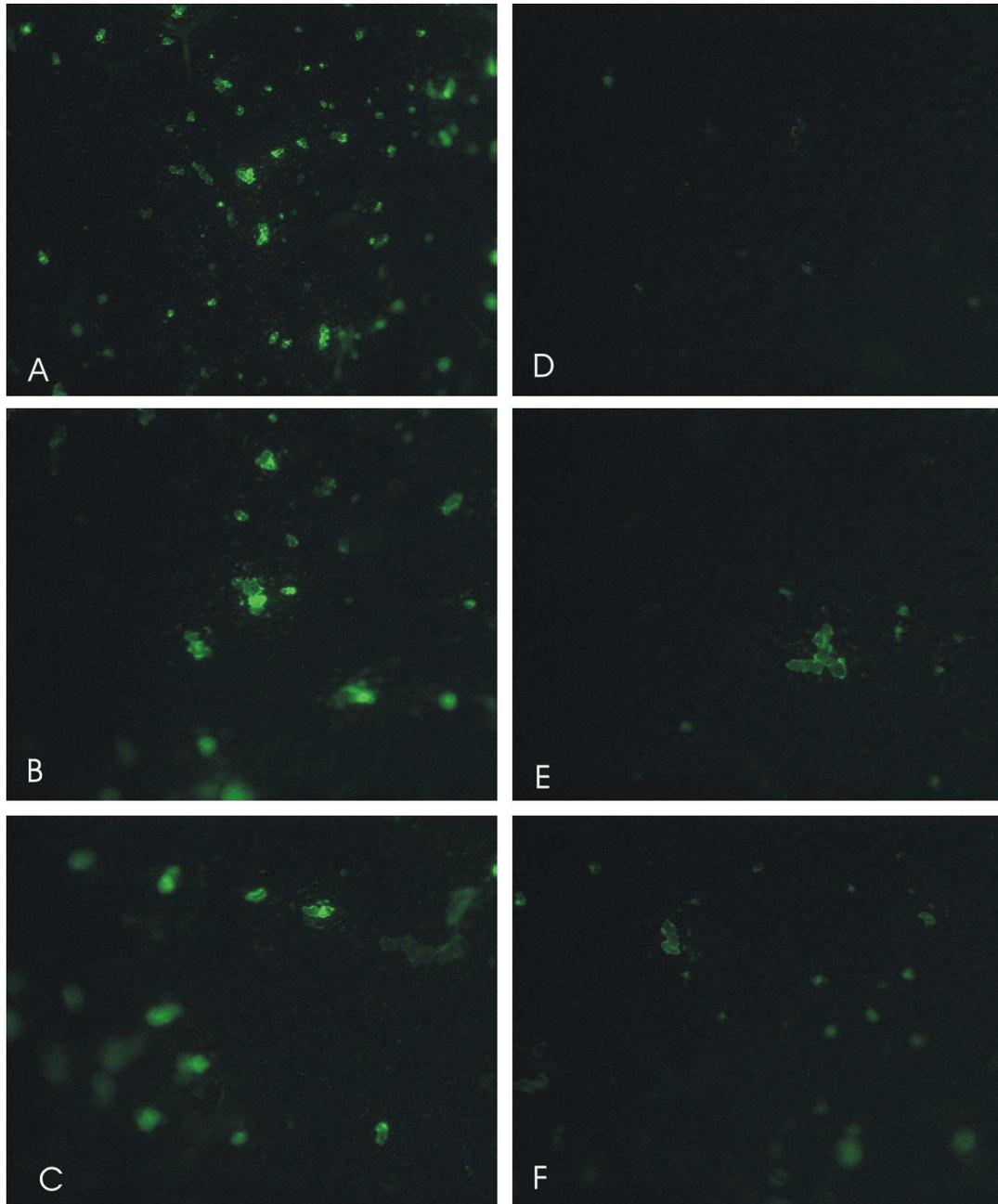


Abb. 3.11: Blätter von *Arabidopsis thaliana* 7 Tage nach Transformation. A-C Profilin-dsRNAi, D-F Kontrollen. DNA für Talin-GFP wurde kotransformiert mit A – PRF123-dsRNAi, B – PRF5-dsRNAi, C – PRF1-dsRNAi, D – keiner weiteren DNA, E – einem leeren dsRNAi-Plasmid oder C – WRKY44-dsRNAi.

Die Filamente in Zellen, die mit Kontroll-Konstrukten transformiert worden waren, waren nach und nach schlechter sichtbar, die Anzahl der Zellen, deren Filamente zu sehen waren, verringerte sich vom dritten Tag nach der Transformation an. Stattdessen erhöhte sich die Anzahl von Zellen, die eine diffuse Fluoreszenz zeigten. Die beobachteten Vorgänge haben wahrscheinlich ihre Ursache im langsamen Absterben der Zellen der abgetrennten Blätter.

In den mit PRF-dsRNAi transformierten Zellen blieben im Gegensatz dazu Filamente auch über Tag vier nach der Transformation erhalten, die Intensität ihrer Fluoreszenz nahm teilweise noch zu. Fluoreszenzmarkierte Filamente waren bis zum siebten Tag nach der Transformation noch gut zu sehen, als die abgetrennten Blätter deutliche Zeichen des Welkens erkennen ließen.

Es scheint, daß die Verhinderung der Profilinexpression zunächst keine Auswirkungen auf die Zellarchitektur hatte. Erst später, vermutlich wenn das endogene Profilin abgebaut worden war, machte es sich für die Zelle bemerkbar, daß kein neues Profilin synthetisiert werden konnte, da PRF-dsRNAi die Synthese von neuem Profilin verhinderte. Die bestehenden Filamente konnten nicht ab- oder umgebaut werden. Das wurde auffällig beim gleichzeitig einsetzenden Absterben der Zellen. In den Kontrollzellen wurden die Filamente (oder zumindest die GFP-Fluoreszenz) abgebaut, in Zellen, die kein Profilin synthetisieren konnten, blieben die Filamente erhalten.

Vergleicht man die hier beschriebenen Ergebnisse des Ausschaltens der Profilinexpression mit denen der Überexpression von Profilin bei der Transformation von Protoplasten mit Profilin-GFP, so liegt die Vermutung nahe, daß Profilin den Abbau von Zytoplasmasträngen bzw. Aktinfilamenten fördert. War zu viel Profilin in einer Zelle vorhanden, brachen die Zytoplasmastränge zusammen. Wurde die Synthese von Profilin aber verhindert, konnten die Filamente nicht abgebaut werden.

3.1.10 Suche nach Mutanten

Um die Funktion der Profileine in der Pflanze und besonders bei der Abwehr von Infektionen besser verstehen zu können, wurde nach Mutanten gesucht, die bei der Expression eines der Profileine einen Defekt zeigen. Dabei sollte der fehlenden Genfunktion ("knock out") ein Funktionsverlust zugeordnet werden.

Zunächst wurde die ZIGIA-Population am Max-Planck-Institut nach einer Pflanzenlinie durchsucht, die in einem der Profileingene eine Insertion trug und somit an der Expression dieses Gens gehindert war. Es wurde eine Linie gefunden, die bei Hybridisierung mit der Profilin-Sonde ein Signal gab. Es handelte sich um die Linie 7G20. Bei genauerer Untersuchung stellte sich aber heraus, daß keines der Profilin-Gene eine Insertion trug und das Signal durch unspezifische Hybridisierung entstanden war.

Als nächstes wurden die Linien der Gabi-KAT-Population, ebenfalls am Max-Planck-Institut, durchsucht. Auch dort ergab sich ein Treffer. In der Linie 55A02

war die T-DNA im Gen von PRF3 zwischen Promoter und Transkriptionsstart inseriert. RT-PCR-Experimente ergaben jedoch, daß auch PRF3 trotz dieser Insertion exprimiert wurde.

In weiteren Populationen wurde nicht gesucht, da eine solche Suche nicht ausreichend erfolgversprechend schien. Sinnvoller erschien das temporäre oder lokale Ausschalten der Expression eines oder mehrerer Profilin-Gene mittels dsRNAi.

Das posttranskriptionale “gene silencing” mittels dsRNAi wurde in den Abschnitten 3.1.7 und 3.1.9 vorgestellt und erste Ergebnisse wurden beschrieben. Auf die Herstellung transgener Pflanzen wird in Abschnitt 3.2.3 nochmal eingegangen.

3.2 Zytologie der Infektion

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit – neben Profilin – lag auf der Untersuchung zytologischer Vorgänge, die bei der Infektion einer Pflanzenzelle mit einem Nichtwirtspathogen ablaufen. Es wurden deskriptive und funktionelle Experimente durchgeführt. Zunächst sollte die intrazelluläre Lokalisation von Profilin bei der Abwehr einer Infektion untersucht werden. Dazu wurde das Modellsystem verwendet, bei dem Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur von Keimlingen von *Phytophthora infestans* infiziert wurden.

3.2.1 Immunlokalisation von Profilin in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum*

Um die subzelluläre Lokalisation von Profilin während der Infektion zu untersuchen, wurden Petersiliezellen aus Suspensionskultur von Keimlingen von *Phytophthora infestans* infiziert und anschließend fixiert. Danach wurden sie mit Immunsereum gegen Profilin (siehe Abschnitt 3.1.1) inkubiert. Abb. 3.12 zeigt das Ergebnis einer immunzytologischen Färbung von Profilin in einem Mikrokallus. Eine Zelle des Mikrokallus ist infiziert, die Infektionsstelle ist durch einen Pfeil markiert. An der Stelle, an der die Hyphe in die Zelle eindringt, ist im Fluoreszenzbild eine ringförmige Struktur zu sehen. In den Zellen, deren Zellkerne in der Fokusebene liegen, ist auch eine Färbung im Nukleus zu erkennen. Darüber hinaus sind viele weitere Strukturen in den Zellen, vor allem an der Peripherie entlang der Plasmamembran, markiert.

Zur Kontrolle wurde ein infizierter Mikrokallus mit Präimmunsereum inkubiert (Abb. 3.12, C und D). Auch das Präimmunsereum reagiert mit mehreren Strukturen in den Zellen, die nicht genau bezeichnet werden können. Diese unspezifische Färbung durch das Präimmunsereum ist eine mögliche Erklärung für die starke Reaktion mehrerer zellulärer Strukturen mit dem Antiserum gegen Profilin.

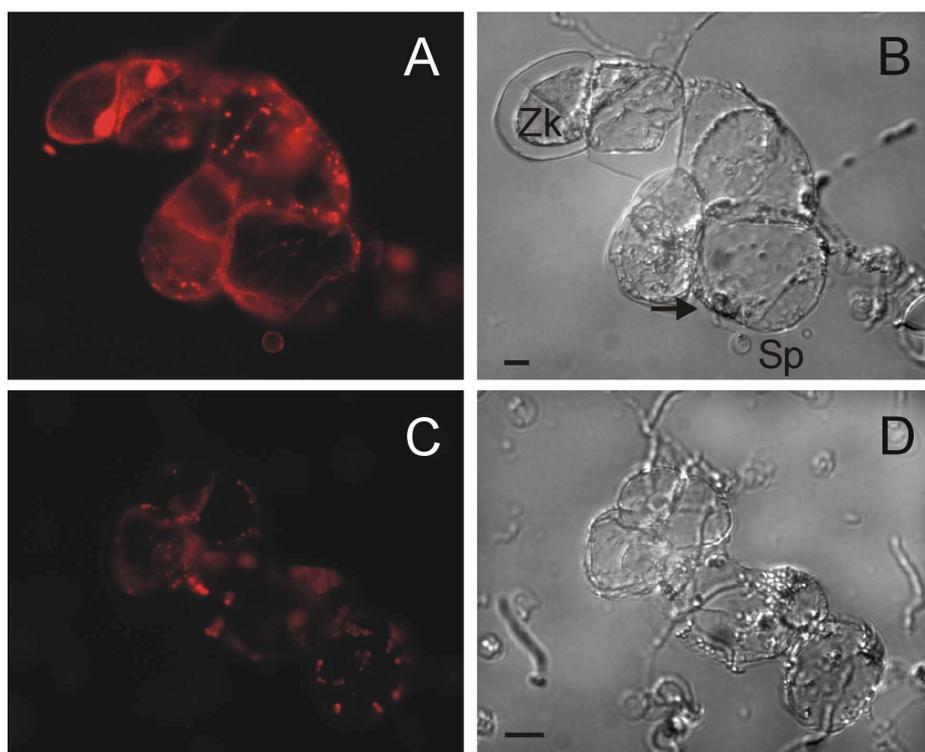


Abb. 3.12: Infizierte und fixierte Mikrocalli von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit polyklonalem Antiserum gegen Profilin (A und B) oder mit Präimmunsereum (C und D). A und C – Fluoreszenzaufnahmen, B und D – zugehörige Durchlichtaufnahmen. Sp – Spore, Zk – Zellkern, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 10 μm .

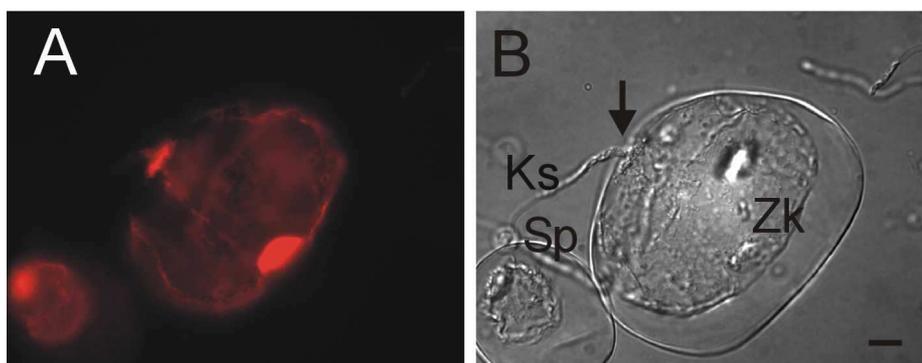


Abb. 3.13: Infizierte und fixierte Zelle von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin. A – Fluoreszenzaufnahme, B – Durchlichtaufnahme. Ks – Keimschlauch, Sp – Spore, Zk – Zellkern, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 10 μm .

Abb. 3.12 zeigt ein Profilin-Signal an der Infektionsstelle, was vermuten läßt, daß Profilin tatsächlich an der Infektionsstelle lokalisiert ist. Dieses Experiment zeigt aber gleichzeitig die Sensitivität der immunzytochemischen Färbung gegenüber unspezifischer Antikörperreaktion. Aus diesem Grunde wurde für weitere Experimente affinitätsgereinigtes Antiserum gegen Profilin eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.1).

Abb. 3.13 zeigt eine Zelle, die durch *Phytophthora infestans* infiziert wird. Sie wurde mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin inkubiert. Das Fluoreszenzbild zeigt eine starke Färbung des Zellkerns. Ebenfalls deutlich markiert ist die Stelle, an der die Hyphe in die Zelle einzudringen versucht. Außerdem ist ein Antikörpersignal entlang der Plasmamembran zu sehen.

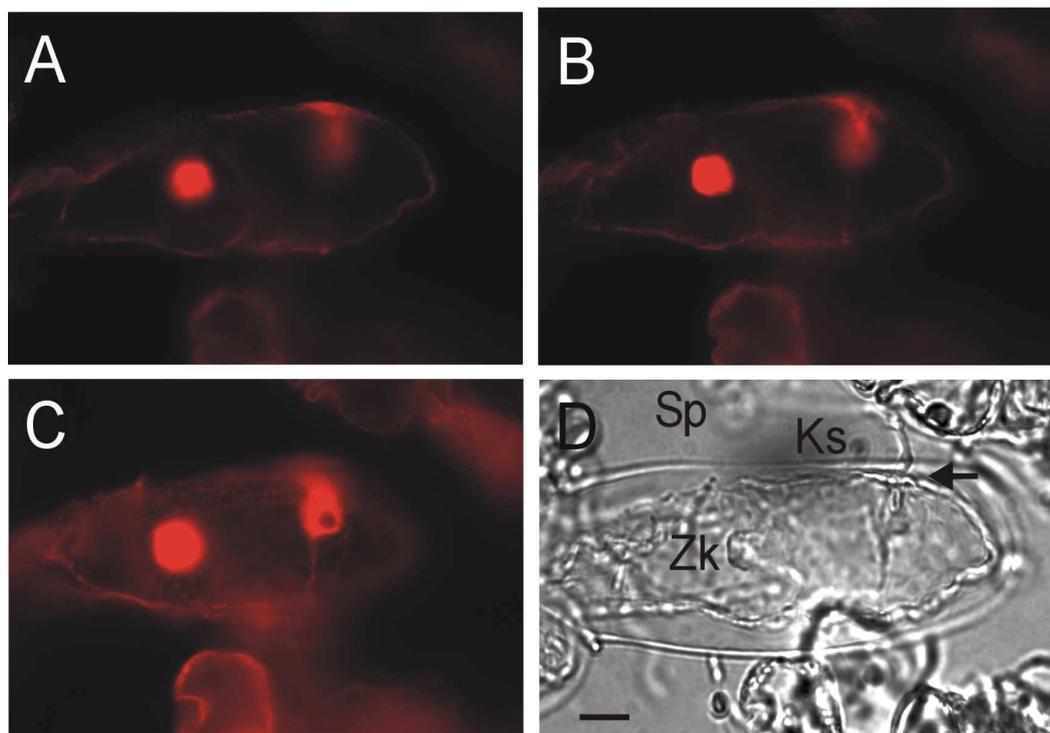


Abb. 3.14: Infizierte und fixierte Zelle von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin. A-C – Fluoreszenzaufnahmen in verschiedenen Fokusebenen, D – Durchlichtaufnahme. Ks – Keimschlauch, Sp – Spore, Zk – Zellkern, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 15 μm .

Auch Abb. 3.14 zeigt eine infizierte *Petroselinum-crispum*-Zelle, die mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin inkubiert worden war. Die Fluores-

zenaufnahmen in drei Fokusebenen zeigen Antikörpersignale entlang der Peripherie der Zelle und im Zellkern und, besonders eindrücklich, an der Infektionsstelle. Wie im Durchlichtbild zu sehen ist, zeigt die Infektionshyphe von *Phytophthora infestans* schon ein gewisses intrazelluläres Wachstum, entlang dieser Hyphe ist die Akkumulation von Profilin zu sehen.

Bei den in Abb. 3.13 und 3.14 verwendeten Antikörpern handelt es sich um affinitätsgereinigtes Antiserum. Zur Kontrolle der Spezifität der Ergebnisse wurden mehrere Experimente durchgeführt. Infizierte und fixierte Zellen wurden ohne primären Antikörper und nur mit sekundärem Antikörper inkubiert. Ein Ergebnis eines solchen Experimentes zeigt Abb. 3.15. Im Durchlichtbild ist ein Mikrokallos zu sehen, in dem eine Zelle durch eine Hyphe infiziert ist. Im Fluoreszenzbild ist keinerlei Signal zu sehen, woraus man schließen kann, daß die in Abb. 3.13 und 3.14 gezeigte Fluoreszenz tatsächlich von einer spezifischen Reaktion von Antikörpern mit Profilin herrührt.

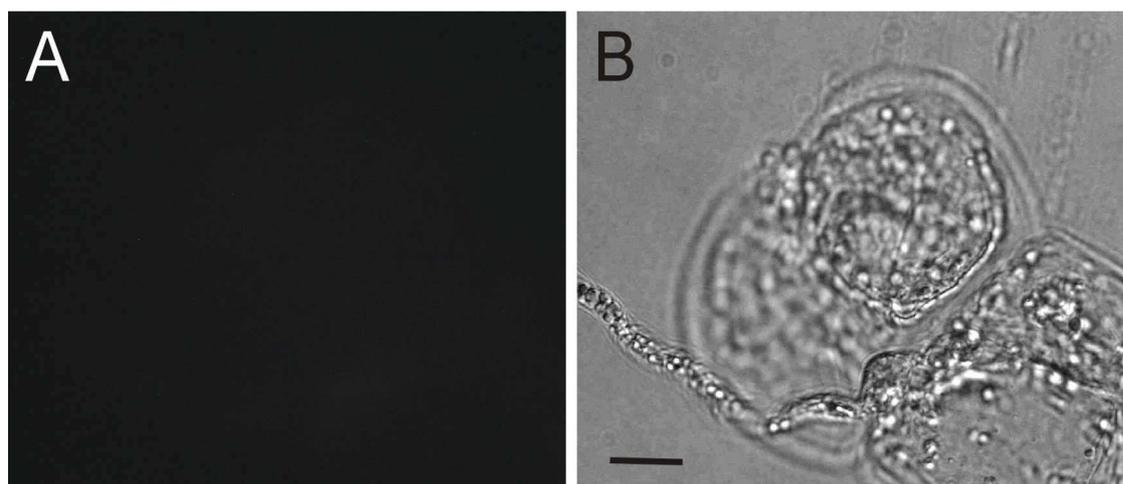


Abb. 3.15: Infizierter und fixierter Mikrokallos von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation nur mit sekundärem, CY3-gekoppelten Antikörper. A – Fluoreszenzaufnahme, B – Durchlichtaufnahme. Maßstab 10 μm .

Profilin ist also an der Infektionsstelle lokalisiert. Ein deutliches Signal auch im Zellkern ist in allen Fällen zu sehen. Ähnliche Ergebnisse sind schon von mehreren Autoren beschrieben worden [18, 72]. Ebenfalls in allen Fällen zu sehen ist eine leichte Färbung der Plasmamembran. Es gibt mehrere Hinweise auf die Membranlokalisierung von Profilin [36, 158].

Um die Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle zu überprüfen bzw. Artefakte auszuschließen, wurden noch weitere Kontrollen durchgeführt. Infizierte Zellen wurden mit affinitätsgereinigtem Serum gegen WRKY1 aus *Petroselinum*

crispum inkubiert. Dabei ergab sich eine diffuse Färbung, insbesondere der Kernregion. Das Antiserum ergab aber kein Signal an der Peripherie der Zelle, an der Membran und insbesondere nicht an der Infektionsstelle. Dieses Ergebnis ist hier nicht dargestellt.

Ein weiteres Experiment ergab einen noch deutlicheren Hinweis auf die Spezifität des in Abb. 3.12 bis 3.14 dargestellten Ergebnisses. Die Spezifität des Antiserums wurde zunächst im Westernblot durch Konkurrenz untersucht. Dabei wurden bei der Inkubation der Membran mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin 1 bis 10 μg heterolog exprimierten Profilins zugegeben. Das führte zum Verschwinden der Kreuzreaktion des Antiserums mit der Bande aus dem Petersilienextrakt (Ergebnis hier nicht dargestellt).

Dann wurde die Spezifität des Antikörpers bei der immunzytologischen Färbung auf gleiche Weise getestet. Infizierte Zellen wurden fixiert und mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin inkubiert. Dabei wurden 1 bis 10 μg heterolog exprimierten Profilins zugegeben. Diese Zugabe ließ die Färbung an der Infektionsstelle und der Plasmamembran ebenso verschwinden wie die des Zellkerns. Somit ist gezeigt, daß es sich bei dem Ergebnis der Immunlokalisation von Profilin um eine Profilin-spezifische Reaktion handelt und Artefakte nahezu ausgeschlossen sind.

Die Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur legt die Vermutung nahe, daß Profilin eine wichtige Rolle bei der erfolgreichen Abwehr von Infektionen spielt. Diese Rolle sollte weiter aufgeklärt werden. Funktionelle Untersuchungen sollten in einem anderen Modellsystem, nämlich in *Arabidopsis thaliana*, durchgeführt werden, weil dort umfangreichere genetische Information zur Verfügung steht und die Transformation von Pflanzen leicht möglich ist.

3.2.2 Expression der Profileine in *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Blumeria graminis* f. sp. hordei

Profilin war in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum* an der Infektionsstelle gefunden worden. Die Frage, ob dieser Lokalisation tatsächlich eine Funktion entspricht, konnte noch nicht beantwortet werden. Dieser Frage sollte im folgenden weiter nachgegangen werden. Als erstes sollte untersucht werden, ob Profileine bei der Infektion einer Pflanze mit einem Nichtwirtpathogen stärker exprimiert werden. Da in *Arabidopsis thaliana* die Profilingene für eine Untersuchung im Northern Blot zu ähnlich sind, wurde hier die Methode der RT-PCR gewählt, um differentielle Expression zu untersuchen. Für die PCR wurden Primer gewählt, die für jedes der fünf untersuchten Profileine aus *Arabidopsis thaliana* spezifisch waren, die nämlich zu Abschnitten der 3'- und 5'-nichttranslatierten Bereiche homolog waren.

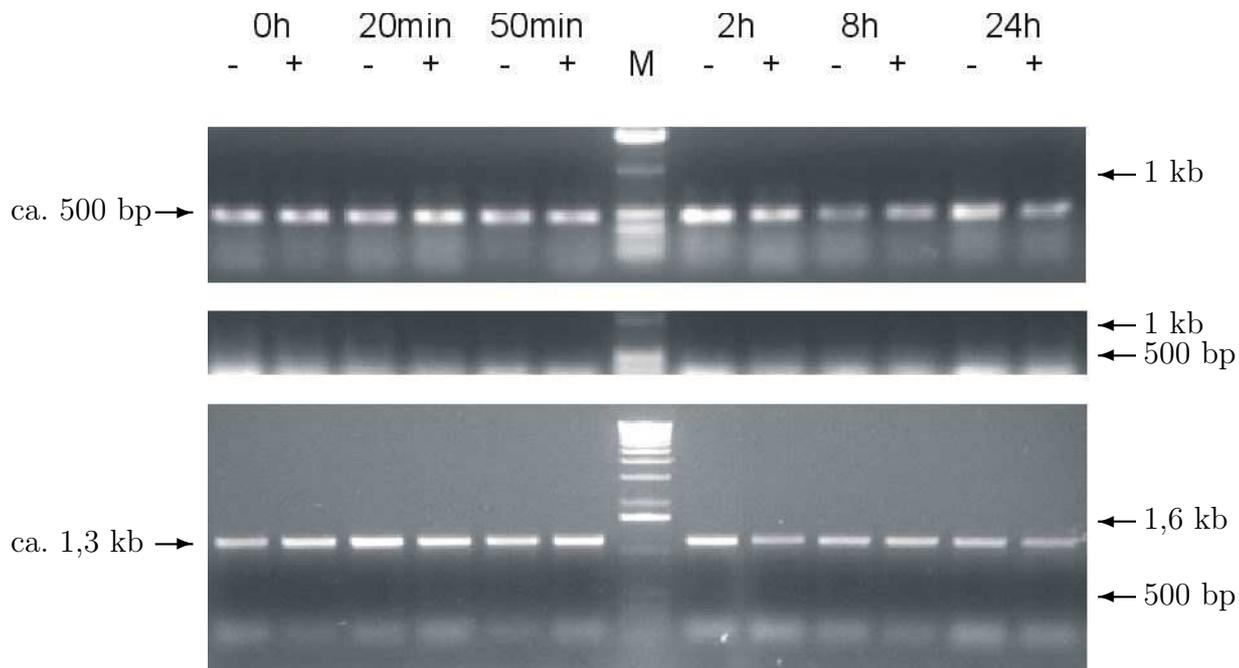


Abb. 3.16: RT-PCR. Blätter von *Arabidopsis thaliana* wurden mit K1 infiziert, zu den angegebenen Zeitpunkten wurde mRNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben. Für die anschließende PCR wurden Primer gegen PRF2 (oben), PRF5 (Mitte) und AtACT2 (unten) verwendet. + – infizierte Blätter, - – nicht infizierte Blätter (Kontrollen).

Arabidopsis-Pflanzen wurden mit Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. hordei infiziert und Blätter von infizierten und nicht infizierten Pflanzen zu verschiedenen Zeitpunkten abgetrennt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Daraus wurde RNA isoliert, die in cDNA umgeschrieben wurde. Diese diente als Matrix für die PCR. Die Zahl der Amplifikationszyklen wurde zwischen 20 und 30 variiert. Mehrfache Wiederholungen des Experiments lieferten gleiche Ergebnisse. Eine differentielle Expression der Profiline in *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Blumeria graminis* f. sp. hordei konnte nicht gefunden werden. Abb. 3.16 zeigt ein typisches Ergebnis der RT-PCR für die Profiline PRF2 und PRF5, die stellvertretend ausgewählt wurden. Ebenso wie PRF2 verändern PRF1 und PRF3 ihr Expressionsniveau nicht durch Infektion, PRF4 ist genauso wenig wie PRF5 in Blättern von *Arabidopsis thaliana* exprimiert, daran ändert auch die Infektion nichts. Zur Kontrolle wurde AtACT2 amplifiziert [3], das ein relativ konstantes Expressionsniveau zeigt.

Die hier dargestellten Daten stehen nicht notwendig im Widerspruch zu den Ergebnissen der Immunlokalisation von Profilin in *Petroselinum crispum*. Wahrscheinlicher ist, daß, sollte Profilin auch in *Arabidopsis thaliana* an der Infekti-

onsstelle zu finden sein, das ohnehin vorhandene zelluläre Profilin innerhalb der Zelle relokalisiert, ohne daß neues Profilin zusätzlich synthetisiert werden muß.

3.2.3 Profilin-dsRNAi in *Arabidopsis thaliana* bei Infektion

Um die Funktion der Profiline in der Pflanze und besonders bei der Abwehr von Infektionen besser verstehen zu können, sollte der zelluläre Profilin Gehalt reduziert, die Biosynthese von Profilin möglichst ausgeschaltet werden. Dafür wurde nach Mutanten gesucht (siehe Abschnitt 3.1.10). Außerdem wurden Konstrukte entwickelt, die bei Transformation in Pflanzen bzw. Zellen die Synthese von Profilin blockieren (Abschnitte 3.1.7 und 3.1.9).

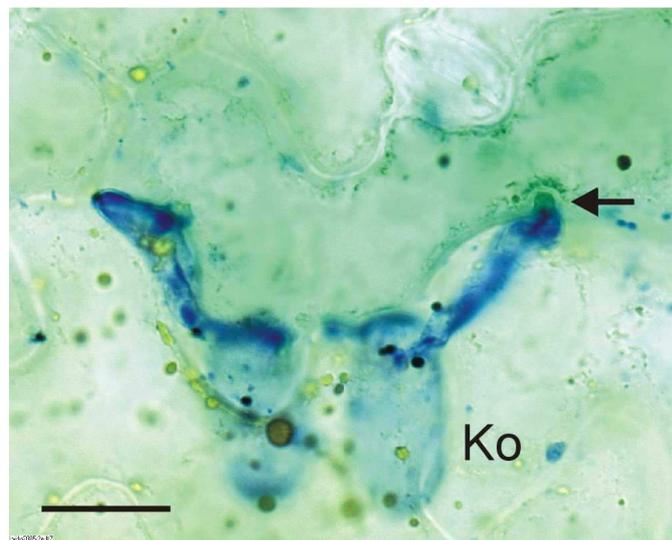


Abb. 3.17: Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana*, transformiert mit PRF-dsRNAi und GUS, infiziert mit Konidiosporen von *Blumeria graminis*. Ko – Konidiospore, Infektiosstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 20 μ m.

Konstrukte zum transienten Ausschalten von Expression und Neusynthese von Profilin in *Arabidopsis thaliana* wurden in Abschnitt 3.1.7 beschrieben. Es sollte ihr Einfluß auf das Infektionsverhalten des Nichtwirtspathogens *Blumeria graminis* f. sp. hordei in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Dazu wurden wieder Kotransformationsexperimente durchgeführt. Als Markergen für die erfolgreiche Transformation einer Zelle wurde entweder GFP, Talin-GFP (siehe Abschnitt 3.1.9) oder GUS (β -Glukuronidase) verwendet. Die Markierung transformierter Zellen mit GUS war darum hilfreich, weil die GUS-Färbung, im Gegensatz zu GFP, der Färbung der pilzlichen Strukturen standhielt und sich außerdem die Beobachtung im Mikroskop zeitlich von Transformation und Infektion entkoppeln ließ.

Jeweils ein Profilin-dsRNAi-Konstrukt und ein Markergen wurden mittels biolistischer Transformation in Zellen von abgetrennten Blättern von *Arabidopsis thaliana* gebracht. Die transformierten Blätter wurden nach unterschiedlichen Zeiten (4 h bis 96 h) mit Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Stamm K1) infiziert und wiederum nach unterschiedlichen Zeiten (24 h bis 72 h) entweder direkt im Mikroskop betrachtet oder mit dem Substrat für GUS infiltriert, entsprechend dem Färbeprotokoll für GUS weiterbehandelt, entfärbt und dann im Mikroskop betrachtet.

Betrachtet werden sollten solche Zellen, die sowohl mit PRF-dsRNAi (und einem Reportergen) transformiert worden, als auch durch eine Konidiospore von *Blumeria graminis* f. sp. hordei infiziert worden waren ("single cell assay"). Abb. 3.17 zeigt eine transformierte Epidermiszelle, die durch die Aktivität der β -Glukuronidase grünlich-blau gefärbt ist. Ebenfalls zu sehen sind zwei Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. hordei, die durch Coomassie blau gefärbt sind. Beide haben einen primären und einen sekundären Keimschlauch entwickelt, letzterer wird auch Appressorienkeimschlauch genannt. Er zeigt bei beiden Zellen eine leichte Schwellung und eine Krümmung am distalen Ende ("appressorial hook"). Von diesem wird der Penetrationskeil gebildet, der die pflanzliche Zellwand durchdringt. Innerhalb der pflanzlichen Zellwand wird ein Haustorium gebildet. Auch in Nichtwirtsinteraktionen tritt Haustorienbildung in bis zu 10 % der Fälle auf [78]. Dieser Wert konnte durch Transformation mit PRF-dsRNAi erhöht werden. Leider lieferten diese Versuche keinerlei verlässliche Ergebnisse, da es nur sehr selten zu einer Koinzidenz von Transformation und versuchter Infektion ein und derselben Zelle kam.

Ein wahrscheinlich besseres Verfahren ist die Erzeugung transgener Pflanzen, die mit einem in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen Konstrukt stabil transformiert sind. Da in der Literatur keine Profilin-"knock-out"-Mutante beschrieben ist (obwohl sich mehrere Arbeitsgruppen mit Profilin in *Arabidopsis thaliana* beschäftigen), bei keiner der Suchen Profilin-knock-out-Mutanten gefunden wurden und die einzige beschriebene Profilin-Antisense-Pflanze auch Profilin exprimiert (wenn auch auf reduziertem Niveau [149]), ist zu vermuten, daß Pflanzen, die (eines der) Profile nicht exprimieren können, nicht lebensfähig sind. Deshalb erscheint es wenig sinnvoll, Pflanzen herstellen zu wollen, die Profilin nicht exprimieren können, eine Alternative wäre das zeitweilige Ausschalten der Profilinexpression in ausgewachsenen Pflanzen. Die Herstellung und Testung solcher Pflanzen ist gerade im Gange.

Dazu wurde außer den in Abschnitt 3.1.7 beschriebenen PRF-dsRNAi-Konstrukten ein System ähnlich dem von von Zhou et al. beschriebenen Östradiol-induzierbaren XVE-System verwendet [205]. Ein artifizieller Transkriptionsfaktor wird, durch einen starken Promotor getrieben, konstitutiv exprimiert. Dieser Transkriptionsfaktor enthält eine durch das Hormon Östradiol regulierbare Domäne und eine die Transkription aktivierende Domäne. Wird eine diese Transkriptionsfaktor exprimierende Zelle mit Östradiol behandelt, bindet

dieser Transkriptionsfaktor an einen ebenfalls artifiziellen Promotor und induziert die Expression des dahinter liegenden Gens [205]. Jedes der PRF-dsRNAi-Konstrukte wurde hinter den durch den artifiziellen Transkriptionsfaktor induzierbaren Promotor kloniert und zusammen mit dem Gen für diesen Transkriptionsfaktor in *Arabidopsis*-Pflanzen transformiert. Diese Pflanzen sollen normal wachsen können, bis sie das adulte Stadium erreichen. Dann kann durch Gabe von Östradiol die Expression des PRF-dsRNAi-Transgens induziert werden und so in der ausgewachsenen Pflanze ein Absinken des Profilin-Niveaus, möglichst bis zum völligen Ausschalten der Expression, erreicht werden. Zunächst muß überprüft werden, ob die Induktion des PRF-dsRNAi-Transgens tatsächlich die erwünschte Wirkung, die Ausschaltung der Profilinexpression und die Reduktion des pflanzlichen Profilin gehaltes, zur Folge hat. Diese Tests sind gerade in Arbeit.

3.2.4 Immunlokalisation von Aktinfilamenten in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum*

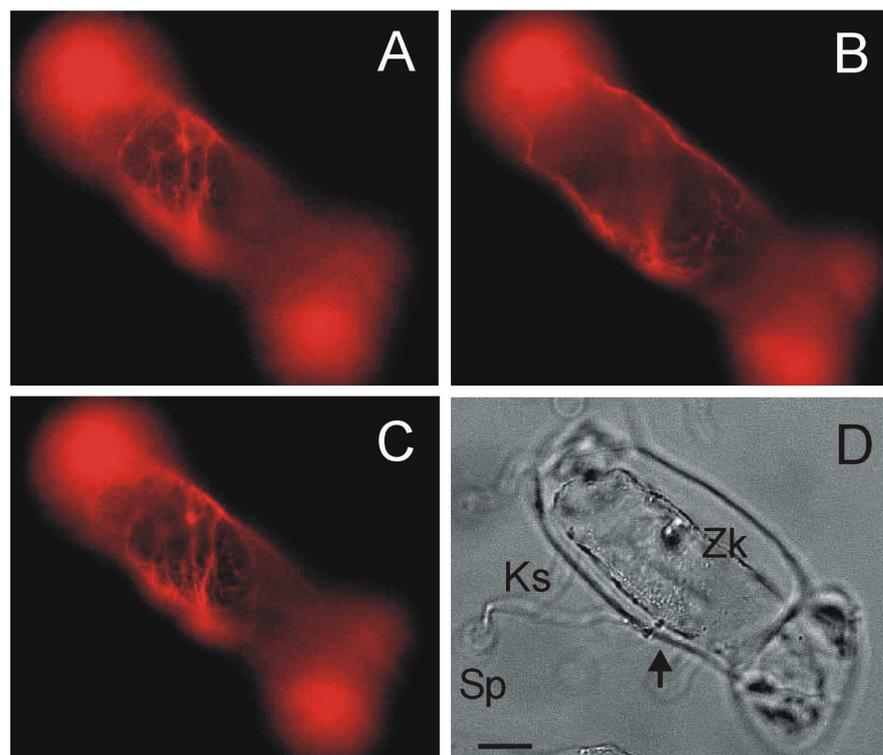


Abb. 3.18: Infizierte und fixierte Zelle von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit monoklonalem Antikörper gegen Aktin. Fluoreszenzaufnahmen in drei verschiedenen Fokus-Ebenen (A-C) und Durchlichtbild (D). Sp – Spore, Ks – Keimschlauch, Zk – Zellkern, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 15 μm .

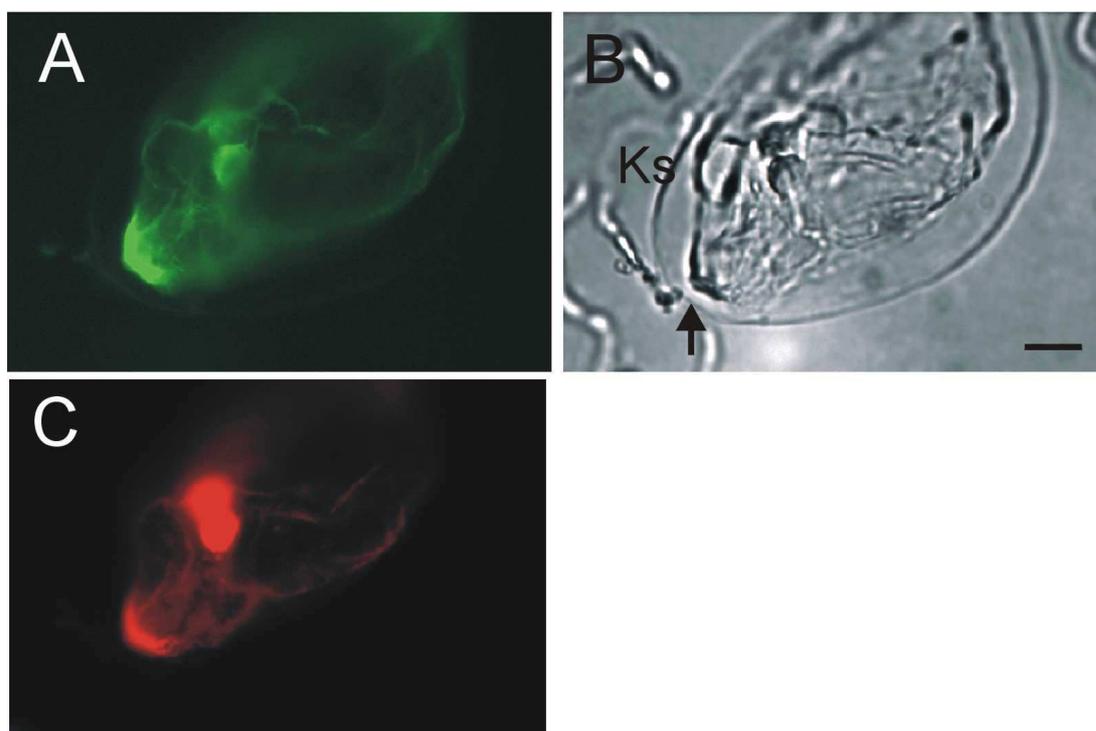


Abb. 3.19: Infizierte und fixierte Zelle von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit A – monoklonalem Antikörper gegen Aktin und C – affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin. A und C – Fluoreszenzaufnahmen, B – Durchlichtbild. Ks – Keimschlauch, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 15 μm .

Die Ausrichtung von Zytoplasmasträngen zur Infektionsstelle wurde schon für mehrere Pflanzenarten beschrieben [160]. Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur wurden mit Sporen von *Phytophthora infestans* infiziert und dann fixiert. Zum Nachweis des zellulären Aktins wurden monoklonale Antikörper gegen Aktin verwendet (Stamm C4, ICN, Eschwege). Die so behandelten Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Abb. 3.18 zeigt eine infizierte Zelle. Außer der Aufnahme im Durchlicht wurden Fluoreszenzaufnahmen in drei verschiedenen Fokusebenen gemacht. Die zellulären Aktinfilamente sind rot markiert. Sie sind in jeder Fokusebene zu sehen. Gut zu sehen ist die Ausrichtung der Filamente zur Infektionsstelle, der Stelle, an der der Keimschlauch des Pilzes in die Zelle eintritt.

Mittels Antikörpern gegen Aktin wurde so nachgewiesen, daß auch Zellen von *Petroselinum crispum* auf Infektion mit einem pilzlichen Pathogen mit der Umorientierung ihrer Aktinfilamente zu der Stelle reagieren, an der das pilzliche Pathogen in die Zelle einzudringen versucht.

Abb. 3.19 zeigt eine von *Phytophthora infestans* infizierte und fixierte Zelle.

Sie wurde mit monoklonalem Antikörper gegen Aktin und mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen Profilin inkubiert. Die Aktinfilamente sind grün markiert (3.19 A). Gut zu sehen ist in diesem Bild die Ausbildung der sogenannten Aktinkappe, die wahrscheinlich durch eine Ansammlung feiner Aktinfilamente gebildet wird. Ähnliche Aktinkappen sind an der Spitze wachsender Wurzelhaare zu finden [6]. Ihre Existenz wurde auch schon in infizierten Zellen gezeigt [50]. Abb. 3.19 C zeigt die Verteilung von Profilin in derselben Zelle. Außer im Nukleus akkumuliert Profilin an der Infektionsstelle, nimmt dabei aber ein kleineres Gebiet ein als die Aktinkappe. Außer der aus verschiedenen Pflanze-Pathogen-Systemen bekannten Ausrichtung der Aktinfilamente zur Infektionsstelle und der Bildung einer Aktinkappe wurde in dieser Arbeit die Akkumulation des Aktin-bindenden Proteins Profilin an der Infektionsstelle gezeigt. Bekannt ist, daß Profilin in Zellen, z.B. in Fibroblasten, mit dynamischen Aktinstrukturen kolokalisiert [158].

3.2.5 Aktinfilamente in *Arabidopsis thaliana* bei Infektion

Im weiteren sollte auch für das zweite Modellsystem, für *Arabidopsis thaliana*, untersucht werden, welche Veränderungen am Aktinskelett sich bei Interaktion mit dem Nichtwirtspathogen *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Stamm K1) beobachten lassen.

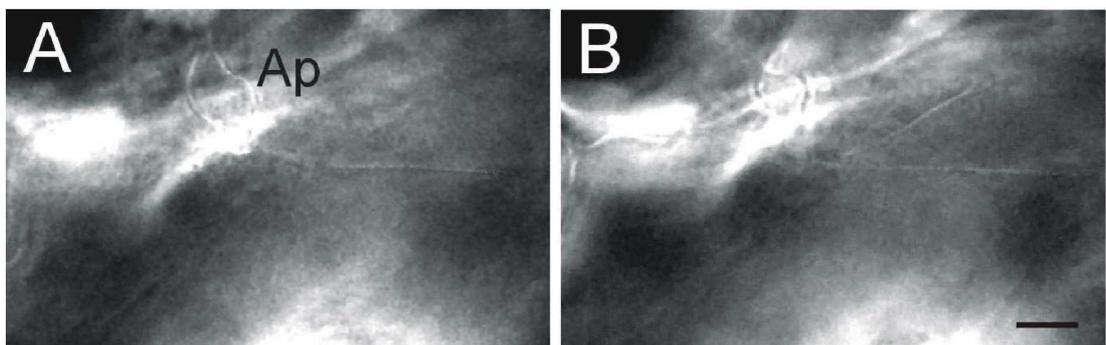


Abb. 3.20: *Arabidopsis thaliana gl1*, infiziert mit Sporen von K1, Fluoreszenzaufnahmen in zwei verschiedenen Fokus-Ebenen. Ap – Appressorium, Maßstab 5 μm .

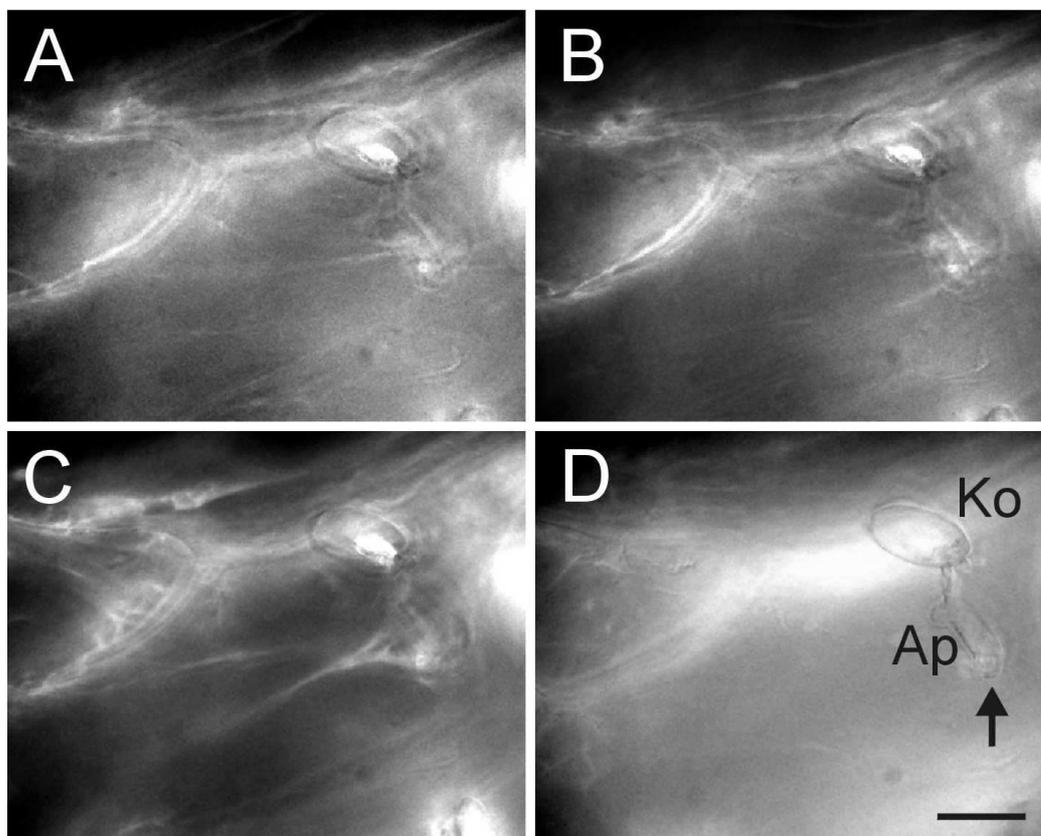


Abb. 3.21: *Arabidopsis thaliana pen2*, infiziert mit Sporen von K1, Fluoreszenz-Aufnahmen in vier verschiedenen Fokus-Ebenen. Ap – Appressorium, Ko – Konidiospore, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 20 μm .

Bislang war über das Verhalten von Aktinfilamenten in *Arabidopsis thaliana* bei Pathogenbefall nichts bekannt. Um die Veränderungen am Zytoskelett studieren zu können, sollte Aktin in *Arabidopsis thaliana* mit GFP markiert werden. Da Vorversuche Schwierigkeiten beim Markieren von Aktin mit GFP ergeben hatten, sollte nicht Aktin selbst, sondern die Aktin-bindende Domäne des Aktin-bindenden Proteins Talin mit GFP markiert werden (siehe Abschnitt 3.1.9). Um Infektionsexperimente besser durchführen zu können, wurde außerdem statt des Wildtyps eine Mutante verwendet, die keine Blatthaare ausbildet, nämlich *gl1* (GLABROUS1) im Col-0-Hintergrund [56]. Außer *gl1* wurde die remutagenisierte Linie *pen2* (im *gl1*-Hintergrund) verwendet, die ein abnormes Verhalten bei Pathogenbefall zeigt (V. Lipka, unveröffentlicht) und auch keine Blatthaare besitzt, um Vergleiche zwischen Wildtyp und Mutante anstellen zu können. Pflanzen beider Linien wurden durch Dr. Volker Lipka mit einem 35S::GFP-Talin-Konstrukt transformiert (nach [96]) und für die Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zunächst mußten aus den zur Verfügung gestellten Linien solche ausgewählt werden, in denen Aktinfilamente gut beobachtbar durch GFP markiert waren. Das erfolgte an abgetrennten Blättern im Fluoreszenzmikroskop (Olympus, Hamburg) mit Hilfe der Software TILLVision (TillPhotonics, Gräfelfing). Es wurden die Linien *gl1-1*, *pen2-2* und *pen2-24* für weitere Untersuchungen ausgewählt.

Pflanzen der ausgewählten Linien wurden mit Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Stamm K1) und, in Ausnahmefällen, auch mit Sporen von *Phytophthora infestans* (Stamm Pi1) infiziert.

Nach verschiedenen Zeiten wurden Blätter abgetrennt und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Das beginnende Auswachsen des primären Keimschlauchs aus einer Konidiospore von *Blumeria graminis* konnte bereits ein bis zwei Stunden nach der Infektion beobachtet werden. Der primäre Keimschlauch dient der Anhaftung der Spore auf dem befallenen Blatt. Er wuchs nur bis zu einer relativ geringen Länge aus und stellte dann sein Wachstum ein. Bald begann auch der sekundäre Keimschlauch auszuwachsen, der das eigentliche Infektionsorgan von *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* darstellt. Bereits 7 hpi waren Keimschläuche zu beobachten, die einen Appressorienlappen ausbildeten und mittels Penetrationsorgan in die darunterliegende Pflanzenzelle einzudringen versuchten. Sobald der sekundäre Keimschlauch das Appressorium bildete, reagierte die betroffene Zelle. Es konnte das Ausrichten der zellulären Aktinfilamente zur der Stelle, an der der Pilz das Appressorium bildete, beobachtet werden. Entlang dieser Aktinfilamente war eine zur Infektionsstelle gerichtete Zytoplasmaströmung zu beobachten.

Damit wurde gezeigt, daß auch *Arabidopsis thaliana* auf die Infektionsversuche eines Nichtwirtpathogen zunächst durch die Reorientierung der Zytoplasmastränge bzw. mit der Reorientierung der Aktinfilamente zur Infektionsstelle reagiert. Diese Befunde sind inzwischen von Takemoto et al. bestätigt worden [181].

Außerdem ist bemerkenswert, daß auch in einigen Fällen beobachtet werden konnte, daß Zellen von *Arabidopsis thaliana* auf das Anhaften des pilzlichen Pathogens durch seinen primären Keimschlauch reagierten, indem die zellulären Aktinfilamente zu der Stelle ausgerichtet wurden, an der der primäre Keimschlauch mit der Zelloberfläche Kontakt hatte. Es gibt aber nicht genügend Beobachtungsergebnisse, um eine wissenschaftliche Aussage statistisch untermauern zu können.

Hervorzuheben ist an dieser Stelle unbedingt, daß, entgegen anfänglichen Vermutungen, kein signifikanter Unterschied zwischen *gl1*, hier als Wildtyp verwendet, und der anfälligeren Mutante *pen2* festgestellt werden konnte. Die Neufokussierung der Aktinfilamente zur Infektionsstelle wurde in Pflanzen beider Linien in nahezu allen betrachteten Zellen gefunden.

3.2.6 PIP₂ bei der Infektionsabwehr? – Antikörpertest in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana*

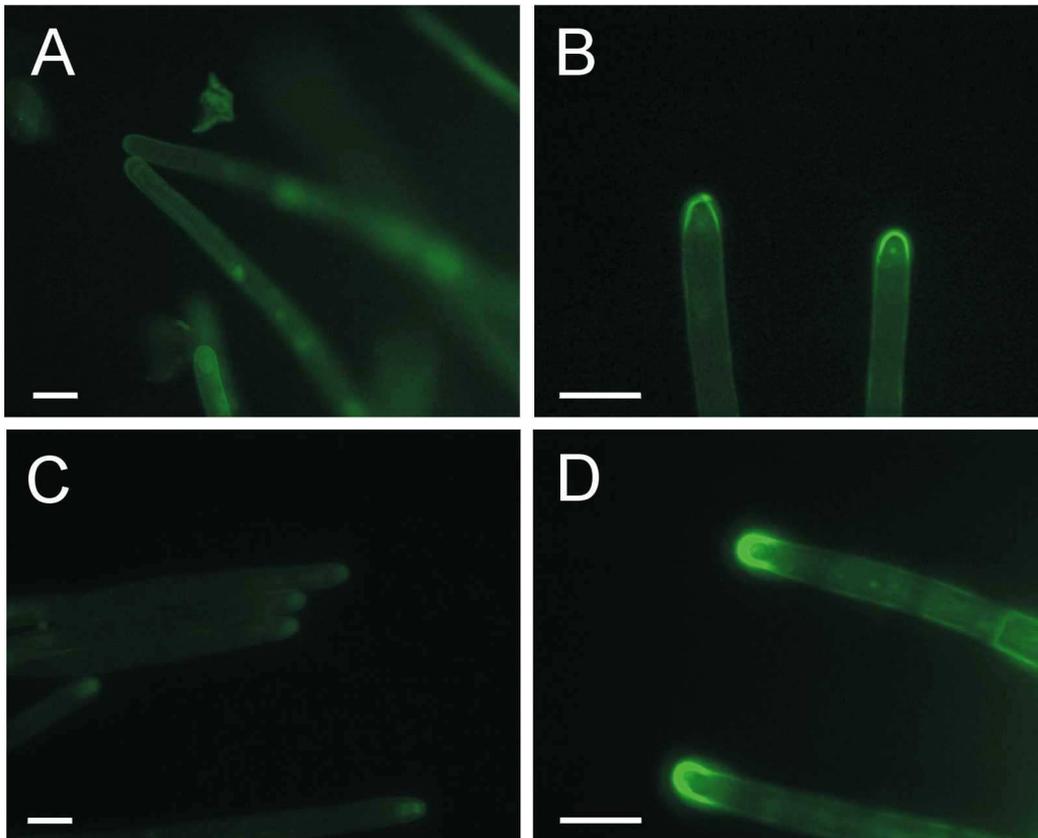


Abb. 3.22: Wurzelhaare von *Arabidopsis thaliana*, monoklonaler Antikörper gegen PIP₂ (A, B) oder kein primärer Antikörper (C, D), Fluoreszenzaufnahmen, Maßstab 20 μm .

Vergleicht man die Vorgänge, die bei der Abwehr der Infektion durch ein pilzliches Pathogen ablaufen, mit solchen beim Spitzenwachstum beispielsweise in Pollenschläuchen oder Wurzelhaaren, so ergeben sich erstaunliche Parallelen. In wachsenden Pollenschläuchen und Wurzelhaaren richten sich die Aktinfilamente zur Spitze des wachsenden Pollenschlauches, also zum Wachstumspol aus. Ebenfalls am Wachstumspol zu finden ist eine relativ hohe lokale Konzentration von Profilin [6, 18]. In Zellen von *Petroselinum crispum*, die mit Pi1 infiziert wurden, richteten sich die Aktinfilamente zur Infektionsstelle aus, wo auch eine hohe Profilinkonzentration nachgewiesen werden konnte (siehe Abschnitte 3.2.1 und 3.2.4). Außerdem findet man in Wurzelhaaren am Wachstumspol eine erhöhte Konzentration von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) [18]. Es sollte nun un-

tersucht werden, ob sich auch an der Infektionsstelle in infizierten Pflanzen bzw. Zellen eine erhöhte Konzentration von PIP_2 nachweisen läßt.

Antikörper gegen PIP_2 wurden kommerziell erworben (Echelon Biosciences, Salt Lake City, UT, USA). Damit sollte PIP_2 in infizierten Zellen lokalisiert werden.

Zunächst sollte PIP_2 in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* lokalisiert werden, um den Antikörper zu testen und die aus der Literatur bekannten Fixations- und Inkubationsprotokolle für ihre Anwendung an infizierten Kulturzellen und für diesen Antikörper zu optimieren [18, 124].

Abb. 3.22 zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Wurzelhaaren, die mit Antikörpern gegen PIP_2 behandelt worden waren. Es scheint, daß der Antikörper gegen PIP_2 die Membran an der Spitze des Wurzelhaares markiert. Eine solche Lokalisation von PIP_2 wurde auch von Braun et al. beschrieben [18]. Leider ist auch in einigen Kontrollen, in denen kein primärer Antikörper eingesetzt wurde, eine starke Autofluoreszenz an der Spitze der Wurzelhaare zu erkennen. Eine spezifische Färbung kann nicht von einer unspezifischen unterschieden werden. Deshalb kann aus diesem Experiment keine Schlußfolgerung gezogen werden.

3.2.7 Immunlokalisierung von PIP_2 in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum*

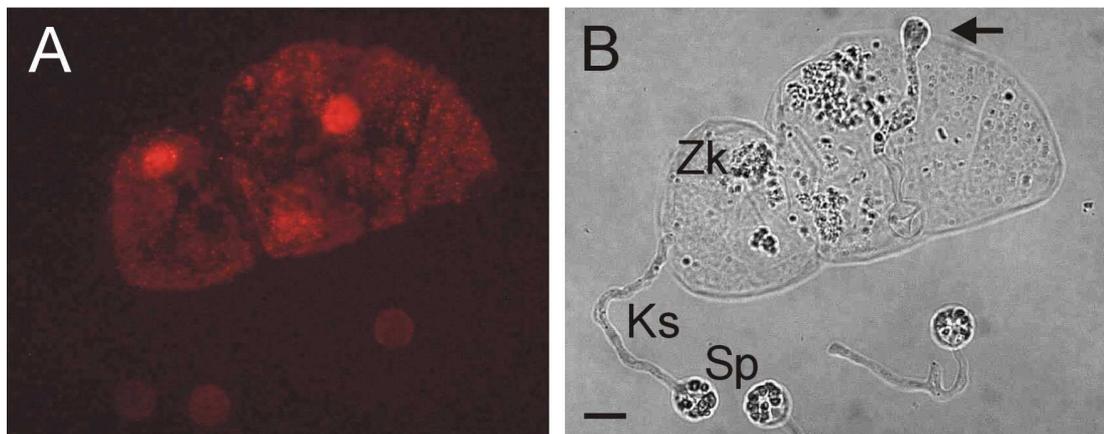


Abb. 3.23: Infizierte und fixierte Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, monoklonaler Antikörper gegen PIP_2 . Fluoreszenz-Aufnahme (A) und Durchlichtbild (B). Ks – Keimschlauch, Sp – Spore, Zk – Zellkern, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 15 μm

Trotzdem wurde der kommerziell erworbene Antikörper gegen PIP_2 weiterhin verwendet. Mit ihm sollte PIP_2 in von Keimlingen von *Phytophthora infestans*

infizierten Petersilienzellen aus Suspensionskultur markiert werden. Es wurden mehrere Protokolle zur Fixierung und Markierung verglichen. Infizierte Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd und mit oder ohne Triton X-100 und mit oder ohne DMSO fixiert. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde auf den Einsatz von DMSO verzichtet.

Ein repräsentatives Ergebnis ist in Abb. 3.23 dargestellt. Diese Abbildung zeigt zwei Zellen von *Petroselinum crispum*, von denen eine durch Pil1 infiziert wird. Beide Zellen zeigen eine leichte Rotfluoreszenz entlang der Plasmamembran. Im Inneren der Zellen sieht man starke lokale Rotfärbungen. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um die Zellkerne. Entgegen den Erwartungen zeigte keine der untersuchten Zellen ein Fluoreszenzsignal an der Stelle, an der der Pilz in die Zelle einzudringen versuchte. Daran änderten auch Modifikationen am Fixierungs- und Inkubationsprotokoll nichts.

Eine Lokalisation von PIP₂ an der Infektionsstelle konnte also nicht nachgewiesen werden. Es kann nicht mit Bestimmtheit gesagt werden, ob das daran liegt, daß PIP₂ tatsächlich nicht an der Infektionsstelle lokalisiert ist, oder ob es sich mit den hier getesteten und verwendeten Methoden nicht nachweisen läßt.

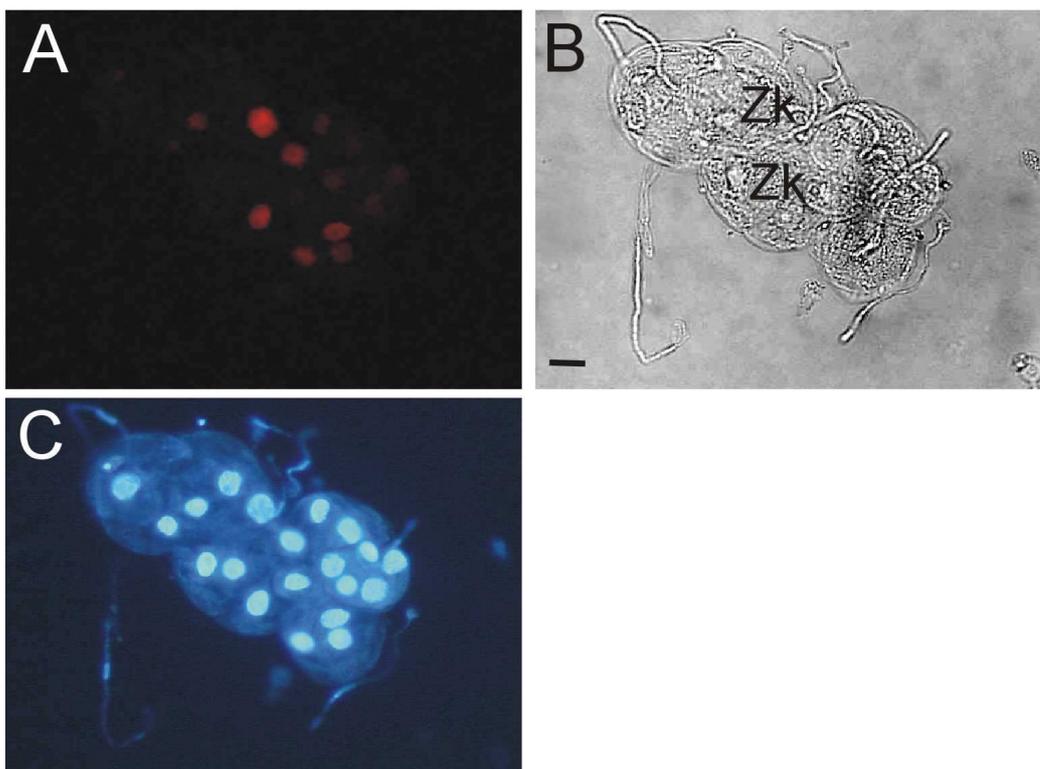


Abb. 3.24: Infizierte und fixierte Zellen von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, monoklonaler Antikörper gegen PIP₂ und DAPI-Färbung. A und C – Fluoreszenz-Aufnahmen, B – Durchlichtbild. Zk – Zellkern. Maßstab 15 μm

DAPI-Gegenfärbung

Die deutliche Färbung im Inneren der infizierten Zelle und in den Nachbarzellen legt die Vermutung nahe, daß der Antikörper gegen PIP₂ ein Signal im Zellkern erkennt. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Zellen, die mit Antikörper gegen PIP₂ behandelt worden waren, auch mit DAPI gefärbt. Abb. 3.24 zeigt ein so behandeltes Zellaggregat. Es fällt eine Koinzidenz von roter Antikörper- und blauer DAPI-Fluoreszenz auf. Es gibt mehrere Berichte über PIP₂ im Zellkern von Säugerzellen [17, 110, 139].

Eine Färbung des Zellkerns mit Antikörpern wurde in den meisten untersuchten Zellen gefunden, unabhängig davon, ob sie infiziert waren oder nicht.

3.2.8 Beteiligung kleiner GTPasen an der Infektionsabwehr – Antikörpertest im Western Blot

Die Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle (“oxidative burst”) ist ein häufig beobachteter Vorgang bei der Infektionsabwehr, sowohl in Pflanzen, als auch in tierischen Zellen [144, 164]. Bekannt aus der Literatur ist die Beteiligung kleiner GTPasen an der Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle [64, 142].

Ebenfalls bekannt ist die Notwendigkeit funktionierender kleiner GTPasen für ungestörtes Spitzenwachstum und die Ausbildung und den Erhalt der normalen Zellform [95, 104].

Es ist möglich, daß es neben der Reorientierung der Aktinfilamente und der Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle bzw. am Wachstumspol von Zellen mit Spitzenwachstum weitere Gemeinsamkeiten zwischen Infektionsabwehr und Prozessen beim Spitzenwachstum gibt. Deshalb sollte untersucht werden, ob sich kleine GTPasen an der Infektionsstelle nachweisen lassen.

Von Dr. Arthur Molendijk wurde freundlicherweise ein Antiserum gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana* (AtRop4) zur Verfügung gestellt [124]. Es war gegen AtRop4 affinitätsgereinigt worden. Dieses wurde zunächst im Western Blot getestet. Dazu wurden Membranpräparationen aus *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* mit SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. AtRop4 hat ein Molekulargewicht von 21 kDa. Nach Inkubation mit dem Antiserum gegen AtRop4 und einem sekundären, mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper zeigte sich im Extrakt von *Petroselinum crispum* eine Bande in der Größe von ca. 18 kDa. Im Extrakt von *Arabidopsis thaliana* war keine Bande in der Größe von ca. 20 kDa zu erkennen, aber eine im höheren Molekulargewichtsbereich bei ca. 40 kDa. Diese Bande rührt wahrscheinlich von der Bildung eines Dimers von AtRop4 her [125].

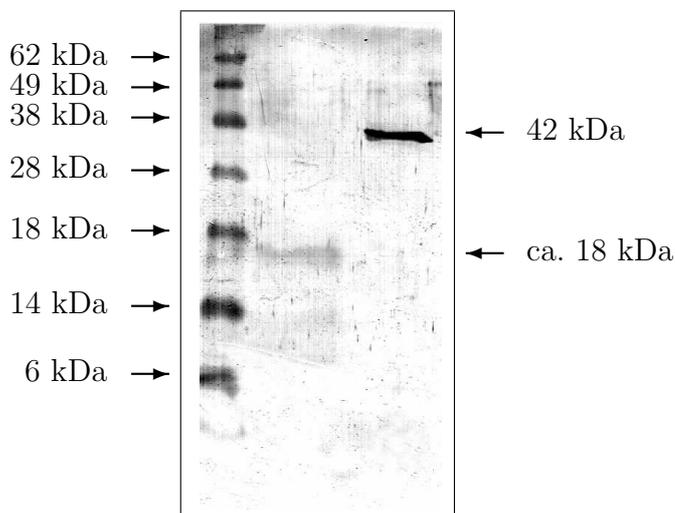


Abb. 3.25: Western Blot von SDS-PAGE-getrennten Vesikelpräparationen aus *Pc* – Petersilie-Zellkultur und *At* – *Arabidopsis thaliana*, affinitätsgereinigtes Antiserum gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana*.

Damit wurde gezeigt, daß das Antiserum gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana* auch mit einem Protein aus *Petroselinum crispum* reagiert, bei dem es sich vermutlich um ein Homolog von AtRop4 aus *Petroselinum crispum* handelt. Ein weiteres Experiment sollte die Tauglichkeit des Antiserums auch für die immunzytochemische Färbung in *Petroselinum crispum* belegen.

3.2.9 Rop in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum*

Das gereinigte Antiserum gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana* wurde außerdem getestet, indem es zur Immunlokalisation in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* eingesetzt wurde. Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* wurden fixiert und ohne vorheriges Schneiden mit dem Antiserum gegen AtRop4 inkubiert (whole-mount-Immuno). Danach wurden sie im CLSM betrachtet. Abb. 3.26 A zeigt ein typisches Bild einer Lokalisation von AtRop4 in Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana*. Sehr ähnliche Ergebnisse zeigen auch Molendijk et al. [124]. Es sind die antiklinen Zellwände im vorderen Bereich der Wurzel mit Antikörper markiert. Abb. 3.26 B zeigt ein typisches Bild einer mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen AtRop4 inkubierten Wurzelspitze von *Petroselinum crispum*. Das Bild ist dem der AtRop4-Lokalisation in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* ähnlich. Ähnlich wie in *Arabidopsis thaliana* sind auch hier die antiklinen Zellwände in der Wurzelspitze gefärbt.

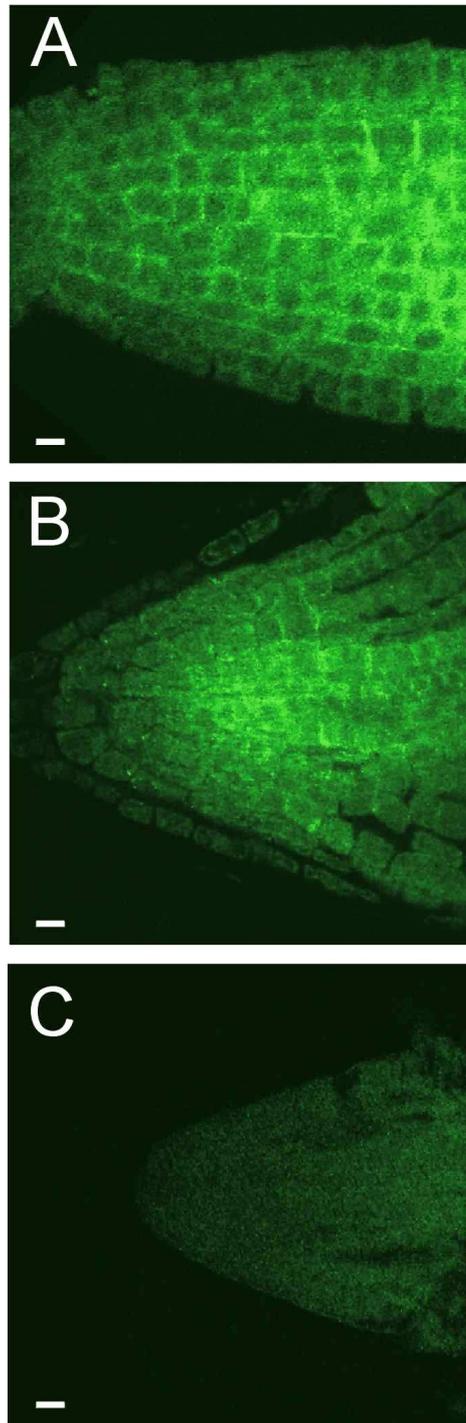


Abb. 3.26: Wurzelspitzen von A – *Arabidopsis thaliana* und B, C – *Petroselinum crispum* wurden mit A, B – affinitätsgereinigtem Antiserum gegen AtRop4 oder C – ohne primären Antikörper inkubiert. Fluoreszenzaufnahmen. Maßstab 10 μm .

Folgende Schlüsse lassen sich aus den Ergebnissen der Immunlokalisationsexperimente und dem Western Blot (Abb. 3.25) ziehen.

- Das Antiserum gegen AtRop4 reagiert auch mit Proteinen und Strukturen aus bzw. in *Petroselinum crispum*. Die in Wurzelspitzen von *Petroselinum crispum* markierten Strukturen sind denen in Wurzelspitzen von *Arabidopsis thaliana* ähnlich.
- Die Ähnlichkeit der markierten Strukturen in *Arabidopsis thaliana* und *Petroselinum crispum* suggeriert, daß es sich auch in *Petroselinum crispum* um eine kleine GTPase oder ein Protein mit einer der von AtRop4 ähnlichen Funktion handelt.

Im folgenden wurde das Antiserum gegen AtRop4 auch zur Immunlokalisation in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum* eingesetzt.

3.2.10 Immunlokalisation von Rop in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum*

Petroselinum-Zellen aus Suspensionskultur wurden mit Keimlingen von *Phytophthora infestans* infiziert und fixiert. Sie wurden mit dem oben beschriebenen affinitätsgereinigten Antiserum gegen AtRop4 inkubiert. Außerdem wurden von Dr. Arthur Molendijk neun verschiedene Fraktionen monoklonalen Serums gegen AtRop4 zur Verfügung gestellt. Da diese monoklonalen Antikörper gegen AtRop4 gewonnen worden waren, konnte keine ausreichende Spezifität gegen ein Rop-Homolog aus *Petroselinum crispum* vorausgesetzt werden, weshalb eine Mischung dieser Fraktionen eingesetzt wurde. Es ergaben sich ähnliche Bilder bei Verwendung der monoklonalen Antikörper wie bei der Verwendung des gereinigten polyklonalen Antiserums gegen AtRop4.

Abb. 3.27 zeigt ein typisches Bild einer Immunlokalisation von Rop in infizierten Petersiliezellen. Die Peripherie der Zelle ist leicht markiert. Deutlich, wenn auch schwach zu sehen ist ein Antikörper-Signal an der Stelle, an der der Pilz in die Zelle einzudringen versucht. Abbildung 3.27 zeigt eine ringförmige Färbung an der Infektionsstelle.

Bemerkt werden muß, daß sich auch dieses eher schwache Signal von Kontrollen abhebt, bei denen kein primärer, sondern nur ein sekundärer Antikörper eingesetzt wurde. Bei diesen Kontrollen ist überhaupt kein Signal zu sehen, das Bild ist schwarz, weder die pilzliche noch zelluläre Strukturen geben ein nennenswertes Fluoreszenzsignal (siehe Abschnitt 3.2.1). Dieses ist ein erster Beleg für die Lokalisation einer Rop-GTPase (oder eines strukturell und funktional ähnlichen Proteins) an der Infektionsstelle in einer Nichtwirtpathogenbeziehung.

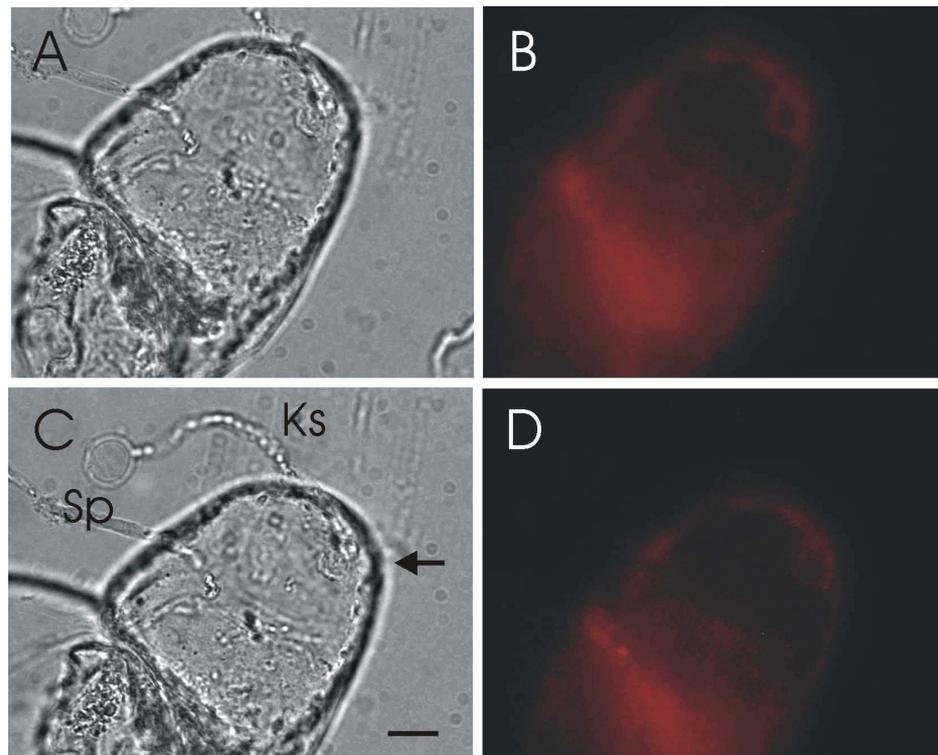


Abb. 3.27: Infizierte und fixierte Zelle von *Petroselinum crispum* aus Suspensionskultur, Inkubation mit affinitätsgereinigtem Antiserum gegen AtRop4 . A und C – Durchlichtaufnahmen, B und D – Fluoreszenzaufnahmen. Ks – Keimenschlauch, Sp – Spore, Infektionsstelle durch Pfeil markiert. Maßstab 10 μm .

3.2.11 Rop-Aktivitätsmutanten in Infektionsexperimenten

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß auch im hier verwendeten Modellsystem von infizierten Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* GTPasen bei der Abwehr einer Infektion mit einem Nichtwirtpathogen eine Rolle spielen. Diese Rolle läßt sich allerdings schlecht funktional in *Petroselinum crispum* untersuchen. Darum wurden Aktivitätsmutanten zweier GTPsen aus *Arabidopsis thaliana* hergestellt.

GTPasen sind als Regulatoren zellulärer Prozesse seit langem bekannt und untersucht [9]. Sie führen ihre Regulationstätigkeit aus, indem sie zwischen einer GTP-bindenden, aktiven und einer GDP-bindenden, inaktiven Form wechseln. Mit Hilfe von Punktmutationen im Protein kann man Aktivitätsmutanten herstellen, die entweder ständig aktiv oder ständig inaktiv sind [81]. Mehrere kleine GTPasen sind in Pflanzen bereits beschrieben, zwei davon sind in diesem Zusammenhang interessant: Ono et al. zeigen die Abhängigkeit erfolgreicher

Pathogenabwehr in Reis vom Vorhandensein funktionierender GTPasen, speziell Os-Rac1 [138]. Unter den GTPasen aus *Arabidopsis thaliana* zeigt Rac7 die größte Sequenzähnlichkeit zu OsRac1. Kost et al. [95] verwenden Rac2 aus *Arabidopsis thaliana* und zeigen die Notwendigkeit funktionierender GTPasen für das reguläre Spitzenwachstum von Pollenschläuchen. Beide, Rac2 und Rac7, sollten aus *Arabidopsis thaliana* kloniert und davon Aktivitätsmutanten hergestellt werden.

Wie in Abschnitt 1.5.2 besprochen, ist für die kleinen GTPasen der pflanzen-spezifischen Unterfamilie der Rac-GTPasen die Bezeichnung als Rop-GTPasen angemessener. Trotzdem werden in dieser Arbeit die Bezeichnungen AtRac2 und AtRac7 verwandt, da für diese Proteine eine Bezeichnung als AtRop noch nicht etabliert ist.

Zunächst wurden AtRac2 und AtRac7 mittels spezifischer Primer aus einer cDNA-Bank von *Arabidopsis thaliana* kloniert.

Die Sequenzen der so gewonnenen DNA wurden durch Verwendung spezifischer Mutationsprimer mittels PCR so modifiziert, daß die daraus exprimierten Proteine die erwünschten Aktivitätsmutanten darstellten. Es wurden so AtRac2 mit der konstitutiv aktiven Aktivitätsmutante AtRac2akt und der dominant negativen Aktivitätsmutante AtRac2neg gewonnen. Ebenso wurde AtRac7 mit den Aktivitätsmutanten AtRac7akt und AtRac7neg gewonnen. Die Sequenzen wurden durch Sequenzieren überprüft.

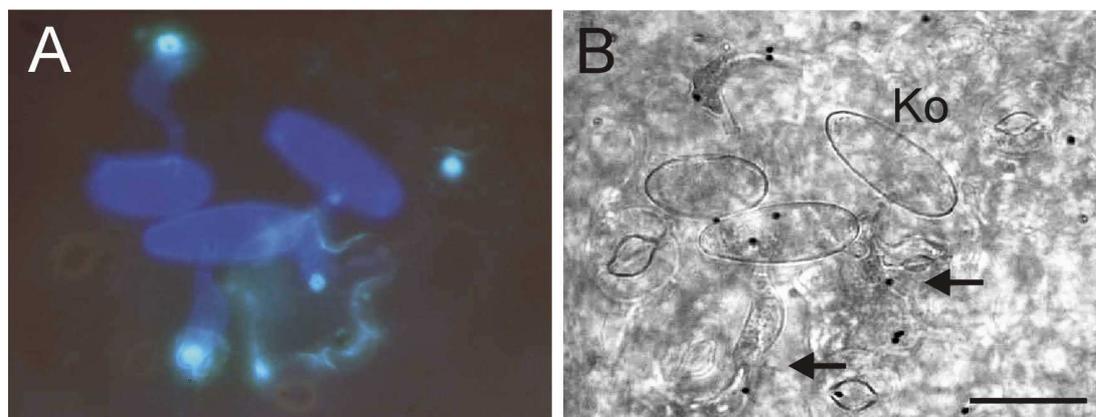


Abb. 3.28: *Arabidopsis*-Blatt, infiziert mit Konidiosporen von *Blumeria graminis*, GUS-infiltriert 24 hpi, nach Entfärben infiltriert mit Anilinblau, UV-Anregung. A – Fluoreszenzbild, B – Durchlichtbild. Ko – Konidiosporen, Infektionsstellen durch Pfeile markiert. Maßstab 25 μ m.

DNA für die GTP-bindenden Proteine, nämlich AtRac2 und AtRac7 und ihre dominant negativen und konstitutiv aktiven Varianten wurde mittels biolistischer Transformation in Zellen von Blättern von *Arabidopsis thaliana* gebracht. Zur Markierung, welche Zellen der Blattepidermis getroffen worden waren und

somit das Gen für die (modifizierte) GTPase enthielten, wurde GUS als Markergen verwendet. Auf diese Weise transient transformierte Blätter wurden vier oder 24 Stunden nach dem Beschuß mit Konidiosporen von *Blumeria graminis* f. sp. hordei (Stamm K1) infiziert. Nach weiteren 24 h wurde das Substrat für die β -Glukuronidase zugegeben, was gleichzeitig die transformierten Zellen markierte und Blätter und Pilze abgetötete. Nach weiterer Inkubation und Entfärbung wurden die pilzlichen Strukturen mit Coomassie angefärbt oder die Blätter wurden mit Anilinblau infiltriert. Die Blätter wurden im Licht- und im Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

Abb. 3.28 zeigt einen Ausschnitt aus einem *Arabidopsis*-Blatt, das mit *Blumeria graminis* infiziert wurde. Auf diesem Blattausschnitt sind keine transformierten Zellen zu sehen. Zu sehen sind drei Konidiosporen (bläulich sichtbar im Fluoreszenzbild), von denen jede einen sekundären Keimschlauch und ein Appressorium ausbildet. Ebenfalls erkennbar, aber nicht so gut zu sehen sind die von jeder Konidiospore gebildeten primären Keimschläuche. Zwei der Stellen, an denen *Blumeria graminis* mittels dem vom Appressorium gebildeten Penetrationskeil in die Epidermiszelle einzudringen versucht, sind durch Pfeile markiert. An diesen Stellen ist im Fluoreszenzbild eine bläulich-helle Fluoreszenz erkennbar. Diese Fluoreszenz unter UV-Anregung entsteht durch die Anilinblau-Färbung von Kallose. Die Epidermiszellen reagieren also auf die Infektionsversuche von *Blumeria graminis* mit der Ablagerung von Kallose an den Infektionsstellen. Eine der infizierten Epidermiszellen zeigt nicht nur an der Infektionsstelle, sondern in der gesamten Zelle bläulich-helle Fluoreszenz. Eine solche Fluoreszenz deutet auf die Ablagerung phenolischer Komponenten und ein Absterben der betroffenen Zelle hin [160]. Im Durchlichtbild andeutungsweise zu sehen ist eine Verdunklung dieser Zelle, auch das ist ein häufig beim Zelltod einer infizierten Zelle beobachteter Vorgang [160].

Für dieses Experiment von Interesse waren solche Zellen, die sowohl mit AtRac2 oder AtRac7 oder ihren jeweiligen Aktivitätsmutanten transformiert als auch infiziert waren ("single cell assay"). Eine Koinzidenz der beiden Ereignisse trat leider sehr selten auf.

Da nur wenige transformierte und infizierte Zellen beobachtet werden konnten, können keine fundierten Aussagen getroffen werden. Jedoch schien die Überexpression von AtRac2neg die Bildung von Kallose bei der Infektion der Zelle negativ zu beeinflussen. Ein möglicher Fall spontaner Kallosebildung konnte in mit AtRac7akt transformierten Blättern beobachtet werden (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Möglicherweise geben die Ergebnisse dieser Experimente einen Hinweis darauf, daß kleine GTPasen mit der Kallosebildung interferieren und so auf das Resistenzverhalten einer Pflanze wirken.

Eine genauere Auswertung dieser Experimente ist allerdings nicht möglich, da der Umfang der betrachteten Stichproben zu gering war.

Einen Ausweg könnte auch hier die stabile Transformation von Pflanzen mit in ihrer Aktivität modifizierten GTPasen unter Kontrolle eines induzierbaren

Promotors, ähnlich den in Abschnitt 3.2.3 beschriebenen, darstellen.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Profiline: Expression, Lokalisation und Funktion

Profiline sind Proteine des Zytoskeletts. Sie sind am Umbau der Aktinfilamente beteiligt. Profiline sind aus vielen Pflanzen- und Tierarten bekannt. Sie treten in allen untersuchten Eukaryoten auf und werden ubiquitär exprimiert. In *Drosophila* führt das Ausschalten eines Profilingens zum Absterben im Embryonalstadium [158].

In dieser Arbeit wurden Vorkommen, Expression und Lokalisation von Profilin in *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana* untersucht.

4.1.1 Expression von Profilin in *Petroselinum crispum*

Die Expression der Profiline in *Petroselinum crispum* wurde mittels Western Blot und indirekter immunzytochemischer Färbung untersucht. Dazu wurden Antikörper gegen das Profilin PRF1 aus *Petroselinum crispum* (PcPRF1) hergestellt. Profilin konnte in allen untersuchten Geweben von *Petroselinum crispum* und in Zellen aus Suspensionskultur nachgewiesen werden. Profiline fanden sich in vegetativen Organen sowie in Blüten und Blütenknospen von Petersilie. Ubiquitäre Expression von Profilin wurde u.a. auch in Tabak [123], Mais [177] und *Arabidopsis thaliana* [73] gefunden. Auch in tierischen Organismen, z.B. in Mäusen, ist Profilin in allen untersuchten Geweben zu finden [197].

Pflanzliche Profiline unterteilen sich in zwei Gruppen, in konstitutiv und in blütenspezifische exprimierte Profiline [176]. Eine detaillierte Untersuchung der Profilineexpression wurde in Blüten von *Petroselinum crispum* und deren Knospen durchgeführt. Verschiedene Stadien der Blütenentwicklung wurden fixiert und geschnitten. Sie wurden mit Antiserum gegen Profilin behandelt und hinsichtlich des Auftretens von Profilin miteinander verglichen. Alle Zellen der sich entwickelnden Blüte gaben, verglichen mit der Kontrollinkubation mit Präim-

munserum, ein mehr oder weniger starkes Profilin-Signal.

Besonders starke Profilinexpression wurde in sich entwickelnden Pollenkörnern gefunden. Die pflanzlichen Profileine wurden ursprünglich als eines der Hauptallergene von Blütenpollen entdeckt [185]. Profileine in Blüten angiospermer Pflanzen sind gut untersucht. So weisen von Witsch et al. Profileine in frühen Mikrosporen von Birke nach, ebenso in reifen Pollen von Mais [198]. Auch Mittermann et al. weisen Profilin während der Pollenentwicklung in Tabak nach, wobei der Gehalt in reifenden Pollen zunimmt [123]. Ob die Zunahme des Profilingehaltes eine Funktion während der Reifung des Pollens hat, ist nicht bekannt. Es ist möglich, daß Profilin während der Reifung selbst keine Funktion hat, sondern seine Akkumulation eine wichtige Voraussetzung für die Keimung des Pollenkorns darstellt.

Der Keimung geht eine Definition der Polarität des bis dahin unpolaren Pollenkorns voraus [42]. Durch die Keimung des Pollenkorns wird der Pollenschlauch gebildet. Dabei vollziehen sich grundlegende Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Auch für das Wachstum des Pollenschlauches ist das Aktinskelett von grundlegender Bedeutung [42]. Für die Veränderung des Zytoskeletts könnte Profilin eine ebenso wichtige Rolle spielen wie Aktin selbst. In Fibroblasten korreliert das Auftreten von Profilin mit dem aktinabhängigen Spitzenwachstum [159]. Profilin könnte für die Pollenkeimung ebenso wie für das Pollenschlauchwachstum funktionelle Bedeutung haben [202].

In unseren Experimenten konnte in späten Stadien der Pollenentwicklung Profilin nicht mehr nachgewiesen werden. Der Grund dafür könnte die feste und dicke Zellwand der Pollenkörner darstellen, die den Zugang der Antikörper zu und die Bindung an ihr intrazelluläres Zielprotein nicht zulassen.

An dieser Stelle muß bemerkt werden, daß das verwendete Antiserum aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der Profileine (siehe Abschnitt 3.1.6) sehr wahrscheinlich nicht zwischen möglicherweise vorhandenen Isoformen von Profilin unterscheiden kann.

4.1.2 Nachweis und Klonierung von Profilinen aus *Petroselinum crispum*

Profileine treten in Pflanzen meist als kleine Genfamilie auf. So klonieren Staiger et al. [177] drei Profileine aus dem Pollen der monokotyledonen Maispflanze und weisen mittels Southern Blot drei bis sechs Mitglieder der Profilin-Genfamilie in Mais nach.

Auch in dieser Arbeit konnten in *Petroselinum crispum* mehrere Profileine mittels Southern Blot nachgewiesen werden. Der Southern Blot zeigte ungefähr fünf Banden, die bei geringer Stringenz mit der Profilinsonde hybridisierten. Auch in *Arabidopsis thaliana* und *Phaseolus vulgaris* bilden Profileine kleine Genfamilien [24, 52, 73]. Auch in Säugern treten Profileine in kleinen Genfamilien auf, in

Mäusen gibt es zwei Profilingene, eines davon erzeugt zwei Isovarianten durch zwei verschiedene Möglichkeiten des “splicings” [197].

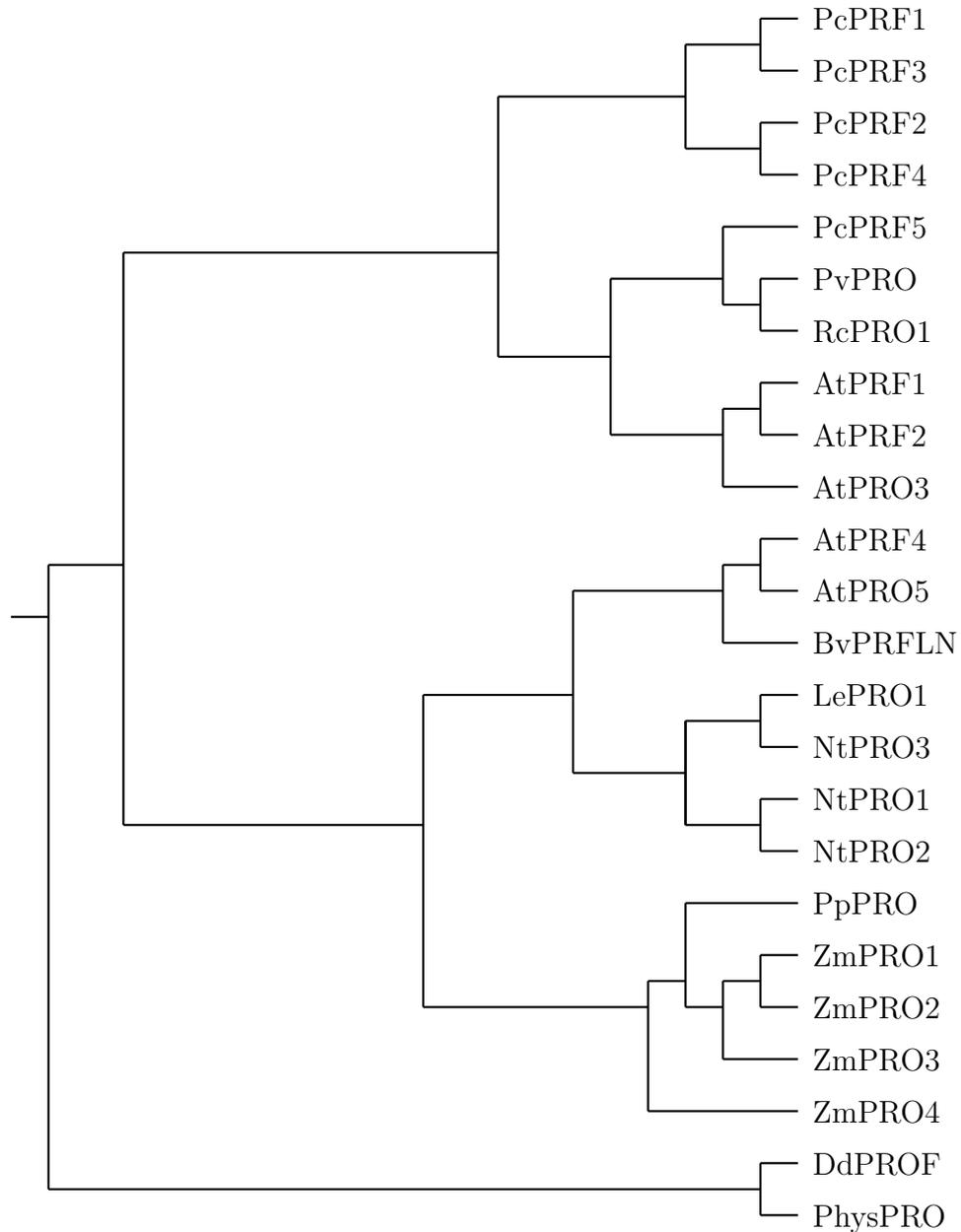


Abb. 4.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener pflanzlicher Profiline mit Profilinen aus niederen Eukaryoten. At – *Arabidopsis thaliana*, Bv – *Betula verucosa*, Dd – *Dictyostelium discoidum*, Le – *Lycopersicon esculentum*, Nt – *Nicotiana tabacum*, Pc – *Petroselinum crispum*, Phys – *Physarum polycephalum*, Pp – *Phleum pratense*, Pv – *Phaseolus vulgaris*, Rc – *Ricinus communis*, Zm – *Zea mays*.

Außer PcPRF1 (Sabine Gus-Mayer, unveröffentlicht) wurden vier weitere Profile aus *Petroselinum crispum* kloniert. Sie sind einander sehr ähnlich in Länge, abgeleiteter Aminosäuresequenz und berechnetem pI (isoelektrischer Punkt). Letzterer liegt bei allen fünf Profilen zwischen pI 4,3 und 4,8. Die 3'- und 5'-nichttranslatierten Bereiche der klonierten Profile sind kurz und einander ähnlich.

Abbildung 4.1 zeigt den Vergleich der aus *Petroselinum crispum* klonierten Profile (PcPRF1-5) mit einigen pflanzlichen Profilen und mit Profilen aus niederen Eukaryoten, aus *Physarum polycephalum* [109] und *Dictyostelium discoideum* [65]. Die meisten bekannten pflanzlichen Profile wurden aus Pollen kloniert, u.a. aus Pollen von Mais (ZmPRO1-3, [177]), Tabak (ntPro1,2,3 [122, 123]), Tomate (LePRO1, [202]), Birke [185] und natürlich aus *Arabidopsis thaliana* (PRF4, PRF5, [24, 73]). Einige Profile wurden als somatisch charakterisiert. Dazu gehören ZmPRO5, das aus dem Endosperm von Mais gewonnen wurde [97], die Profile PRF1-3 aus *Arabidopsis thaliana*, deren ubiquitäre somatische Expression mittels RT-PCR bzw. Northern Blot gezeigt wurde [24, 73], RcPRO1, dessen Vorkommen im Phloemsaft von *Ricinus communis* nachgewiesen wurde [163], und PvPRO, das in Knöllchen von *Phaseolus vulgaris* gefunden wurde [52].

Beim Vergleich der pflanzlichen Profilinsequenzen fallen die somatischen Profile aus monokotyledonen (*Phleum pratense* und *Zea mays*) und dikotyledonen Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*, Rizinus, Tabak) in zwei deutlich voneinander verschiedene Klassen. Geringer fällt hingegen der Unterschied zwischen den pollenspezifischen Profilen monokotyledoner und dikotyledoner Pflanzen aus. Es sind sogar die Profile aus den Pollen dikotyledoner Pflanzen den Profilen monokotyledoner Pflanzen ähnlicher als den somatischen Profilen der Dikotyledonen. Auch sind innerhalb der dikotyledonen Pflanzen die pollenspezifischen Profile zweier Arten (z.B. AtPRF5 und BvPRFLN) einander ähnlicher als pollenspezifische und somatische Profile innerhalb einer Art (z.B. AtPRF1 und AtPRF5). Die aus *Petroselinum crispum* klonierten Profile treten in einer Gruppe mit den somatischen Profilen aus *Arabidopsis thaliana* (AtPRO1-3), dem Profilin aus dem Phloemsaft von *Ricinus communis* (RcPRO1) und dem Profilin aus Knöllchen von *Phaseolus vulgaris* (PvPRO) auf.

Auch in Säugern werden Profile in zwei Klassen (I und II) eingeteilt [158]. Die Profile der Klassen I und II lassen sich hinsichtlich ihrer Sequenz und ihren biochemischen Eigenschaften voneinander unterscheiden. Diese Einteilung ist aber für die Gruppierung der pflanzlichen Profile ohne Belang, da sich pflanzliche Profile von den tierischen stark unterscheiden und den Profilen der frühen Eukaryoten ähnlicher sind [84]. Kovar et al. [97] stellen die erste Klassifizierung pflanzlicher Profile vor, indem sie heterolog exprimierte Maisprofile und aus Mais extrahierte und gereinigte Profile hinsichtlich ihrer Eigenschaften, ihrer Expression und Sequenz miteinander vergleichen. Dabei zeigt sich, daß Profile mit ähnlichem Expressionsmuster auch ähnliche Eigenschaften haben. Profile aus Pollen bilden die Klasse I. Nicht nur ihre abgeleiteten Aminosäuresequenzen

sind einander ähnlicher als den Profilinen der Klasse II, auch ihre biochemischen und physiologischen Eigenschaften sind ähnlich. Die somatischen Profile ZmPRO4 und ZmPRO5 bilden zusammen mit aus Endosperm gewonnenem und gereinigtem Profilin die Klasse II. Profile der Klasse II inhibieren *in vitro* die Aktinpolymerisation stärker als die der Klasse I und wirken sich nach Mikroinjektion in eine Zelle stärker auf die Zytologie dieser Zelle aus. Sie zerstören die Zytoplasmastränge, was die Autoren auf die Depolymerisation von Aktinfilamenten zurückführt. Profile der Klasse II binden aber schwächer an PIP₂ und Poly-L-Prolin als Profile der Klasse I. Ob sich diese Klassifizierung auch für Profile aus dikotyledonen Pflanzen aufrechterhalten läßt, ist noch nicht untersucht worden [97].

Die hier aus *Petroselinum crispum* klonierten Profile scheinen den somatischen Profilinen aus dikotyledonen Pflanzen ähnlich zu sein. Sie fallen mit den somatischen Profilinen aus *Arabidopsis thaliana* (PRF1 bis PRF3), *P. vulgaris* (PvPRO) und *R. communis* (RcPRO1) in eine Gruppe. Sie wurden aus Zellen aus einer Suspensionskultur kloniert, die aus Stengeln von *Petroselinum crispum* gewonnen worden war [148]. Allerdings tragen vier der fünf Profile aus *Petroselinum crispum* (PcPRF1 bis PcPRF4) eine Insertion von zwei Aminosäuren zwischen den Aminosäuren 16 und 17. An gleicher Stelle tragen auch Profile aus Pollen verschiedener dikotyledoner Arten (*A. thaliana*, *B. verucosa*, *N. tabacum*) eine Insertion von zwei bis drei Aminosäuren. Bei Beachtung dieses auffälligen Sequenzmerkmals würden die Profile PcPRF1-4 zur Klasse der pollenspezifischen Profile gehören. Bei den meisten Zellen der Suspensionskultur handelt es sich, wie bei Pollen, um einzelne Zellen ohne Zellverband. Die Frage, ob die Profile PcPRF1-4 zur Klasse der somatischen oder der pollenspezifischen Profile gehören, könnte durch eine *in-situ*-Hybridisierung mit genspezifischen Sonden geklärt werden. Isotypische Antikörper gegen Profile, die zwischen Isoformen unterscheiden können, lassen sich aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der Profile (siehe Abschnitt 3.1.6) wahrscheinlich nicht gewinnen.

4.1.3 Profile im Zytosol – PRF-dsRNAi und Überexpression von PRF-GFP

Profile sind kleine hydrophile Proteine, die im Zytosol löslich sind. Sie können aber mit Phospholipiden der Plasmamembran interagieren [158]. Diese beiden Eigenschaften machen die Frage spannend, wo in der Zelle Profile eigentlich lokalisiert sind. Im Western Blot weisen Braun et al. Profile sowohl in zytosolischen Proteinextrakten wie in der Membranfraktion nach [18].

Die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins läßt sich auf mindestens zwei Arten untersuchen. Indirekte zytochemische Färbung mit Antikörpern gibt ein Bild der Proteinverteilung in der Zelle. Diese Methode ist invasiv. Schwierigkeiten können entstehen, wenn kleine Proteine des Zytoplasmas untersucht werden. Ihre

Lokalisation könnte durch die notwendige Fixierung beeinflusst bzw. verändert werden. Sogar ein Auswaschen mit Teilen des Zytoplasmas ist möglich.

Die zweite Möglichkeit, die Lokalisation von Proteinen zu untersuchen, ist ihre translatorische Fusion mit einem fluoreszierenden Protein [61]. Diese nichtinvasive Methode bietet den Vorteil, daß die Proteinlokalisierung nicht nur statisch in der Zelle betrachtet, sondern *in vivo* bei Veränderung dynamisch untersucht und verfolgt werden kann in den Zellen, die mit dem Fusionsgen transformiert sind. In dieser Arbeit wurden beide Verfahren angewandt, zunächst schien die Transformation mit einer Fusion aus PcPRF1 und GFP erfolgversprechender.

Protoplasten wurden mit dem Fusionsgen transformiert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transformation im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Sobald grüne Fluoreszenz erkennbar war, war das gesamte Zytoplasma davon erfüllt. Profilin scheint also gleichmäßig im gesamten Zytoplasma verteilt zu sein. Eine zytoplasmatische Verteilung wird auch von Holzinger et al. für die Grünalge *Microcystis denticulata* beschrieben [72]. In einem Übersichtsartikel schreiben auch Staiger et al., daß es sich bei Profilin in den meisten Fällen um ein zytoplasmatisches Protein handelt [176]. Auffallend bei allen betrachteten Protoplasten war jedoch, daß in mit Profilin-GFP transformierten Zellen keinerlei Zytoplasmastränge zu sehen waren. Im Gegensatz dazu zeigten Protoplasten, die zu Kontrollzwecken nicht mit dem Fusionsgen, sondern nur mit dem Gen für GFP transformiert worden waren, eine normale Verteilung des Zytoplasmas und Zytoplasmastränge, die den Zellkern mit der Peripherie des Protoplasten verbanden.

Sobald grüne Fluoreszenz die Expression von Profilin-GFP sichtbar machte, war diese Fluoreszenz auf das gesamte Zytoplasma verteilt. Das Zytoplasma selbst zeigte keine normale Verteilung. Anfangs waren statt der Zytoplasmastränge blasenartige Gebilde sichtbar, die im Laufe der Beobachtung verschwanden. Dann lag das Zytoplasma in einem Saum entlang der Plasmamembran, ebenso der Zellkern, der in einer "Zytoplasmatasche" an der Zellperipherie lag.

Um zu ermitteln, ob diese abnormale zytologische Morphologie durch Überexpression von Profilin oder GFP bedingt war, wurden verschiedene Ansätze ausprobiert. Zum einen wurden weniger starke Promotoren verwendet und weniger DNA zur Transformation eingesetzt, um das Expressionsniveau des Fusionsproteins geringer zu halten, zum anderen wurden die transformierten Zellen sehr kurz nach der Transformation im Mikroskop betrachtet, um sie untersuchen zu können, bevor zu viel Fusionsprotein in der Zelle akkumuliert war und möglicherweise dadurch die Architektur der Zelle zerstört wurde. In allen Fällen waren in Protoplasten, sobald grüne Fluoreszenz erkennbar war, keine Zytoplasmastränge (mehr) sichtbar. Im Gegensatz dazu waren in Kontrollzellen immer Zytoplasmastränge erkennbar.

Kotransformationen von Protoplasten mit einer Fusion von Profilin mit RFP und einer Talin-GFP-Fusion zur Markierung der Aktinfilamente zeigten, daß in den Zellen, in denen keine Zytoplasmastränge zu sehen waren, tatsächlich die transvakuolären Aktinfilamentbündel fehlten (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Die-

se Ergebnisse lassen drei mögliche Erklärungen zu:

- Das Fusionsprotein aus GFP und Profilin kann nicht korrekt gefaltet werden, Profilin hat daher nicht seine natürliche räumliche Struktur und das Zytoplasma wird von “Proteinabfall” überschwemmt.
- Das Fusionsprotein wird korrekt exprimiert und gefaltet, es ist aber in viel zu großer Menge in der Zelle vorhanden, es besetzt seine natürlichen Bindungsstellen, aber der Überschuß des Proteins überschwemmt das Zytoplasma.
- Das Fusionsprotein wird korrekt exprimiert und gefaltet und auch seine Lokalisation im Zytoplasma ist korrekt. Die große Menge von Profilin führt dazu, daß das Gleichgewicht zwischen Profilin und Aktin gestört wird und zu viele Aktinmonomere gebunden werden, was in einem Abbau der Filamente resultiert. Dieser Mangel an polymerisiertem Aktin führt dann zu einem Zusammenbruch der Zytoplasmastränge.

Zur ersten Erklärung ist zu sagen, daß andere Arten, Profilin mit GFP zu fusionieren, keine anderen oder besseren Ergebnisse lieferten. In den hier gezeigten Bildern (siehe Abschnitt 3.1.4) wurde GFP C-terminal von Profilin exprimiert, eine N-terminale Fusion lieferte zwar weniger Fluoreszenz, aber nicht mehr Zytoplasmastränge.

Die zweite Erklärung läßt sich mit diesem Verfahren schlecht prüfen oder widerlegen. Jedoch muß gesagt werden, daß auch beim Einsatz schwächerer Promotoren, von weniger DNA und beim Betrachten der Protoplasten sehr kurz nach der Transformation zwar weniger Fluoreszenz zu beobachten, aber auch keine Zytoplasmastränge mehr sichtbar waren.

Das läßt die dritte Erklärung (korrekte Expression und Proteinfaltung vorausgesetzt) am wahrscheinlichsten erscheinen. Zu der aus dieser Erklärung abgeleiteten Vermutung, daß das Fehlen der Zytoplasmastränge eine Folge der Profilinüberexpression sei, passen auch verschiedene in der Literatur beschriebene Experimente. Die Filamente zerstörende Wirkung von Profilin wurde schon mehrfach beschrieben.

Mehrere Autoren beschreiben die Mikroinjektion von rekombinant hergestelltem oder aus Gewebe extrahiertem und gereinigtem Profilin in große, gut mikroskopierbare Zellen [153, 178, 187]. Der erste Report dieser Art stammt von Staiger et al. [178]. Gereinigtes tierisches wie gereinigtes pflanzliches Profilin wird in Staubblatthaarzellen von *Tradescantia* injiziert. Beide Profileine, das tierische wie das pflanzliche, verändern die Zytoarchitektur irreversibel. Schon innerhalb von 1-3 min werden die Zytoplasmastränge dünner und zerreißen schließlich, der Zellkern und der überwiegende Teil des Zytoplasmas sammeln sich an der antitropischen Zellwand. Nachfolgende Injektion von Rhodamin-Phalloidin zeigt, daß

das Zusammenbrechen der Zytoplasmastränge tatsächlich auf das Fehlen transversaler Aktinfilamente zurückgeführt werden kann. Der Effekt, den injiziertes Profilin auf die Zerstörung der Zytoplasmastränge hat, hängt von der Dosis des injizierten Profilins ab [187]. Die Koinjektion von monomerem Aktin zusammen mit Profilin kann den filamentzerstörenden Effekt mindern. Diese Minderung ist abhängig von der Menge koinjizierten Aktins [153]. Die Wirkung von Profilin ist also abhängig vom Mengenverhältnis zwischen den beiden Partnern. Profilin wirkt anscheinend nicht gleich auf alle zellulären Aktinfilamente. Die Mikroinjektion von Profilin in Fibroblasten bewirkt die Reduktion von filamentösem Aktin aus einigen Strukturen der injizierten Zelle [182].

Leider ermöglichen die Ergebnisse der Experimente dieser Arbeit nicht den Einsatz einer Fusion von Profilin und GFP, um Profilin bei der Infektion von Petersiliezellen zu verfolgen und zu beobachten. Deshalb wurden zur Lokalisation von Profilin bei Infektion von Petersiliezellen Antikörper gegen Profilin eingesetzt.

Um die zelluläre Funktion von Profilin zu untersuchen, sollte der zelluläre Profilin Gehalt nicht nur, wie hier beschrieben, erhöht werden. Es sollten auch die Auswirkungen mangelnder oder fehlender Profilinfunktionen untersucht werden. Es gibt Inhibitoren, die mit der Funktion von Profilin interferieren (z.B. Mastoparan), sie sind aber nicht spezifisch genug, um möglicherweise zu beobachtende Änderungen wirklich auf eine veränderte Funktion von Profilin zurückführen zu können [18]. Eine andere Möglichkeit, die Auswirkung fehlender Profilin-Funktion zu untersuchen, ist der genetische Ansatz. Zunächst wurde nach Mutanten gesucht, die Defekte in einem oder mehreren Profilingenen hatten. Solche Mutanten wurden nicht gefunden (siehe Abschnitte 3.1.10 und 4.1.4). Ramachandran et al. [149] berichten von transgenen *Arabidopsis*-Pflanzen, die eines der Profiline auf stark reduziertem Niveau exprimieren, weil sie mit einem Profilin-Antisense-Konstrukt transformiert sind. Obwohl die Autoren mehrere Linien transgener Pflanzen untersuchten, konnten sie keine finden, deren Gehalt an PRF1 um mehr als 50 % gegenüber dem Wildtyp reduziert waren.

Die Expression von einem oder mehreren Profilinen sollte darum nur in einzelnen Zellen von Blättern von *Arabidopsis thaliana* mittels posttranskriptionalem Gen-„Silencing“ (PTGS) ausgeschaltet werden. Dazu wurden PRF-dsRNAi-Konstrukte verwendet. dsRNAi (double-stranded RNA interference) ist eine Methode des (PTGS) [170]. Sie wirkt im Prinzip ähnlich dem „Gene Silencing“ durch Expression von Antisense-RNA, die Effekte sollen aber nachhaltiger und die Konstrukte stabiler sein [165]. Doppelsträngige RNA soll mit dem endogenen Transkript interagieren und seine Degradation bewirken [25].

Epidermiszellen von *Arabidopsis*-Blättern wurden ballistisch transformiert. Um die transformierten Zellen als solche zu markieren, wurde mit dem PRF-dsRNAi-Konstrukt ein Reportergen transformiert. Zunächst wurde ein GFP-Fusions-Gen zur Markierung erfolgreicher transformierter Blattzellen benutzt. GFP war translational mit der Aktin-bindenden Domäne des Aktin-bindenden Proteins Talin fusioniert, so daß ein Markergen entstand, das gleichzeitig zwei

Funktionen erfüllte [96]. So wurden in transformierten Zellen die Aktinfilamente durch Talin-GFP sichtbar gemacht, was die Beobachtung ihrer Dynamik ermöglichte, gleichzeitig gab dieses Reportergen Auskunft darüber, welche Zellen transformiert waren und folglich auch das PRF-dsRNAi-Konstrukt trugen. PRF-dsRNAi sollte die Translation und Biosynthese von Profilin inhibieren. Auch Kontrolltransformationen wurden durchgeführt, bei denen kein PRF-dsRNAi-Konstrukt zusätzlich zum Talin-GFP-Fusionsgen transformiert wurde.

Zelluläre Aktinfilamente waren durch GFP markiert. Zunächst waren keine Unterschiede zwischen PRF-dsRNAi-Transformation und Kontrolltransformationen sichtbar. Erst nach drei bis vier Tagen begannen sich Unterschiede abzuzeichnen. In Blättern, deren Zellen mit Kontrollkonstrukten transformiert waren, wurde die Fluoreszenz langsam schwächer und diffuser. Die transversalen Aktinfilamentbündel oder zumindest ihre Markierung verschwanden. Im Gegensatz dazu blieben in Zellen, die mit PRF-dsRNAi-Konstrukten transformiert waren, die transversalen Aktinfilamente bzw. -filamentbündel erhalten. Ihre Fluoreszenz verstärkte sich sogar mit der Zeit.

Eine mögliche Erklärung dafür ist, daß der Umbau von Filamenten durch das Vorhandensein von Profilin ermöglicht wird. In Zellen, in denen die Profilin-Synthese durch das PRF-dsRNAi-Konstrukt unterdrückt war, wurde auch der Abbau der Aktinfilamente aus den Bündeln unterdrückt. Dieser Effekt läßt sich nicht allein auf die Menge transformierter DNA oder das Vorhandensein eines dsRNAi-Konstrukts zurückführen, da auch in Zellen, die mit dsRNAi-Plasmid ohne PRF-Sequenz transformiert worden waren, die Aktinfilamente bzw. die GFP-Fluoreszenz abgebaut wurden. Daraus läßt sich die Hypothese ableiten, daß sich ein geringer Gehalt an Profilin hemmend auf den Um- bzw. Abbau der Filamente auswirkt, während eine Überexpression von Profilin Aktinfilamente zerstört, wie es in Protoplasten beobachtet wurde, die mit Profilin-GFP transformiert worden waren (Abschnitt 3.1.9). Es muß aber gesagt werden, daß Blätter, deren Zellen mit AtWRKY44-dsRNAi-Konstrukten transformiert worden waren, einen Phänotypen zwischen PRF-dsRNAi-Transformation und Kontrolltransformation zeigten.

Haugwitz et al. beschreiben Mutanten von *Dictyostelium discoideum*. Doppelmutanten, denen sowohl Profilin I als auch Profilin II fehlen, haben einen drastischen Phänotypen: Ihr Gehalt an F-Aktin ist um 60-70 % erhöht [65].

Unterschiede zwischen der Transformation mit PRF-dsRNAi-Konstrukten und Kontrollen wurden erst relativ spät, erst drei bis vier Tage nach der Transformation, sichtbar. Möglicherweise ist bis dahin noch ausreichend Profilin in der Zelle vorhanden, um das normale zelluläre Erscheinungsbild aufrecht zu erhalten. PRF-dsRNAi-Konstrukte wirken nur auf die Translation und Neusynthese von Profilinen, die sie hemmen sollen. Bereits synthetisiertes Profilin wird durch PRF-dsRNAi nicht beeinflusst. Erst wenn die bestehenden Profilinmoleküle der Zelle zunehmend abgebaut werden, wirkt sich die Transformation mit PRF-dsRNAi-Konstrukten aus, da keine neuen Profilinmoleküle nachgebildet werden können.

Diese Experimente geben Hinweise auf die Wirkung, die ein Ausschalten der Profilinexpression für die Zelle haben kann. Außerdem geben sie Aufschluß darüber, zu welcher Zeit nach der Transformation sich die ausgeschaltete Expression von Profilin auszuwirken beginnt. Zwischen der Transformation und dem ersten Sichtbarwerden eines Effekts liegen mindestens 72 h. Das bedeutet, daß der Umsatz von Profilin in der Zelle ("Turnover"), gemessen am gesamten Profilin Gehalt, nur langsam vor sich geht. Auch in den Experimenten von Kim et Panstruga et al. liegt ein zeitlicher Abstand von 96 h zwischen der biolistischen Transformation von Gerstenblättern und ihrer Infektion, um die Auswirkungen reduzierten Gehaltes an Calmodulin auf das Infektionsverhalten der Pathogene beobachten zu können [86]. Im Gegensatz dazu können Schweizer et al. Effekte des PTGS durch dsRNAi schon viel früher, beginnend 4 h nach der Transformation, nachweisen. Die Autoren transformieren Gerstenblätter mit doppelsträngiger RNA (und nicht mit einem Plasmid, dessen Transkription zu dsRNAi führen soll) des Mlo-Gens, das in resistenten Gerstenpflanzen Suszeptibilität vermittelt [165].

Diese Daten lassen vermuten, daß die Zeit, die zwischen der Transformation und einem signifikanten Absinken des Proteingehalts vergeht, weniger vom Organismus, in dem dsRNAi wirksam wird, als vom Protein, dessen Translation unterbunden wird, abhängt.

4.1.4 Suche nach Mutanten

Um die Wirkung von Profilin besser zu verstehen, wurde nach Mutanten gesucht, die eines der Profile nicht oder nicht korrekt exprimieren. Hierzu wurden die beiden am Max-Planck-Institut verfügbaren Mutantenpopulationen von *Arabidopsis thaliana* (ZIGIA, GABI-Kat) durchsucht. In keiner dieser beiden Mutantenpopulationen konnte eine Linie identifiziert werden, die eines der fünf Profile nicht exprimiert. Hinweise auf Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, die eines der Profile nicht exprimieren, finden sich nicht in der Literatur. McKinney et al. beschreiben eine Mutante von *Arabidopsis thaliana*, die eine Insertion in der Promotorregion von PRF1 trägt, was zu einem verringerten Expressionsniveau von PRF1 im Keimlingsstadium führt. Die Keimlinge weisen längere Hypocotylzellen, längere Hypocotyle und außerdem längere Wurzelhaare auf. Darüber hinaus haben diese Pflanzen keine Defekte in der Expression von PRF1. In der späteren Entwicklung dieser Pflanzen sind keine weiteren Abnormitäten zu beobachten [27].

Ramachandran et al. berichten von transgenen Pflanzen, die Antisense-RNA für PRF1 exprimieren. Dadurch wird der Gehalt an PRF1 um 50 % gegenüber dem Wildtypen reduziert [149]. Pflanzen mit verringerter Profilinexpression haben keinen gravierenden Phänotypen, sind aber kleiner als Wildtyppflanzen. Ihre Zellen zeigen Abweichungen in Form und Beschaffenheit ihrer Oberfläche gegenüber Zellen von Wildtyppflanzen.

Die Autoren konnten bei ihrer Suche nach erfolgreich transformierten Pflan-

zen keine Pflanze identifizieren, deren Gehalt an PRF1 stärker als um ca. 50 % reduziert war, weshalb sie die Vermutung äußern, daß eine zu starke Reduktion des Profilingehaltes möglicherweise lethale Auswirkungen auf die Pflanze hat und darum keine solchen Pflanzen gefunden werden können.

Diese Veröffentlichung [149], das Fehlen von Veröffentlichungen über Mutanten, die eines der Profile nicht exprimieren, und unsere eigene erfolglose Suche nach Mutanten, denen eines der Profile fehlt, ließen uns eine weitere Suche nach Mutanten nicht erfolgversprechend erscheinen. Weitere Mutantenspopulationen wurden nicht durchsucht. Auch Versuche, Samen für die von Ramachandran et al. beschriebenen *Arabidopsis*-Linien zu bekommen, verliefen ergebnislos.

Stattdessen wurden Versuche unternommen, um die Expression von Profilin transient zu reduzieren. Außerdem wurden transgene Linien hergestellt von Pflanzen, die PRF-dsRNAi-Konstrukte unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors tragen. Die Evaluation dieser Pflanzen ist gerade im Gange.

4.2 Profile bei der Infektionsabwehr

4.2.1 Intrazelluläre Lokalisation von Profilin bei Infektion

In den Experimenten dieser Arbeit wurde Profilin in infizierten Petersiliezellen an der Infektionsstelle und im Kern gefunden. In Immunlokalisationsexperimenten finden Holzinger et al. Profilin in der Grünalge *Microcystis denticulata* nahezu gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, allerdings mit stärkerer Akkumulation um den Zellkern und auch im Inneren des Zellkerns [72]. Die Funktion, die Profilin dort ausübt, ist unklar, es wird aber auch in anderen Pflanzen im Zellkern gefunden, im Gegensatz zu Tieren, wo Kernlokalisation von Profilin die Ausnahme darstellt [18]. In Wurzelhaaren von Mais ist Profilin häufig im Zellkern nachzuweisen und nur in Ausnahmefällen nicht im Zellkern zu finden [8]. Möglicherweise pendelt das lösliche Profilinmolekül zwischen Zytoplasma und Nukleus, wie es schon für G-Aktin (monomeres Aktin) gezeigt wurde. Die Funktion ist unklar, möglich wäre, daß Signaltransduktionskaskaden zwischen Kern und Zytoplasma auf diesen Austausch angewiesen sein könnten. Diese Vermutung sehen Baluška et al. dadurch bestätigt, daß sich die Profilinverteilung zwischen Kern und Zytosol bei Zugabe von Mastoparan ändert. Mastoparan interferiert mit dem Umsatz von PIP_2 in der Zelle [8].

In Wurzeln von *Phaseolus vulgaris* ist Profilin im Zytoplasma zu finden, teilweise mit besonderer Akkumulation um Amyloplasten. In Knöllchen ist Profilin in infizierten Zellen im Kern zu finden [192]. In den hier beschriebenen Experimenten wurde Profilin immer im Zellkern gefunden, unabhängig davon, ob diese Zelle infiziert war oder nicht.

Infizierte Zellen zeigten außerdem eine Akkumulation von Profilin an der Stelle, an der der Pilz in die Zelle einzudringen versuchte. Zur Infektionsstelle richten

sich die zellulären Aktinfilamente aus (Abb. 3.18, außerdem [160]). An der Infektionsstelle und um sie herum bilden feine Aktinfilamente ein dichtes Netzwerk, eine Art Kappe (Abb. 3.19, [50]). Die Akkumulation von Profilin an einer Infektionsstelle wurde noch nicht beschrieben. Profilin bildet aber eine Art Kappe an der Spitze von wachsenden Wurzelhaaren, zu der sich die Aktinfilamente ausrichten [18]. Diese Kappe verschwindet, wenn der Inhibitor Mastoparan zugegeben oder die Aktindynamik durch Cytochalasin unterbunden wird [18]. Über die Funktion dieser Profilinkappe ist wenig bekannt. Man weiß aber, daß in tierischen Zellen Profilin vorwiegend in Regionen mit hoher Aktindynamik zu finden ist, so z.B. in kortikalen Bereichen, in Filopodien und “membrane ruffles” [158]. In *Listeria*-infizierten Vertebratenzellen wird Profilin in den “Kometenschweifchen” aus Aktinfilamenten gefunden, die zur intrazellulären Fortbewegung des Parasiten *Listeria* notwendig sind. Wie in anderen Systemen scheint auch hier die Funktion von Profilin eher eine Regulation oder Modulation der Dynamik der Aktinfilamente zu sein [152].

Profilin kann das Wachstum von Aktinfilamenten gezielt fördern. An Profilin gebundene Aktinmonomere können effizienter an das Plusende bestehender Filamente gebunden werden als Aktinmonomere ohne Profilin [146, 182]. Bindung von Aktin an Profilin behindert die Filamentelongation nicht [182].

Profilin-Bindung kann aber die spontane Initiation der Filamentbildung ebenso hemmen wie die Filamentverlängerung am Minus-Ende [190]. Da Filamentverlängerung am Plusende, Filamentverlängerung am Minusende und Initiation der Filamentneubildung konkurrierende Prozesse sind, führt die Hemmung der beiden letzteren durch Profilin dazu, daß die Filamentverlängerung am positiven Ende effizienter abläuft als ohne Profilin. Sind die Plusenden allerdings z.B. durch ein Capping-Protein besetzt und stehen sie darum zur Verlängerung nicht zur Verfügung, überwiegt die sequestrierende Wirkung von Profilin [13, 141].

Die Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle konnte gezeigt werden. Seine Funktion ist möglicherweise die Steuerung der Dynamik von Aktinfilamenten.

In Abb. 3.14 besonders gut zu sehen ist die Form, in der Profilin an der Infektionsstelle akkumuliert, es scheint die eindringende Hyphe zu umgeben. Für die Ablagerung von Kallose zur Abwehr einer Infektion durch ein pilzliches Pathogen beschreiben Skalamera et Heath die Bildung einer Art Schlauch entlang der eindringenden Hyphe [168].

Es stellt sich die Frage, welche die Faktoren sind, die die Lokalisation von Profilin in der Zelle beeinflussen. Da Profilin zwei bekannte Bindungsstellen für Liganden außer Aktin hat, kommen mindestens zwei Interaktionspartner in Betracht. Diese Interaktionspartner sind beide, zumindest in Tieren, mögliche Bestandteile von Signaltransduktionswegen [71, 158].

Ein Interaktionspartner von Profilin ist das Phospholipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP_2), das u.a. in Membranen gefunden wird. Die Lokalisation von Profilin kann durch seine Bindung an PIP_2 bestimmt werden. Möglicherweise

nimmt auch Profilin seinerseits Einfluß auf die Signaltransduktion in der Zelle. Profilin kann an "Cluster" von PIP_2 binden. An Profilin gebundenes PIP_2 kann nicht durch Phospholipase $\text{C}\gamma$ (PLC) hydrolysiert werden, es sei denn, die Phospholipase wäre selbst phosphoryliert. Hydrolyse von PIP_2 und Phosphorylierung der Phospholipase sind übliche Schritte in der Signaltransduktion. Profilin kann PIP_2 und Aktin nicht gleichzeitig binden, so kann die Phosphorylierung von PLC Profilin zur Aktinbindung freisetzen [182].

Außerdem interagiert Profilin mit Poly-L-Prolin-reichen Abschnitten in Proteinen. Zu den Proteinen mit Poly-L-Prolin-reichen Abschnitten gehört u.a. VASP (Vasodilator-stimulated Phosphoprotein), ein Protein, das in Säugern Substrat einer nukleosidmonophosphatabhängigen Kinase und also Teil von Signaltransduktionsketten ist. Es wurde gezeigt, daß Profilin aus Birke mit humanem VASP interagieren kann [152]. Andere Proteine mit PLP sind FH-Proteine, sie enthalten eine Formin-Homologie-Domäne. FH-Proteine sind an der Etablierung der Zellpolarität und an der Zytokinese beteiligt [158].

Außer seiner bekannten Funktion als Aktin-bindendes Protein hat Profilin also noch weitere Funktionen, die es eher als Signalmolekül erscheinen lassen. Eine neue Funktion wurde kürzlich beschrieben. Profilin kann den Phosphorylierungsstatus von zytoplasmatischen Proteinen beeinflussen. Die *in vitro* mit zytosolischen Extrakten aus Pollenschläuchen durchgeführten Experimente zeigen, daß die Zugabe von Profilin die Phosphorylierung von Proteinen hemmt, während es gleichzeitig die Phosphorylierung anderer Proteine des gleichen Extraktes sogar fördern kann, und das in Konzentrationen, die wesentlich geringer sind als die Konzentrationen, die die Zytoarchitektur verändern [26, 48].

Über die Funktionsweise ist wenig bekannt, eventuell kommt Profilin aber eine noch wichtigere Rolle bei der Regulation zellulärer Prozesse zu als bisher angenommen.

Profilin kann – zumindest in Hefe – auch mit einem weiteren Signalweg interagieren. In Hefezellen, in denen ein Effektor der Ras-GTPase gestört ist, führt die Überexpression von Profilin zu einer Wiederherstellung der normalen Morphologie der Zellen [182].

Ob Profilin auch bei der möglicherweise lokalen Signaltransduktion bei der Infektion eine Rolle spielt, kann durch die hier beschriebenen Experimente nicht geklärt werden.

Es muß darauf hingewiesen werden, daß es sich bei den oben diskutierten Ergebnissen um die Lokalisation von Profilin handelt, über die Funktion von Profilin bei der Infektionsabwehr können diese Experimente leider keine Auskunft geben. Trotzdem ist auch die Lokalisation eine wichtige Information. Sie korreliert mit der infektionsbedingten Reorientierung der Aktinfilamente ([50], diese Arbeit), was eine Funktion in diesem Prozeß als Teil der zellulären Abwehrstrategie zumindest vermuten läßt. Die Lokalisation ist spezifisch für Profilin, was folgende Experimente und Überlegungen belegen:

- Die zur intrazellulären Lokalisation von Profilin verwendeten Antikörper wurden vor ihrem Einsatz gegen Profilin affinitätsgereinigt. Ihre Spezifität wurde im Western Blot überprüft (Abschnitt 3.1.1).
- Die Spezifität der Bindung wurde in Konkurrenzexperimenten überprüft, zunächst in Proteinextrakten im Western Blot, was die Spezifität belegte. Zusätzlich wurde die Spezifität der Immunlokalisation bewiesen, indem der primären Antikörper enthaltenden Inkubationslösung heterolog exprimiertes Profilin zugesetzt wurde, wodurch sowohl die Fluoreszenzmarkierung an der Infektionsstelle als auch die im Kern verschwanden. Das Fluoreszenzsignal in der Zelle an der Infektionsstelle und im Zellkern rührte also von Profilin her.
- Die Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle ist spezifisch für dieses Protein, da ein anderes untersuchtes Protein, ein Transkriptionsfaktor der WRKY-Familie, nicht an dieser Stelle zu finden war. Es handelte sich also weder um einen Artefakt, der beispielsweise durch die Fixierung der Zellen entstanden sein könnte, noch um eine allgemeine Ansammlung von Proteinen an dieser Stelle. Man muß also davon ausgehen, daß Profilin spezifisch zur Infektionsstelle rekrutiert wird.
- Damit korrelierte die Beobachtung der Reorientierung der Aktinfilamente zur Infektionsstelle, was besonders eindrucksvoll in Doppelfärbungsexperimenten gezeigt wurde. Es war also nicht nur Profilin an der Infektionsstelle lokalisiert, sondern auch sein Bindungspartner Aktin, verbunden mit der Reorientierung der zellulären Aktinfilamente.

Auch wenn er hier nicht gezeigt wurde, läßt sich ein funktioneller Zusammenhang zumindest vermuten. Weitergehende Überlegungen lassen vermuten, daß die Lokalisation von Profilin die von Aktin bestimmt – und nicht umgekehrt.

4.2.2 Profilin-Expression bei Pathogenbefall

Weiterhin wurde untersucht, ob die Akkumulation von Profilin an der Infektionsstelle mit einer erhöhten Expression von Profilin einhergeht. Diese Untersuchungen wurden in *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Es wurde die Expression aller fünf Profile vor der Infektion mit einem Nichtwirtpathogen und zu verschiedenen Zeitpunkten während der Infektion bestimmt. Erwartungsgemäß konnte die Expression der pollenspezifischen Profile PRF4 und PRF5 nicht nachgewiesen werden, unabhängig von der Infektion. Die Expression der Profile PRF1, PRF2 und PRF3 war deutlich erkennbar, allerdings konnte kein Unterschied in der Profilinexpression zwischen einem nicht stimulierten und einem infizierten Blatt festgestellt werden.

Profiline unterliegen, so wie alle anderen Proteine auch, einem ständigen Umsatz, neues Profilin wird synthetisiert, während bestehende Moleküle abgebaut werden. Dieser normale Umsatz wurde nicht durch die versuchte Infektion des Nichtwirtspathogens *Blumeria graminis* beeinflusst. Andererseits könnte die Veränderung der Profilinexpression im Verhältnis zum normalen Durchsatz so gering sein, daß sie mit diesem Experiment nicht nachgewiesen werden kann. Auch auf der Internetseite der Arabidopsis Information Resource (TAIR, <http://arabidopsis.org/tools/bulk/microarray/index.jsp>) konnte kein Hinweis auf eine Induktion der Profilinexpression durch Befall der Pflanze mit einem Pathogen gefunden werden.

Veränderte Expression ist aber nicht die einzige Möglichkeit, die Aktivität eines Proteins zu beeinflussen. Eine andere Möglichkeit sind posttranslationale Modifikationen. Die Aktivität und Lokalisation eines Proteins kann durch Modifikationen wie Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, aber auch Azetylierung oder Geranylierung beeinflusst werden. Von den erwähnten Modifikationen wurde für pflanzliches Profilin bisher nur die Phosphorylierung beschrieben [52, 62]. Allerdings ist nicht bekannt, ob sie mit Pathogenbefall in Zusammenhang gebracht werden kann und wie sich diese Veränderung auf die Aktivität oder Funktionsweise von Profilin auswirkt.

Schließlich besteht noch die Möglichkeit, die Wirkung von Profilin durch Veränderung seiner subzellulären Lokalisation zu verändern. Liegt es z.B. in zellulären Regionen vor, wo die Filamentenden der meisten Aktinfilamente z.B. durch Capping Proteine besetzt sind und folglich keine Aktinmonomere an bestehende Filamente angelagert werden können, ist die Wirkung von Profilin zwangsläufig eine sequestrierende und damit Filamente zerstörende. Hingegen wirkt Profilin in Regionen, in denen die Aktinfilamente zur Verlängerung offenstehen, indem es Aktinmonomere bindet und diese bei der Filamentelongation unterstützt, insgesamt also fördernd auf die gezielte Polymerisation von Aktin [158].

Profilin kann also auch dann, wenn seine Expression durch Pathogenbefall nicht verändert wird, verändernd auf das Aktinskelett einwirken und funktionelle Bedeutung für die Reorientierung der Aktinfilamente und den Erfolg der Pathogenabwehr haben.

4.2.3 Verringerte Profilin-Expression – Einfluß auf die Pathogenabwehr

Die Lokalisation von Profilin an der Infektionsstelle wurde in Abschnitt 4.2.1 diskutiert. Die funktionelle Beteiligung von Profilin an der Infektionsabwehr sollte indirekt gezeigt werden. Auf die funktionelle Notwendigkeit von Profilin für erfolgreiche Pathogenabwehr könnte dann geschlossen werden, wenn eine Unterdrückung der Funktion von Profilin zu einem veränderten Verhalten der Zelle

oder einer ganzen Pflanze bei Befall mit einem Pathogen führt. Da es keine Inhibitoren gibt, die spezifisch mit der Funktion von Profilin interferieren, wurde der genetische Ansatz gewählt. Da keine Mutanten gefunden worden waren, sollte die Expression von Profilin in einzelnen Zellen der Blattepidermis von *Arabidopsis thaliana* unterdrückt werden. Die Auswirkung der verminderten Profilinexpression auf die Abwehr einer Infektion mit einem Nichtwirtspathogen sollte untersucht werden. Es sollte daher, wie in Abschnitt 4.1.3 diskutiert, die Expression von Profilin nur in einzelnen Epidermiszellen unterdrückt werden und die Auswirkung auf die Interaktion mit *Blumeria graminis* f. sp. hordei analysiert werden (“single cell assay”). Zum Ausschalten der Expression wurde die Methode des double stranded RNA interference (dsRNAi) verwendet [194].

Blätter, deren Zellen mit PRF-dsRNAi-Konstrukten transformiert worden waren, wurden nach der Transformation mit Konidiosporen des Nichtwirtspathogens *Blumeria graminis* f. sp. hordei inokuliert. Der zeitliche Abstand zwischen Infektion und Transformation betrug bis zu fünf Tagen. Weitere zwei Tage nach der Infektion wurden die Blätter fixiert und gefärbt. Dabei markierte die Aktivität der β -Glukuronidase die Zellen, die auch mit dem PRF-dsRNAi-Konstrukt transformiert worden waren. Solche Zellen, die sowohl infiziert, als auch transformiert waren, sollten untersucht werden. Eine Koinzidenz der beiden Ereignisse trat leider selten auf.

In einigen Fällen wurde eine erfolgreiche Haustorienbildung oder Ansätze einer solchen in Zellen beobachtet, die mit dem Pathogen infiziert und mit einem Konstrukt zum Ausschalten der Expression eines Profilin-Genes transformiert waren. Diese Beobachtung wurde aber in so wenigen Zellen gemacht, daß sich darauf keine wissenschaftliche Aussagen gründen lassen.

Das hier beschriebene Verfahren der ballistischen Transformation einzelner Epidermiszellen eines Blattes und nachfolgender Infektion (“single cell assay”) wird erfolgreich in *Hordeum vulgare* angewandt [86, 164]. Zwei Gründe lassen sich für die bestehenden Unterschiede anführen. Die viel seltenere Koinzidenz von Transformation und Infektion einer Zelle wird einerseits durch die viel geringere Größe der Zellen der Blattepidermis bedingt, zum anderen behindern auch die Blatthaare von *Arabidopsis thaliana* einen Kontakt von Konidiospore und Epidermiszellen und reduzieren folglich die Infektionshäufigkeit.

Um bessere Aussagen treffen zu können, sollten wesentlich mehr infizierte und transformierte Zellen untersucht werden. Dazu wären Mutanten hilfreich, die einen Defekt in der Expression eines der Profilingene haben. Auch transgene Pflanzen wären hilfreich, die in jeder Epidermiszelle ein PRF-dsRNAi-Konstrukt unter der Kontrolle eines östradiolinduzierbaren Promotors tragen. Herstellung und Testung solcher Pflanzen sind gerade im Gange.

4.3 Zellpolarisation bei Infektion und Spitzenwachstum

4.3.1 Zytologie der Infektion

Die Reorientierung der Zytoplasmastränge in der befallenen Zelle bei versuchter Infektion mit einem Nichtwirtpathogen war aus früheren Arbeiten in der Arbeitsgruppe Schmelzer bekannt [43, 50]. In dieser Arbeit wurde mittels indirekter immunzytochemischer Färbung mit Antikörpern gegen Aktin bestätigt, daß Aktinfilamente die Grundlage für die reorientierten, zur Infektionsstelle gerichteten Zytoplasmastränge bilden. In mehreren anderen Pflanzen wurde die Reorientierung der Zytoplasmastränge zur Infektionsstelle bei Pathogenbefall beschrieben [88, 89, 92, 161, 169].

Dabei sind Aktinfilamente von entscheidender Bedeutung [93]. In Monokotyledonen sind außer intakten Aktinfilamenten auch funktionierende Mikrotubuli notwendig, um Pathogene erfolgreich abzuwehren [126]. Wurde bei der Infektion von Gerstenkoleoptilen Aktin- und Tubulin-Inhibitoren gleichzeitig angewandt, blieben alle polarisierten Reaktionen wie Zytoplasmaaggregation, Papillenbildung und Akkumulation autofluoreszierender Komponenten aus [91, 90].

Auch für *Arabidopsis thaliana*, das zweite experimentelle System dieser Arbeit, wurde gezeigt, daß sich Aktinfilamente bei Befall mit einem Nichtwirtpathogen, mit *Blumeria graminis* f. sp. hordei, neu orientieren und sich zur Infektionsstelle ausrichten. Konidiosporen von *Blumeria graminis* bilden zunächst den primären Keimschlauch, der der Anheftung der Spore an das Blatt dient. Erst danach wird das eigentliche Infektionsorgan, der Appressorienkeimschlauch, gebildet. In einzelnen Fällen konnte sogar eine Reorientierung der Aktinfilamente in Zellen beobachtet werden, die selbst nicht infiziert wurden, auf deren Oberfläche die Spore aber mittels primären Keimschlauchs angeheftet war. Aktinfilamente richteten sich dann zu der Anheftungsstelle aus. Ähnliche Ergebnisse wurden noch nicht publiziert. Carver et al. beschreiben detailliert das Infektionsverhalten von *Blumeria graminis* und bemerken, daß der Appressorienkeimschlauch meist eine andere Zelle infiziert als die, an der der primäre Keimschlauch haftet [22]. Zellen, die mit dem primären Keimschlauch in Berührung kamen, zeigen eine erhöhte Resistenz gegenüber Infektion durch das Appressorium verglichen mit solchen Zellen, für die das Appressorium den ersten Kontakt mit dem Pilz darstellt. Auch H₂O₂ ist in Zellen unterhalb des primären Keimschlauchs zu finden [55]. Epidermiszellen können also auch die Anheftung des primären Keimschlauch wahrnehmen. Die Reorientierung der Aktinfilamente unterhalb des primären Keimschlauchs ist ein Zeichen dafür.

Die Erkenntnis, daß auch in *Arabidopsis thaliana* Aktinfilamente eine Reorientierung zur Infektionsstelle zeigen, ist ein wichtiger Schritt, da nun funktionelle Untersuchungen auch in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durch-

geführt werden können und auf die Mutantenpopulationen von *Arabidopsis thaliana* zurückgegriffen werden kann. Eine Mutante, *pen2*, wurde im Rahmen dieser Arbeit schon untersucht und hinsichtlich der Reorientierung der Aktinfilamente mit dem Wildtypen verglichen. Dabei ergaben sich keine Unterschiede in der Reorientierung der Aktinfilamente. Nach Abschluß der Laborarbeiten erschien ein Artikel von Takemoto et al. über die zelluläre Reorganisation beim Befall von Blättern von *Arabidopsis thaliana* mit Sporen von *Peronospora*-Arten. Die Autoren zeigen auch eine Reorientierung der Aktinfilamente in den Zellen, in denen *Peronospora*-Sporen Infektionsversuche unternehmen [181].

Wie in Abschnitt 4.2.1 diskutiert, wird Profilin in infizierten Petersilienzellen an der Infektionsstelle gefunden. Diese Erkenntnis ließ uns fragen, ob auch ein weiterer bekannter Bindungspartner von Profilin, das Phospholipid PIP₂, an der Infektionsstelle zu finden sei. Zunächst mußten Antikörper gegen oder andere Marker für PIP₂ gefunden werden. Antikörper gegen PIP₂ werden von mehreren Autoren beschrieben [19, 183]. Weder aus den dort genannten Quellen noch von den Autoren selbst konnten Antikörper gegen PIP₂ bezogen werden. Abruzova et al. [4] verwenden fluoreszent markiertes Neomycin, um PIP₂ in Membranen zu lokalisieren. Außerdem enthält dieser Artikel einen Hinweis auf die Firma Echelon Bioscience Incorporation (Salt Lake City, Utah, USA), von der wir dann Antikörper gegen PIP₂ beziehen konnten.

Dieser Antikörper wurde zunächst in Wurzelhaaren von *Petroselinum crispum* und *Arabidopsis thaliana* getestet, um das Verfahren zur Fixierung und Inkubation zu optimieren. Ein hohes Antikörpersignal wurde an der Spitze wachsender Wurzelhaare gefunden, wie es auch Braun et al. beschreiben [18]. Allerdings zeigten in Kontrollexperimenten auch solche Wurzelhaarspitzen Fluoreszenzsignale, die nicht mit Antikörper behandelt waren, so daß diese Ergebnisse keine Aussage für weitere Experimente lieferten.

Trotzdem wurden Experimente zur Immunlokalisation von PIP₂ in infizierten Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* durchgeführt. Fluoreszenzsignale wurden im Nukleus festgestellt. An der Plasmamembran konnte nur wenig, an der Infektionsstelle kein Antikörpersignal nachgewiesen werden, trotz mehrfacher Variation mehrerer experimenteller Parameter. Dieser Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen. Die Ursachen hierfür können biologische wie experimentelle sein. Möglicherweise konnte PIP₂, auch wenn es an der Infektionsstelle lokalisiert war, mit diesen Methoden nicht nachgewiesen werden, weil es in zu geringer Konzentration vorlag, weil es durch die Behandlung der Zellen von der Plasmamembran entfernt wurde oder weil es möglicherweise gebunden und darum für Antikörper nicht zugänglich vorlag. Möglich ist auch, daß PIP₂, entgegen unseren Erwartungen, tatsächlich nicht an der Infektionsstelle lokalisiert war. Drittens kann es sein, daß PIP₂ zwar an der Infektionsstelle lokalisiert war und auch nachweisbar gewesen wäre, aber zu dem Zeitpunkt, zu dem die Hyphe des infizierenden Pilzes und die infizierte Zelle so fest miteinander verbunden waren, daß sie fixiert werden konnten, schon nicht mehr dort lokalisiert war. In wachsenden Wurzel-

haaren lokalisiert PIP_2 an der Wurzelspitze. In ausgewachsenen Wurzelhaaren ist PIP_2 nicht mehr an der Spitze zu finden [18]. Hingegen gibt es mehrere Belege für PIP_2 im Zellkern von Säugetierzellen. So können Martelli et al. Phosphatidylinositol, Phosphatidylinositolphosphat (PIP) und Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP_2) im Zellkern nachweisen. Mit zellulären Differenzierungsprozessen einher geht ein Anstieg der Konzentration von PIP und PIP_2 im Zellkern [110]. Boronenkov et al. finden auch die Enzyme der Phosphoinositid-Signaltransduktion im Kern. Sie lokalisieren mit Teilen der Maschinerie zum "processing" von pre-mRNA in "nuclear speckles" [17]. Osborne et al. belegen sogar die Notwendigkeit des Vorhandenseins von PIP_2 im Kern in den "nuclear speckles" für das korrekte "splicing" der pre-mRNA [139].

Ebenfalls mit der Reorganisation des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden kleine GTPasen als Signalmoleküle. Es gibt eine Vielzahl kleiner GTPasen, sie werden in der RAS-Überfamilie zusammengefaßt. Diese RAS-Überfamilie unterteilt sich in mehrere Familien, in die Familien der RAS-, der RAN-, der RAB-, der RHO- und der ARF/SAR-GTPasen. Diese Familien unterteilen sich weiter in verschiedene Unterfamilien. So gehören zur Familie der RHO-GTPasen, die an der Regulation des Zytoskeletts beteiligt sind, die RHO-, die RAC- und die CDC42-GTPasen, außerdem gehören zu ihr die ROP-GTPasen als pflanzenspezifische Unterfamilie der RHO-GTPasen [9, 11]. In Pflanzen gibt es sehr viel Rop-GTPasen, in *Arabidopsis thaliana* sind es mindestens zwölf [9]. In dieser Arbeit werden die Bezeichnungen Rop und Rac für bestimmte GTPasen aus *Arabidopsis thaliana* darum parallel verwandt, weil AtRac2 und AtRac7 noch keine Bezeichnungen als Rop aus *Arabidopsis thaliana* zugeordnet wurden.

In Hefe sind Rac, Cdc42 und Rho an verschiedenen Prozessen der Reorganisation des Aktinskeletts beteiligt [186]. In Pflanzen sind es nur Mitglieder der Rop-Unterfamilie, die wichtige Funktionen bei der Aktinorganisation und zellulären Wachstumsprozessen ausüben [203]. Antikörper gegen eine kleine GTPase der Rop-Unterfamilie, gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana*, wurden freundlicherweise von Dr. Arthur Molendijk zur Verfügung gestellt. In Vorversuchen wurden die Antikörper in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* eingesetzt, es ergab sich ein ähnliches Bild wie das von Molendijk et al. [124] publizierte. Auch in Wurzeln von *Petroselinum crispum* ergab sich ein Bild, das dem für Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* publizierten sehr ähnlich war. Daraus wurde geschlossen, daß der Antikörper auch in *Petroselinum crispum* ein Protein erkennt, das eine ähnliche Funktion wie Rop4 in *Arabidopsis thaliana* ausübt und deshalb auch in *Petroselinum crispum* und insbesondere in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum* einsetzbar ist.

Antikörper gegen Rop4 aus *Arabidopsis thaliana* ergaben in infizierten Zellen von *Petroselinum crispum* ein schwaches, aber deutliches Signal an der Stelle, an der das pilzliche Pathogen in die Zelle einzudringen versucht. Es ist also ein Protein mit Ähnlichkeit zu AtRop4 an der Infektionsstelle lokalisiert. Man kann vermuten, daß die Zelle es spezifisch dort lokalisiert. Man kann weiterhin vermu-

ten, daß seine Lokalisation an der Infektionsstelle von funktioneller Bedeutung für die Zelle und die Pathogenabwehr ist.

Daß ein Protein der pflanzenspezifischen Rac-Unterfamilie funktional an der Infektionsabwehr beteiligt ist, zeigen Ono et al. Reispflanzen, die aktivitätsveränderte Formen der kleinen GTPase OsRac1 (sie gehört zur pflanzenspezifischen Unterfamilie der RAC-Familie) exprimieren, zeigen veränderte Reaktionen auf Infektion mit Pathogenen. Werden Reispflanzen, die die konstitutiv aktive Mutante der GTPase OsRac1 exprimieren, mit einem für diese Sorte eigentlich kompatiblen pilzlichen oder bakteriellen Pathogen infiziert, zeigen sie erhöhte Resistenz. Damit korreliert eine erhöhte Produktion des Phytoalexins Momilaktin A. Werden hingegen Reispflanzen, die mit der dominant negativen Mutante von OsRac1 transformiert sind, mit einem inkompatiblen Pilz infiziert, ermöglichen sie diesem weitgehendes Wachstum und sind nicht in der Lage, sich erfolgreich gegen die Infektion zu verteidigen. Erstaunlicherweise ist in diesen Pflanzen die Phytoalexinproduktion gegenüber dem Wildtyp nicht verändert [138]. OsRac1 wirkt also nicht ausschließlich über die Veränderung der Phytoalexinproduktion.

Man bringt die kleinen GTPasen auch in Zusammenhang mit der Erzeugung reaktiver Sauerstoffmoleküle. Zum Beispiel induziert die Expression der GTPase OsRac1 aus Reis in Suspensionszellkultur die vermehrte Erzeugung von H_2O_2 [85]. Die Expression von konstitutiv aktivem OsRac in transgenen Pflanzen führt zu vermehrter Bildung von H_2O_2 , Autofluoreszenz und spontanem Zelltod [138]. Die Erzeugung von H_2O_2 durch OsRac1 kann durch Diphenyliodonium (DPI) verhindert werden. DPI ist ein Inhibitor der NADPH-Oxidase in tierischen Zellen [85].

Auch tierische Zellen verteidigen sich gegen Pathogene durch Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle. Sie besitzen dafür einen aus mehreren Komponenten aufgebauten Komplex, der bei Bedarf assembliert wird. Das wird zum Beispiel bei Nishimoto et al. beschrieben [134]. Die Aktivierung des Komplexes zur Oxidation von NADPH bedeutet gleichzeitig seinen Zusammenbau. Es assoziieren die zytosolischen Komponenten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und Rac mit dem membranständigen Flavocytochroms b_{558} . Der entstehende Komplex ist membranassoziiert. Ähnlich wie in Säugerzellen können auch in Pflanzenzellen reaktive Sauerstoffmoleküle durch einen NADPH-Oxidase-Komplex gebildet werden [204]. Analoge einzelner beteiligter Proteine oder ihrer Untereinheiten sind bereits in Pflanzen identifiziert worden [34, 186]. Xing et al. zeigen, daß die Zugabe von Elizitor zu Suspensionskultur von Tomatenzellen die Translokation der Komponenten $p47^{phox}$, $p67^{phox}$ und Rac aus dem Zytosol zur Membran bewirkt [200]. Reaktive Sauerstoffmoleküle spielen in tierischen Zellen eine wichtige Rolle im programmierten Zelltod. Damit dieser abläuft, müssen die Stoffwechselwege, die normalerweise der Entgiftung reaktiver Sauerstoffmoleküle dienen, wirkungsvoll unterdrückt werden.

Naton et al. untersuchen die Infektion von Petersiliezellen aus Suspensionskultur. Dabei können sie zeigen, daß die intrazelluläre Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle mit dem hypersensitiven Zelltod der untersuchten Zellen kor-

reliert [129]. Die Unterdrückung der Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle führt zu einer Abnahme des hypersensitiven Zelltods bei Zugabe von Elizitor, die Hemmung von Radikalfängern führt zur Zunahme des hypersensitiven Zelltods in Nichtwirtspathogenbeziehungen [69]. Eine NADPH-abhängige Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle wurde in isolierten Membranen von Kartoffelknollen nach deren Verwundung nachgewiesen [35].

Hückelhoven et al. schreiben, daß die Entwicklung von H_2O_2 eng mit der Bildung von effektiven Papillen verbunden ist. Es zeigen nur solche Zellen eine nennenswerte lokale Entwicklung von H_2O_2 , die sich durch Bildung einer Papille effektiv gegen den eindringenden Pilz verteidigen können. Auch Zellen, in denen die H_2O_2 -Bildung geringer ausfällt oder ganz fehlt, bilden unter Umständen Papillen. Diese reichen aber nicht aus, um das Wachstum des Pilzes aufzuhalten [55].

H_2O_2 kann auch als Entwicklungssignal fungieren. Zum Beispiel korreliert die Produktion von H_2O_2 in Baumwollfasern (*Gossypium hirsutum*) zeitlich mit der Bildung sekundärer Wandstrukturen. Inhibition der H_2O_2 -Produktion oder Abfangen des zellulären H_2O_2 verhindern die Differenzierung der sekundären Zellwände, außerdem führt die externe Zugabe von H_2O_2 zur vorzeitigen Bildung sekundärer Wandstrukturen. Expressionsanalysen ergaben, daß die GTPase Rac13 aus *Gossypium hirsutum* (GhRac13) stark exprimiert wird, wenn die Differenzierung sekundärer Zellwände beginnt. Es ergibt sich also zumindest eine zeitliche Korrelation von Differenzierung, Entwicklung von H_2O_2 und Expression der GTPase GhRac13. Daß GhRac13 tatsächlich Einfluß auf die Erzeugung von H_2O_2 hat, zeigen Experimente, bei denen Suspensionskulturzellen von *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max* mit der konstitutiv aktiven Form von GhRac13 transformiert werden und sich deren H_2O_2 -Produktion stark erhöht, während die Transformation mit dominant negativem GhRac13 zu geringerer H_2O_2 -Produktion führt [147]. Welche Bedeutung die Expression der GTPasen GhRac13 und die Entwicklung von H_2O_2 während der Synthese der sekundären Zellwand in Baumwollfasern haben könnten, darüber gibt dieser Artikel keine Auskunft. Ob H_2O_2 möglicherweise direkt an der Bildung der Zellwand beteiligt ist und diese in ähnlicher Weise unterstützt, wie man das bei der Papillenbildung in von Infektion bedrohten Zellen findet, ist nicht bekannt. Man vermutet, daß reaktive Sauerstoffmoleküle an der Bildung bzw. Verfestigung der Papille in der Weise beteiligt sind, daß sie dort abgelagerte Substanzen durch Oxidationsreaktionen miteinander verbinden und so zur Verhärtung der Ablagerung führen [160].

Auch für kleine GTPasen der Rop-Unterfamilie ergeben sich zwei mögliche Wege der Beteiligung an der Pathogenabwehr in infizierten Pflanzenzellen. Der eine Weg ist die Steuerung der Entwicklung reaktiver Sauerstoffmoleküle, die sowohl mit der Bildung von Papillen, als auch mit dem hypersensitiven Zelltod in Zusammenhang stehen [100, 102, 129, 160, 164]. Die andere mögliche Form der Beteiligung ist die Einflußnahme auf die Architektur von Aktinfilamenten, wie

sie in Hefe in Hefe beschrieben wurde [204].

Auch in permeabilisierten Blutplättchen beeinflusst Rac die Dynamik der Aktinfilamente, nämlich ihre Bereitschaft, zur Polymerisation zur Verfügung zu stehen. In menschlichen Blutplättchen stellen Rac und PIP₂ Komponenten der Signaltransduktionskette dar, die durch TRAP, ein Thyrosin-Rezeptor-assoziiertes Peptid, induziert wird und zum “Uncapping” von Aktinfilamenten an deren Plus-Ende führt. Aktinfilamente, deren Enden nicht mehr durch ein “Capping Protein” besetzt sind, können durch Anlagerung von Aktinmonomeren verlängert werden. Dieser Prozeß der Filamentverlängerung wird auch durch Profilin unterstützt [63]. In tierischen Zellen sind Phospholipidkinasen Effektoren der GTPasen der Rho-Familie, bestimmte Kinasen sind bestimmten GTPasen zugeordnet, Rac und Cdc42 aktivieren PI-3-Kinasen, während PIP-Kinasen Effektoren der Rho-Unterfamilie sind [204]. Die Expression von Aktivitätsmutanten von AtRac2 in wachsenden Pollenschläuchen führt zu einer drastisch veränderten Aktinarchitektur [95].

4.3.2 Analogien zum Spitzenwachstum?

Die meisten pflanzlichen Zellen wachsen durch diffuses oder diffuses polares Wachstum [45], besonders spezialisierte Zellen zeigen jedoch während ihrer Entwicklung Spitzenwachstum [70]. Beispiele hierfür sind keimende Farnsporen und Moosprotonemata, aber auch die gut untersuchten Pollenschläuche und Wurzelhaare [45, 124, 171]. Spitzenwachstum setzt eine starke Polarisierung der wachsenden Zelle voraus. Die Zellelongation geschieht durch Sekretion von Zellwandmaterial am Wachstumspol, an der Zellspitze. Starke zytoplasmatische Aktivität ist am Wachstumspol von Pollenschläuchen zu beobachten, Vesikel, die Vorläufermoleküle von Zellwandbestandteilen enthalten (“Cargo-Vesikel”), werden zum Wachstumspol gebracht und verschmelzen dort mit der Plasmamembran, wodurch sowohl die Zellwand als auch die Plasmamembran wachsen [42]. Zytoplasmaströmung geschieht entlang longitudinaler Aktinfilamente oder -filamentbündel, am Wachstumspol aber sind keine Filamentbündel zu erkennen, sondern ein dichtes Netzwerk aus eher feinen Aktinfilamenten [96]. Hier ergibt sich die erste und auffallendste Analogie zwischen Spitzenwachstum und Pathogenabwehr. Von Pathogeninvasion bedrohte Zellen haben zwar nicht notwendig einen Wachstumspol, es stellt aber die Stelle der versuchten oder erfolgenden Infektion ein Zentrum hoher zytoplasmatischer Aktivität dar, sie bildet einen neuen Aktivitätspol der Zelle. Zu ihm orientieren sich die transvakuolären Zytoplasmastränge entlang von Aktinfilamentbündeln [92]. Der Zellkern begibt sich in einem Großteil der untersuchten Zellen in die Nähe des Aktivitätspols [43, 54], wie auch in Wurzelhaaren der Zellkern in der Nähe des Wachstumspols zu finden ist [6]. Dieser Prozeß ist anfällig gegenüber Cytochalasin. Werden Suspensionskulturzellen von *Petroselinum crispum* vor oder während einer Infektion oder simulierten Infektion mit dem Inhibitor der Aktinpolymerisation behandelt, sind Reorientie-

zung der Zytoplasamstränge und Kernwanderung nicht zu beobachten [50, 54]. Auch in Gerste und *Arabidopsis thaliana* wird durch Cytochalasin Nichtwirtpathogenen eine erfolgreiche Infektion ermöglicht [93, 105]. Cytochalasine wirken auch auf das Spitzenwachstum inhibitorisch [6, 18].

Die Untersuchung des Aktin-bindenden Proteins Profilin zeigte, daß Profilin an der Infektionsstelle lokalisiert ist. Über die Funktion dieser Lokalisation am Aktivitätspol können nur Vermutungen angestellt werden. Man weiß, daß Profilin auch am Wachstumspol von Wurzelhaaren und Pollenschläuchen zu finden ist. In Pollenschläuchen wurde Profilin mittels Antikörperfärbung nachgewiesen [123]. In wachsenden Wurzelhaaren sind sowohl Profilinals auch seine mRNA am Wachstumspol zu finden [6]. Die Autoren zeigen auch, daß diese Lokalisation von einem funktionierenden Aktinskelett abhängt [6]. Das suggeriert, daß die Lokalisation von Profilin durch Aktin bestimmt wird, möglich ist aber auch, daß Profilin die Orientierung und Dynamik von Aktinfilamenten lokal beeinflusst und diese wiederum die Lokalisation von Profilin am Wachstumspol aufrechterhalten. Einen Hinweis auf mögliche Funktionen von Profilin für das Wachstum des Wurzelhaares könnten Ramachandran et al. geben. Keimlinge mit reduziertem Profilin-Gehalt (PFN-U) haben kürzere Wurzelhaare, während die Wurzelhaare von Pflanzen, die PRF1 überexprimieren (PFN-O), ungefähr doppelt so lang sind wie die von Wildtyppflanzen [149]. Hingegen schreiben McKinney et al., daß Keimlinge, deren Profilin-Gehalt *unter* dem des Wildtyps liegt, mehr und längere Wurzelhaare haben als Wildtypkeimlinge [27]. Im letzteren Fall erklären das die Autoren damit, daß durch fehlendes Profilin in der Zelle weniger G-Aktin sequestriert wird und so mehr Aktinmonomere zur Filamentelongation zur Verfügung stehen. Keiner der beiden Artikel geht auf die Ergebnisse des anderen ein.

Mit PIP₂ und der Rop-GTPase werden in dieser Arbeit zwei weitere, am Wachstumspol von Pollenschläuchen und Wurzelhaaren lokalisierte Substanzen untersucht. PIP₂ ist in Wurzelhaaren an der Spitze zu finden [18], Kost et al. zeigen, daß die Lokalisation von PIP₂ am Wachstumspol von Pollenschläuchen und die Zugänglichkeit für seine Bindungspartner entscheidend für das korrekte Wachstum von Pollenschläuchen sind [95]. PIP₂ ist als Vorläufer der Signalmoleküle IP₃ und DAG bekannt. Zunehmend wird seine Bedeutung als eigenes Signalmolekül erkannt [71]. PIP₂ wird, wenn es Profilin bindet, dadurch vor der Hydrolyse durch die phosphoinositid-spezifische Phospholipase C (PLC) geschützt, aber nur, solange letztere nicht phosphoryliert ist. Die Phosphorylierung der PLC ermöglicht es dem Enzym, PIP₂ auch dann zu hydrolysieren, wenn es an Profilin gebunden ist. Dabei entstehen IP₃ und DAG. Außerdem wird Profilin freigesetzt, das nun nicht länger durch PIP₂ gebunden ist. Die Hydrolyse von PIP₂ ist also *eine* Möglichkeit, regulierend in die Dynamik von Aktinfilamenten einzugreifen.

In menschlichen Blutplättchen stellen Rac und PIP₂ Komponenten der Signaltransduktionskette dar, die durch TRAP, ein Thyrosin-Rezeptor-assoziiertes Peptid induziert wird und zum "Uncapping" von Aktinfilamenten an deren Plus-Ende führt und so Filamentverlängerung ermöglicht. Dieser Prozeß der Fila-

mentverlängerung wird auch durch Profilin unterstützt [63]. In tierischen Zellen sind Phospholipidkinasen Effektoren der GTPasen der Rho-Familie, bestimmte Kinasen sind bestimmten GTPasen zugeordnet, Rac und Cdc42 aktivieren PI-3-Kinasen, während PIP-Kinasen Effektoren der Rho-Unterfamilie sind [204].

GTPasen stellen einen "Hauptschalter" in der Entwicklung zellulärer Polarität dar. Ihrer Regulation unterliegen mehrere Aspekte zellulärer Polarität, sie sind sowohl an der Definition der Stelle, an der das Wurzelhaar auswachsen wird, als auch an der Regulation und Aufrechterhaltung des Wurzelhaarwachstums beteiligt [46]. Die Überexpression der konstitutiv aktiven Aktivitätsmutante von Rop in Pollenschläuchen von Tabak führt zu einer gravierend veränderten Aktin-Organisation [186]. Rop1 ist in Pollenschläuchen von Erbsen an der Spitze des Pollenschlauches zu finden. Das Wachstum des Pollenschlauches kommt zum Erliegen, wenn Antikörper gegen Rop1 injiziert werden. Man nimmt an, daß Rop1 außerdem eine Rolle spielt bei der Selektion der Stelle, an der das Pollenkorn keimen wird [104, 203].

Auch die Überexpression von AtRac2 und, noch mehr, ihrer konstitutiv aktiven Aktivitätsmutante führen zu veränderter Architektur des Aktinskeletts und zu veränderter Morphologie des wachsenden Pollenschlauches. Die Expression der dominant negativen Aktivitätsmutante läßt das Pollenschlauchwachstum sofort zum Erliegen kommen [95].

Außerdem zeigen Kost et al., daß die GTPase AtRac2 mit der Phosphatidylinositolphosphatkinase PI-4-P-5-Kinase in physische Interaktion tritt. Die Kinase stellt also wahrscheinlich einen Effektor der GTPase dar und PIP₂ ein Signalmolekül im Signalweg unterhalb der GTPase [95].

PIP₂ und Rho-GTPasen sind also Teil der Signaltransduktionskette, deren Ziel die Architektur der Aktinfilamente ist, möglicherweise übt diese Signalkaskade ihre Wirkung auch über Profilin aus.

Ob es einen ähnlichen Signalweg in infizierten Zellen gibt, kann noch nicht gesagt werden. In Immunlokalisationsexperimenten wurde die Lokalisation von Rop und Profilin an der Infektionsstelle gezeigt, zu der sich die Aktinfilamente ausrichten. Infektionsexperimente mit aktivitätsveränderten Mutanten kleiner GTPasen lassen ihre Beteiligung an der Ablagerung von Kallose gegen den eindringenden Pilz vermuten. Die Erhebung dieser Daten ist aber nicht umfangreich genug, um darauf eine Aussage gründen zu können. Außerdem sind in jüngster Vergangenheit zwei Artikel erschienen, die zeigen, daß die Fähigkeit einer Zelle, Kallose gegen eindringende Pathogene abzulagern, nicht mit ihrer Fähigkeit korreliert, das Pathogen erfolgreich abzuwehren [78, 133].

Es stehen noch Experimente aus, die die tatsächliche funktionale Beteiligung der untersuchten Komponenten an der Pathogenabwehr belegen. Außerdem sind weitere Experimente nötig, um weitere Signalkomponenten zu identifizieren bzw. den Signalweg bei Infektion aufzuklären.

Trotz der Analogien, die zwischen Spitzenwachstums- und Verteidigungsprozessen bestehen, müssen auch die gravierenden Unterschiede betrachtet werden.

Bei der Pathogenabwehr handelt es sich nicht um einen Wachstums-, sondern um einen Verteidigungsprozeß. An seinem Ende steht, bei erfolgreicher Pathogenabwehr, entweder der hypersensitive Zelltod (als eine Form des programmierten Zelltods) oder die Wiederaufnahme normaler metabolischer Aktivität, wenn das Pathogenwachstum außerhalb der Zellmembran zum Stillstand gebracht werden konnte. Der Aufbau einer mechanischen Barriere ist, zusammen mit biochemischen und genetischen Veränderungen in der Zelle, ein wirksames Mittel, um die Infektion aufzuhalten. Um diese Barriere, die Papille, aufzubauen, wird Material an der Zellwand entlang der Plasmamembran abgelagert [160]. Vesikel, die dieses Material enthalten, werden durch Zytoplasmaströmung entlang von Aktinfilamentbündeln zur Infektionsstelle gebracht, wo sie mit der Membran verschmelzen [172]. Dabei wächst die Zelle nicht (wie im Falle des Spitzenwachstums), sondern es wird die Zellwand mechanisch verstärkt.

Es gibt keine Belege dafür, daß bei der Pathogenabwehr Aktinfilamente durch ihr Wachstum oder der Turgor der Zelle dem eindringenden Pathogen mechanischen Druck entgegensetzen. Man nimmt aber an, daß bei Wachstumsprozessen wie dem Spitzenwachstum der Turgor der Zelle die Kraft darstellt, die die Ausdehnung der Zelle bei mechanisch dehnbarer Zellwand vorantreibt. Neuerdings gibt es Überlegungen, daß auch das Wachstum der Aktinfilamente eine treibende Kraft für die Ausdehnung der Zelle darstellt [7]. In tierischen Zellen ist es tatsächlich das lokale Wachstum der Aktinfilamente, dem die Plasmamembran folgt und das so die Form der Zelle bestimmt, es bewirkt sogar die Fortbewegung einzelner Zellen. Ein eindrucksvolles Beispiel hierfür ist die intrazelluläre Fortbewegung des intrazellulären Parasiten *Listeria monocytogenes*. Sie wird allein durch die Polymerisation von Aktin zu Filamenten vorangetrieben [120].

Bei allen gegebenen Unterschieden, die zwischen Infektionsabwehr und Spitzenwachstum und natürlich auch zwischen verschiedenen Zellen, die Spitzenwachstum zeigen, bestehen, kann man durch Beobachtung der Spitzenwachstumsprozesse zu Hypothesen über Prozesse der Pathogenabwehr gelangen, die sich experimentell überprüfen lassen und Erkenntnisgewinn über die Verteidigungsreaktionen der Pflanze versprechen.

Anhang A

cDNA-Sequenzen der Profiline aus *Petroselinum crispum*

```

      .           .           .           .
1  GAATTCGGCACGAGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGGAGAGTGAATCAAGAG  50
      .           .           .           .
51  AGGATGTCGTGGCAAGCATATGTAGACGATCATTGTGTTGTGTGAGGTTGA  100
      M S W Q A Y V D D H L L C E V E
      .           .           .           .
101 AGGTAATCCCGGCCAACACCTCTCAGCCGCCCATCATCGGTCATGACG  150
      G N P G Q H L S A A A I I G H D G
      .           .           .           .
151 GTAGCGTTTGGGCTCAGAGCTCCTCATTCCCCAACTTTAAACCTGAAGAG  200
      S V W A Q S S S F P N F K P E E
      .           .           .           .
201 ATTGCTGGTATTATGAAAGACTTTGATGAACCTGGCCATCTTGCTCCTAC  250
      I A G I M K D F D E P G H L A P T
      .           .           .           .
251 TGGACTGTACCTTGGTGAACAAAGTACATGGTGATTCAAGGAGAGCCTA  300
      G L Y L G G T K Y M V I Q G E P N
      .           .           .           .
301 ATGCTGTTATTCGTGGCAAAAAGGGCTCTGGAGGTGTGACCATTAAGAAA  350
      A V I R G K K G S G G V T I K K
      .           .           .           .
351 ACTGGCCTTGCCCTAGTGTGGAGTCTATGATGAACCTGTAACCTCCAGG  400
      T G L A L V F G V Y D E P V T P G
      .           .           .           .
401 ACAGTGCAATCTGATTGTGGAGAGGCTGGGAGATTATCTCATTGAGCAGG  450
      Q C N L I V E R L G D Y L I E Q G
      .           .           .           .
451 GCCTCTAGGCTTTCTTCTGAAGGCATTTATTACTTTATATATCTTTGATT  500
      L *
      .           .           .           .
501 TGTGGGTATGTGGTTTGTGCTTCTAGTATCTATGGGCTGCACTAGCATT  550
      .           .           .           .
551 GGAGTAGTGTGGCTGAAAAATAACAATGTGACTTGTACCCGTTGGTGG  600
      .           .           .           .
601 GCACTTAAATAGTGGTATTATCCATCTTGGGTATTCATACCATATGTATT  650
      .           .           .           .
651 CGNTATAGNGTTTATAATTACTGATGGGATATTTGCTAANCTTCTGAAAT  700
      .           .           .           .
701 GNGAGANTTGACGTTTTTGGATTATATGTTGCATGANCAAGGGNCCNTTGG  750
      .           .           .           .
751 CTGCCTTNTTNTTTTAAATGNAATTATCGCAGAATTAGCTTTTTTTGTA AAA  800
      .
801 AAAAAAAAAA  811

```

Abb. A.1: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PcPRF1

```

1  CACGAGCTCGTGCCGGTCTTTGCAAAATCAGATCGAATTCAAACAATCAA 50
51 AACGATGTCGTGGCAAGCTTATGTTGACGATCATCTTATGTGCGAGATTG 100
    M S W Q A Y V D D H L M C E I E
101 AAAACAATCCCGGTCAAACCCTAACCGCCGCGCTATTATCGGCCACGAC 150
    N N P G Q T L T A A A I I G H D
151 GGCAGCGTTTGGGCTCAGAGCTCCACTTTTCCTCAGGTTAAGCCTGAAGA 200
    G S V W A Q S S T F P Q V K P E E
201 GATTTCTGGTATTATGAAAGACTTTGATGAGCCTGGCTACCTTGCTCCTA 250
    I S G I M K D F D E P G Y L A P T
251 CTGGATTGTACCTCGGTGGAGCAAAGTACATGGTTATTCAAGGAGAGCCA 300
    G L Y L G G A K Y M V I Q G E P
301 AACGCTGTTATTCGTGGCAAAAAGGGCTCTGGAGGTGTGACCATAAAGAA 350
    N A V I R G K K G S G G V T I K K
351 AACAGGCCTAGCTCTAGTTTTTCGGAGTCTATGATGAACCTGTTACTCCAG 400
    T G L A L V F G V Y D E P V T P G
401 GACAATGCAACATGATTGTTGAGAGGCTGGGGGATTACCTTATTGAGCAG 450
    Q C N M I V E R L G D Y L I E Q
451 GGCATGTAGGTTCCTTTTCAAGTCAATACATTGCTTTCTAAAATTTCAAC 500
    G M *
501 ATGTTGGTTATATGGTTTTTGTCTTTAGTTATCTGTGTATGACTGATT 550
551 TGGCAGCGGGGAATGTTGGCTGTAATATAACAGTGGTGAACCACCCAGTT 600
601 TGGTTTTTTAGTTAGTTTTATCATCTTCCGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 649

```

Abb. A.2: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PcPRF2

```

      .           .           .           .
1  GAATTCGGCACGAGGAGAAAAGGAGAGAGAGAAAAGAGAGTTGAATCAAGAG  50
      .           .           .           .
51  AGGATGTCGTGGCAAGCATATGTAGACGATCATCTGTTGTGTGAAGTTGA  100
      M S W Q A Y V D D H L L C E V E
      .           .           .           .
101  AGGTAATCCCGGTCAGCACCTCTCCGCCGCCATCATCGGTCACGACG  150
      G N P G Q H L S A A A I I G H D G
      .           .           .           .
151  GCAGCGTTTGGGCTCAGAGCTCCTCTTTTCCCAAATTTAAACCTGAAGAG  200
      S V W A Q S S S F P K F K P E E
      .           .           .           .
201  ATTGCTGGTATTATGAAAGACTTTGATGAACCTGGCCATCTTGCTCCCAC  250
      I A G I M K D F D E P G H L A P T
      .           .           .           .
251  TGGACTGTACCTTGGTGAACAAAGTATATGGTGATTCAAGGAGAGCCTA  300
      G L Y L G G T K Y M V I Q G E P N
      .           .           .           .
301  ATGCTGTTATTCGTGGCAAAAAGGGCTCCGGAGGTGTGACCATTAAAAAA  350
      A V I R G K K G S G G V T I K K
      .           .           .           .
351  ACTGGCCTAGCCCTAGTGTTCCGAGTCTATGATGAACCTGTGACTCCAGG  400
      T G L A L V F G V Y D E P V T P G
      .           .           .           .
401  ACAATGCAATCTGATTGTCGAGAGGCTCGGAGATTATCTCATTGAGCAGG  450
      Q C N L I V E R L G D Y L I E Q G
      .           .           .           .
451  GCATGTAGGCTTCTTCTGAAGACATTTATTACTTTATATATCTTTGATTT  500
      M *
      .           .           .           .
501  GTTGGGTATGTGGCTTGTGCTTCTAGCATCTATGGGCTGTAGCATTGGAG  550
      .           .           .           .
551  TAGTGTGGCTGAAAAATAACAATACGACTTGTTATCCCGTGTGGGTA  600
      .           .           .           .
601  CTTAAGTAGTGTTGGTATCCATCTTTAGTTACTCCATACCATCTGNATTC  650
      .           .           .           .
651  TTTATAGGCTTTTATAATTACCTGATGGNACTGGTGCTAAAACCTTTTAAA  700
      .           .           .           .
701  TGTGAGATTTTGACCGTTATTTGATTTATATGTTGGCATGATTAANGGGC  750
      .           .           .           .
751  CTTTGGCTGCCTTTNTTTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  790

```

Abb. A.3: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PcPRF3

1	GAATTCGGCAGCAGCACACACAGTCTTTGCAAAATCAGATCGAATTCAA	50
51	CAATCAAAACGATGTCGTGGCAAGCTTATGTTGACGATCATCTTATGTGT M S W Q A Y V D D H L M C	100
101	GAGATTGAAAACAATCCCGGTCAAACCCTAACCGCCGCCGCTATTATCGG E I E N N P G Q T L T A A A I I G	150
151	CCACGACGGCAGCGTTTGGGCTCAGAGCTCCACTTTTCCTCAGGTTAAGC H D G S V W A Q S S T F P Q V K P	200
201	CTGAAGAGATTGCTGGTATTATGAAAGACTTTGACGAGCCTGGCTACCTT E E I A G I M K D F D E P G Y L	250
251	GCTCCTACTGGATTGTACCTTGGTGGAGCAAAGTACATGGTTATTCAAGG A P T G L Y L G G A K Y M V I Q G	300
301	AGAGCCTAACGCTGTTATTTCGTGGCAAAAAGGGCTCTGGAGGTGTGACCA E P N A V I R G K K G S G G V T I	350
351	TAAAGAAAACAGGCCTAGCTCTAGTTTTTCGGAGTCTATGATGAACCTGTT K K T G L A L V F G V Y D E P V	400
401	ACTCCAGGACAATGCAACATGATTGTTGAGAGGCTGGGGGATTACCTTAT T P G Q C N M I V E R L G D Y L I	450
451	TGAGCAGGGCATGTAGTTCCCTTTTCAAGTCAAAACATTACTTTCTAAAA E Q G M *	500
501	TTTGAACATGTTGGTTATATGGTTTTTGCTGCTTTAGTTATCTGTGTATG	550
551	ACTGATTTGGCAGCGGGAATGTTGGCTGTAATATAACAGTGGTGAACCA	600
601	CCCAGTTTGGTTTTTTTAGTTAGTATCATCTCCGCAACTCTTATTATCTG	650
651	CATTATAGNGTTTGATATTAATGATTATACTTTGGTTGAAAAAAAAAAAA	700
701	AAAAAAAAA	708

Abb. A.4: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PcPRF4

```

      .       .       .       .
1  GAATTCGGCACGAGATTATCTGCAGCAGTACAGAACAATCCCCTGCAA 50
      .       .       .       .
51  GCTTAACTTGTACGCGACACTCCTTTTTATTCCCATCATCTTCATTACAC 100
      .       .       .       .
101 ACCCCTTCACTGAACAAAACCAAACCAATCTATACATACATTTACACACA 150
      .       .       .       .
151 CTA AAAACACACACTCTTGTCTGAAGCGAAAATGTCGTGGCAATCATATG 200
      .       .       .       .
      M S W Q S Y V
201 TAGATGACCACTTAATGTGTTTAACTGAAGAAGGCAACCAGCTTTCTGCT 250
      .       .       .       .
      D D H L M C L T E E G N Q L S A
251 GCTGCTATTATTGGCCATGATGGCTCTGTTTGGGCTCAAAGTGATACTTT 300
      .       .       .       .
      A A I I G H D G S V W A Q S D T F
301 TCCTCAGTTTAAACCAGAAGAAATTACCGCAATAATGAAAGACTTCGATG 350
      .       .       .       .
      P Q F K P E E I T A I M K D F D E
351 AACCTGGATCTCTTGCACCTACTGGCTTATACCTAGGTGGCACAAAGTAT 400
      .       .       .       .
      P G S L A P T G L Y L G G T K Y
401 ATGGTGATTCAAGGTGAACCTAATGCTGTCATACGAGGAAAGAAGGGATC 450
      .       .       .       .
      M V I Q G E P N A V I R G K K G S
451 TGGGGGTGTCACTATCAAGAAGAGCAATCAAGCTTTACTAATTGGTATAT 500
      .       .       .       .
      G G V T I K K S N Q A L L I G I Y
501 ACGAGGAGCCTATGCCTCCAGGTCAGTGCAACGTTGTTGTTGAAAGGTTG 550
      .       .       .       .
      E E P M P P G Q C N V V V E R L
551 GGAGACTATCTCATCGACCAGGTCTGTAATTTTCAGTCAAATGGAATCAA 600
      .       .       .       .
      G D Y L I D Q G L *
601 ACAACTATTGGGGGGGTTGCTACTTTTAAAGGTGGGATCAATCATTA 650
      .       .       .       .
651 ATCACTCATGTGCCAACTCTTTTTTCCAAAAATTGGGATTCATCTACCCT 700
      .       .       .       .
701 TTTTTTCATTTTGGTTTTTGGGGTTTTGGGGAGCCATGGGTCCCCCTGGT 750
      .       .       .       .
751 TNTTAAAAAAAAAAAA 764

```

Abb. A.5: cDNA- und abgeleitete Aminosäuresequenz von PcPRF5

Literaturverzeichnis

- [1] **Aist, J.R.** (1976) Papillae and related wound plugs of plant cells. *Ann. Rev. Phytopathol.* **14**, 145-163.
- [2] **Allan, A.C., Fluhr, R.** (1997). Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells, *Plant Cell* **9**, 1559-1572.
- [3] **An, Y.Q., McDowell, J.M., Huang, S., McKinney, E.C., Chambliss, S., Meagher, R.B.** (1996) Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* **10**, 107-121.
- [4] **Arbuzova, A. Martushova, K., Hangyás-Mihályiné, G., Morris, A.J., Ozaki, S., Prestwich, G.D., McLaughlin, S.** (2000). Fluorescently labeled neomycin as a probe of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate in membranes, *Biochim Biophys Acta* **1464**, 35-48.
- [5] **Ballweber, E., Giehl, K., Hannappel, E., Huff, T., Jockusch, B.M., Mannherz, H.G.** (1998). Plant profilin induces actin polymerization from actin β -thymosin complexes and competes directly with β -thymosins and with negative co-operativity with DNase I for binding to actin, *FEBS* **425**, 251-255.
- [6] **Baluška, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, J., Chua, N.-H., Barlow, P.W., Volkmann, D.** (2000) Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Dev. Biol.* **227**, 618-632.
- [7] **Baluška, F., Volkmann, D.** (2002) Pictures in cell biology: Actin-driven polar growth of plant cells. *Tr. Cell. Biol.* **12**, 14.xfein
- [8] **Baluška, F., von Witsch, M., Peters, M., Hlavačka, Volkmann, D.** (2001). Mastoparan alters the subcellular distribution of profilin and remodels F-actin cytoskeleton in cells of maize root apices, *Plant Cell Phys* **42**, 912-922.
- [9] **Bischoff, F., Molendijk, A.J., Rajendrakumar, C. S. V., Palme, K.** (1999) GTP-binding proteins in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**, 233-256.
- [10] **Bischoff, F.** (1999) GTPasen als zentrale Regulatoren pflanzenspezifischer Prozesse. Isolierung und Charakterisierung von RAB- und ROP-GTPasen aus *Arabidopsis thaliana*, Dissertation, vorgelegt an der Universität zu Köln.
- [11] **Bishop, A. L., and Hall, A.** (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem. J.* **348**, 241-255.

- [12] **Blanchoin, L., Amann, K.J., Higgs, H.N., Marchand, J.-B., Kaiser, D.A., Pollard, T.D.** (2000). Direct observation of dendritic actin filament networks nucleated by Arp2/3 complex and WASP/Scar proteins, *Nature* **4004**, 1007-1011.
- [13] **Blanchoin, L., Pollard, T.D., Mullins, R.D.** (2000). Interactions of ADF/cofilin, Arp2/3 complex, capping protein and profilin in remodeling of branched actin filament networks, *Curr Biol* **10**, 1273-1282.
- [14] **Blanchoin, L., Robinson, R.C., Choe, S., Pollard, T.D.** (2000). Phosphorylation of *Acanthamoeba* Actophorin (ADF/cofilin) blocks interaction with actin without a change in atomic structure, *J Mol Biol* **295**, 203-211.
- [15] **Blasco, R., Cole, N.B., Moss, B.** (1991). *J Virol* **65**, 4598-4608.
- [16] **Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., Scheel, D.** (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley, *Plant Cell* **12**, 1425-1440.
- [17] **Boronenkov, I.V., Loijens, J.C., Umeda, M., Anderson, R.A.** (1998). Phosphoinositide signaling pathways in nuclei are associated with nuclear speckles containing pre-mRNA processing factors, *Molecular Biology of the Cell* **9**, 3547-3560.
- [18] **Braun, M., Baluška, F., von Witsch, M., Menzel, D.** (1999) Redistribution of actin, profilin and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂) in growing and maturing root hairs. *Planta* **209**, 435-443.
- [19] **Bubb, M.R., Baines, I.C., Korn, E.D.** (1998). Localization of actobindin, profilin I, profilin II, and phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP₂) in *Acanthamoeba castellanii*, *Cell Motility and the Cytoskeleton* **39**, 134-146.
- [20] **Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S., Jockusch, B.M.** (1991). *Cell Motil. Cytoskeleton* **22**, 51-61.
- [21] **Carlsson, L., Nystrom, L.E., Sundkvist, I., Markey, F., Lindberg, U.** (1977). *J Mol Biol* **115**, 465-483.
- [22] **Carver, T.L.W., Ingerson-Morris, S.M., Thomas, B.J., Zeyen, R.J.** (1995). Early interactions during powdery mildew infection, *Can J Bot* **73**, S632-639.
- [23] **Chen, C. Y., and Heath, M. C.** (1991) Cytological studies of the hypersensitive death of cowpea epidermal cells induced by basidiospore-derived infection by the cowpea rust fungus. *Can. J. Bot.* **69**, 1199-1206.

- [24] **Christensen, H.E.M., Ramachandran, S., Tan, C.-T., Surana, U., Dong, C.-H., Chua, N.-H.** (1996). *Arabidopsis* profilins are functional similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen specific profilin, *Plant J* **10**, 269-279.
- [25] **Chuang, C.F., Meyerowitz, E.M.** (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*, *Proc Natl Sci USA* **97**, 4985-4990.
- [26] **Clarke, S.R., Staiger, C.J., Gibbon, B.C., Franklin-Tong, V.E.** (1998). A potential role for profilin in pollen of *Papaver rhoeas*, *Plant Cell* **10**, 967-979.
- [27] **Cohen McKinney, E., Kandesamy, M.K., Meagher, R.B.** (2001). Small changes in the regulation of one *Arabidopsis* profilin isovariant, PRF1, alter seedling development, *Plant Cell* **13**, 1179-1191.
- [28] **Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrinck, E., Qiu, J.-L., Hükelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C., Schulze-Lefert, P.** (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall, *Nature* **425**, 973-977.
- [29] **Cooper, J.A., Schafer, D.A.** (2000) Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Op. Cell Biol.* **12**, 97-103.
- [30] **Cuypers, B., Hahlbrock, K.** (1988). , *Can J Bot* **66**, 700-705.
- [31] **Cuypers, B., Schmelzer, E., Hahlbrock, K.** (1988) In situ localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**, 157-160.
- [32] **Dangl, J.L., Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection, *Nature* **411**, 826-833.
- [33] **Dangl, J.** (1999). Long view from a high plateau, *Nature* **401**, 543-544.
- [34] **Desikan, R., Hancock, J.T., Coffey, M.J., Neill, S. J.** (1996). Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme, *FEBS Lett* **382**, 213-217.
- [35] **Doke, N.** (1985). NADPH-dependent O₂-generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*., *Physiol Plant Pathol* **27**, 311-322.

- [36] **Drøbak, B.K., Watkins, P.A.C., Valenta, R., Dove, S.K., Lloyd, C.W., Staiger, C.J.** (1994). Inhibition of plant plasma membrane phosphoinositide phospholipase C by the actin-binding protein, profilin, *Plant J* **6**, 389-400.
- [37] **Edwardson, J.M.** (1998). Membrane fusion: All done with SNAREpins?, *Curr Biol* **8**, R390-R393.
- [38] **Ellis, J., Dodds, P., Pryor, T.** (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes, *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 278-284.
- [39] **Feldbrügge, M., Sprenger, M., Hahlbrock, K. Weisshaar, B.** (1997). PcMYB1, a novel plant protein containing a DNA-binding domain with one MYB repeat, interacts in vivo with a light-regulatory promoter unit, *The Plant Journal* **11**, 1079-1093.
- [40] **Feys, B.J., Parker, J.E.** (2000). Interplay of signaling pathways in plant disease resistance, *Trends in Genetics* **16**, 449-455.
- [41] **Fire, A., Xu, S.Q., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C.** (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature* **391**, 806-811.
- [42] **Franklin-Tong, V.E.** (1999). Signaling and the modulation of pollen tube growth, *Plant Cell* **11**, 727-738.
- [43] **Freytag, S., Arabatzis, N., Hahlbrock, K., Schmelzer, E.** (1994). Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato/*Phytophthora infestans* interactions., *Planta* **194**, 123-135.
- [44] **Fritzemeier, K.-H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D., Hahlbrock, K.** (1987) Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNA in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*, *Plant Phys* **85**, 34-41.
- [45] **Fu, Y., Li, H., Yang, Z.** (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-Actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis, *Plant Cell* **14**, 777-794.
- [46] **Fu, Y., Yang, Z.** (2001). Rop GTPase: a master switch of cell polarity development in plants., *Tr Plant Sci* **6**, 545-547.
- [47] **Gerdes, H.-H., Kaether, C.** (1996). Green fluorescent protein: applications in cell biology, *FEBS Letters* **389**, 44-47.

- [48] **Gibbon, B.C., Ren, H., Staiger, C.J.** (1997). Characterization of maize (*Zea mays*) pollen profilin function *in vitro* and in live cells, *Biochem J* **327**, 909-915.
- [49] **Gibbon, B.C., Zonia, L.E., Kovar, D.R., Hussey, P.J., Staiger, C.J.** (1998). Pollen profilin function depends in interaction with proline-rich motifs, *Plant Cell* **10**, 981-993.
- [50] **Gross, P., Julius, C., Schmelzer, E., Hahlbrock, K.** (1993). Translocation of cytoplasm and nucleus to fungal penetration sites is associated with depolymerization of microtubules and defence gene activation in infected cultured parsley cells, *EMBO* **12**, 1735-1744.
- [51] **Gu, J., Stephenson, C.G., Iadarola, M.J.** (1994). Recombinant proteins attached to a Nickel-NTA column: use in affinity purification of antibodies, *BioTechniques* **17**, 257-262.
- [52] **Guillén, G., Valdés-López, V., Noguez, R., Olivares, J., Rodríguez-Zapata, L.C., Pérez, H., Vidali, L., Villanueva, M.A., Sánchez, F.** (1999). Profilin in *Phaseolus vulgaris* is encoded by two genes (only one expressed in root nodules) but multiple isoforms are generated *in vivo* by phosphorylation on tyrosine residues, *Plant J* **19**, 497-508.
- [53] **Gungabissoon, R. A., Jiang, C.-J., Drøbak, B. K., Maciver, S. K., Hussey, P. J.** (1998). Interaction of maize actin-depolymerising factor with actin and phosphoinositides and its inhibition of plant phospholipase C, *Plant J* **16**, 689-696.
- [54] **Gus-Mayer, S., Naton, B., Hahlbrock, K., Schmelzer, E.** (1998). Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley, *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 8398-8403.
- [55] **Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C., Kogel, K.-H.** (1999). Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation, *Plant Phys* **119**, 1251-1260.
- [56] **Hülkamp M., Schnittger A.** (1998) Spatial regulation of trichome formation in *Arabidopsis thaliana*, *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9(2)**, 213-220.
- [57] **Haarer, B.K., Lillie, S.H., Adams, A.E.M., Magdolen, V., Bandlow, W., Brown, S.S.** (1990). Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells, *J Cell Biol* **110**, 105-114.

- [58] **Hahlbrock, K., Scheel, D.** (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism, *Ann Rev Plant Phys Plant Mol Biol* **78**, 350-357.
- [59] **Hall, A.** (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton, *Science* **279**, 509-514.
- [60] **Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Journal of Molecular Biology* **43**, 491-526.
- [61] **Hanson, M. R., Köhler, R. H.** (2001). GFP imaging: methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants, *J Exp Bot* **52**, 529-539.
- [62] **Hansson, A., Skoglund, G., Lassinf, I., Lindberg, U., Ingelman-Sundberg, M.** (1988). Protein kinase-C dependent phosphorylation of profilin is specifically stimulated by phosphoinositol bisphosphate (PIP₂), *Biochem Biophys Res Commun* **150**, 526-531.
- [63] **Hartwig, J.H., Bokoch, G.M., Carpenter, C.L., Janmey, P.A., Taylor, L.A., Toker, A., Stossel, T.P.** (1995). Thrombin receptor ligation and activated Rac uncap actin filament barbed ends through phosphoinositide synthesis in permeabilized human platelets, *Cell* **82**, 643-653.
- [64] **Hassanian, H.H., Sharma, Y.K., Moldovan, L., Khramtsov, V., Berliner, L.J., Duvick, J.P., Goldschmidt-Clermont, P.J.** (2000). Plant Rac proteins induce superoxide production in mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 783-788.
- [65] **Haugwitz, M., Noegel, A.A., Karakesisoglou, J., Schleicher, M.** (1994). Dictyostelium amoebae that lack G-actin-sequestering profilins show defects in F-actin content, cytokinesis, and development, *Cell* **79**, 303-314.
- [66] **Heath, M. C.** (1998b). Involvement of reactive oxygen species in the response of resistant (hypersensitive) or susceptible cowpeas to the cowpea rust fungus, *New Phytol* **138**, 251-263.
- [67] **Heath, M. C., Nimchuk, Z. L., and Xu, H.** (1997). Plant nuclear migrations as indicators of critical interactions between resistant or susceptible cowpea epidermal cells and invasion hyphae of the cowpea rust fungus., *New Phytologist* **135**, 689-700.
- [68] **Heath, M. C., and Škalamera, D.** (1997). Cellular Interactions between plants and biotrophic fungal parasites, *Adv Bot Research* **24**, 195-225.
- [69] **Heath, M.C.** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses, *Current Opinion in Plant Biology* **3**, 315-319.

- [70] **Hepler, P. K., Vidali, L., and Cheung, A. Y.** (2001). Polarized cell growth in higher plants, *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 159-187.
- [71] **Hinchliffe, K.** (2000). Intracellular Signalling: Is PIP₂ a second messenger too?, *Curr Biol* **10**, R104-R105.
- [72] **Holzinger, A., Valenta, R., Lütz-Meindl, U.** (2000). Profilin is localized in the nucleus-associated microtubule and actin system and is evenly distributed in the cytoplasm of the green alga *Micrasterias denticulata*, *Protoplasma* **212**, 197-205.
- [73] **Huang, S., McDowell, J. M., Weise, M. J., and Meagher, R. B.** (1996). The Arabidopsis profilin gene family, *Plant Physiol* **111**, 115-126.
- [74] **Hussey, P.J., Yuan, M., Calder, G., Khan, S., Lloyd, C.W.** (1998). Microinjection of pollen-specific actin-depolymerizing factor, ZmADF1, re-orientates F-actin strands in *Tradescantia* stamen hair cells, *Plant J* **14**, 353-357.
- [75] **Innes, R. W.** (1998). Genetic dissection of R gene signal transduction pathways, *Cur Opin Plant Biol* **1**, 229-304.
- [76] **Jabs, T., Dietrich, R. A., and Dangl, J. L.** (1996). Initiation of runaway cell death in an Arabidopsis mutant by extracellular superoxide, *Science* **273**, 1853-1856.
- [77] **Jabs, T., Tschöpe, M., Colling, C., Hahlbrock, K., and Scheel, D.** (1997). Elicitor-stimulated ion fluxes and O₂⁻ from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley., *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 4800-4805.
- [78] **Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.F.**(2003). An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5 Is Required for Wound and Papillary Callose Formation, *The Plant Cell* **15**, 2503-2513.
- [79] **Jiang, C. J., Weeds, A. G., and Hussey, P. J.** (1997). The maize actin-depolymerizing factor, ZmADF3, redistributes to the growing tip of elongating root hairs and can be induced to translocate into the nucleus with actin, *Plant J* **12**, 1035-1034.
- [80] **Jin, S., Xu, R., Wei, Y., Goodwin, P.H.** (1999). Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, *Planta* **209**, 487-494.

- [81] **John, J., Rensland, H., Schlichting, I., Vetter, I., Borasio, G.D., Goody, R.S., and Wittinghofer, A.** (1993) Kinetic and structural analysis of the magnesium-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21-RAS, *J. Biol. Chem.* **268**, 923-929.
- [82] **Jones, M.A., Shen, J.-J., Fu, Y., Li, H., Yang, Z., Grierson, C.S.** (2002). The Arabidopsis Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth, *Plant Cell* **14**, 763-776.
- [83] **Kang, F., Purich, D.L., Southwick, F.S.** (1999). Profilin promotes barbed-end actin filament assembly without lowering the critical concentration, *J Biol Chem* **274**, 36963-36972.
- [84] **Karakesisoglou, I., Schleicher, M., Gibbon, B.C., Staiger, C.J.** (1996). Plant profilins rescue the aberrant phenotype of profilin-deficient *Dictyostelium* cells, *Cell Motil Cytoskel* **24**, 36-47.
- [85] **Kawasaki, T., Henmi, Ono, E., Hatakeyama, S., Iwano, M., Satoh, H., Shimamoto, K.** (1999). The small GTP-binding protein Rac is a regulator of cell death in plants, *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10922-10926.
- [86] **Kim, M. C., Panstruga, R., Elliot, C., Müller, J., Devoto, A., Yoon, H. W., Park, H. C., Cho, M. J., and Schulze-Lefert, P.** (2002). Calmodulin interacts to regulate defence against mildew in barley, *Nature* **416**, 447-450.
- [87] **Klahre, U., Chua, N.-H.** (1999). The *Arabidopsis* *ACTIN-RELATED PROTEIN 2* (*AtARP2*) promoter directs expression in xylem precursor cells and pollen, *Plant Mol Biol* **41**, 65-73.
- [88] **Kobayashi, I., Kobayashi, Y., Yamaoka, N., and Kunoh, H.** (1992). Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. III. Responses of microtubules and actin filaments in barley coleoptile cells to penetration attempts., *Can J Bot* **70**, 1815-1823.
- [89] **Kobayashi, I., Kobayashi, Y., and Hardham, A. R.** (1994). Dynamic reorganization of microtubules and microfilaments in flax cells during the resistance response to flax rust infection, *Planta* **195**, 237-247.
- [90] **Kobayashi, I., Komura, T., Sakamoto, Y., and Kunoh, H.** (1990). Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells (I). Cytoplasmic responses to the nonpathogen, *Erysiphe pisi*, prior to its penetration., *Physiol Molec Plant Pathol* **37**, 479-490.
- [91] **Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., and Kunoh, H.** (1997). Dynamic reorganization of microfilaments and

- microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells., *Plant J* **11**, 525-537.
- [92] **Kobayashi, Y., Kobayashi, I., and Kunoh, H.** (1993). Recognition of a pathogen and a nonpathogen by barley coleoptile cells. II. Alteration of cytoplasmic strands in coleoptile cells caused by the pathogen *Erysiphe graminis* and the nonpathogen *E. pisi* prior to their penetration., *Physiol Molec Plant Pathol* **43**, 243-254.
- [93] **Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I., and Kunoh, H.** (1997). Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants, *Plant Cell Physiol* **38**, 725-733.
- [94] **Korfhage, U.** (1993). Isolierung eines sequenzspezifisch an den pr2-Promotor aus *Petersilie* bindenden Proteins: Charakterisierung der cDNA und funktionelle Analyse der Bindestelle. Dissertation, vorgelegt an der Universität zu Köln.
- [95] **Kost, B., Lemichez, E., Spielhofer, P., Hong, Y., Tolia, K., Carpenter, C., and Chua, N.-H.** (1999). Rac homologues and compartmentalized phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate act in a common pathway to regulate polar pollen tube growth, *J Cell Biol* **145**, 317-330.
- [96] **Kost, B., Spielhofer, P., Chua, N.-H.** (1998). A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes, *Plant J* **16**, 393-401.
- [97] **Kovar, D.R., Drøbak, B.K., Staiger, C.J.** (2000). Maize profilin isoforms are functionally distinct, *Plant Cell* **12**, 583-598.
- [98] **Kovar, D.R., Staiger, C.J., Weaver, E.A., McCurdy, D.W.** (2000). AtFIM1 is an actin binding filament crosslinking protein from *Arabidopsis thaliana*, *Plant J* **24**, 625-636.
- [99] **Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4., *Nature* **227**, 680-685.
- [100] **Lamb, C., and Dixon, R. A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.
- [101] **Laux, T., Fukami, K., Thelen, M., Golub, T., Frey, D. Caroni, P.** (2000). Gap43, MARCKS, and CAP23 modulate PI(4,5)P₂ at plasmalemmal rafts, and regulate cell cortex dynamics through a common mechanism, *J Cell Biol* **149**, 1455-1471.

- [102] **Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., and Lamb, C. J.** (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response., *Cell* **79**, 583-593.
- [103] **Lin, Y., Wang, Y., Zhu, J.-K., Yang, Z.** (1996). Localization of a Rop GTPase implies a role in tip growth and movement of the generative cell in pollen tubes, *Plant Cell* **8**, 293-303.
- [104] **Lin, Y., Yang, Z.** (1997). Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggest a crucial role for Rop-type GTPases in the control of tip growth, *Plant Cell* **9**, 1647-1659.
- [105] **Lipka, V.**, pers. Mitteilung.
- [106] **Logemann, J., Schell, J., and Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues., *Analyt Biochem* **163**, 16-20.
- [107] **Machesky, L., Atkinson, S., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T.D.** (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose, *J Cell Biol* **127**, 107-115.
- [108] **Machesky, L.M., Insall, R.H.** (1999). Signaling to actin dynamics, *J Cell Biol* **146**, 267-272.
- [109] **Marcoux, N., Laforest, M., Pallotta, D.** (1999). The two *Physarium polycephalum* profilins are not functionally equivalent in yeast, *Protoplasma* **210**, 45-51.
- [110] **Martelli, A.M., Cataldi, A, Manzoli, L., Billi, A.M., Rubbini, S., Gilmour, R.S., Cocco, L.** (1995). Inositids in nuclei of Friend cells: Changes of phosphoinositide and diacylglycerol levels accompany cell differentiation, *Cellular Signalling* **7**, 53-56.
- [111] **Mathur, J., Hülkamp, M.** (2001). Cell growth: How to grow and where to grow, *Curr Biol* **11**, R402-R404.
- [112] **Mathur, J., Mathur, N., Hülkamp, M.** (2002). Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants, *Plant Phys* **128**, 1031-1045.
- [113] **Mathur, J., Spielhofer, P., Kost, B., and Chua, N.-H.** (1999). The actin cytoskeleton is required to elaborate and maintain spatial patterning during trichome cell morphogenesis in *Arabidopsis thaliana*, *Development* **126**, 5559-5568.

- [114] **May, R. C.** (2001). The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton, *Cell Mol Life Sci* **58**, 1607-1626.
- [115] **McCurdy, D.W., Kovar, D.R., Staiger, C.J.** (2001). Actin and actin-binding proteins in higher plants, *Protoplasma* **215**, 89-104.
- [116] **McDowell, J.M., Dangl, J.L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response, *Tr Biol Sci* **25**, 79-82.
- [117] **Meagher, R.B., McKinney, E.C., Kandasamy, M.K.** (1999). Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: The diverse plant actin gene family, *Plant Cell* **11**, 995-1005.
- [118] **Meagher, R.B., McKinney, E.C., Vitale, A.V.** (1999). The evolution of new structures – Clues from plant cytoskeletal genes, *Trends in Genetics* **15**, 278-284.
- [119] **Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J., and Heath, M. C.** (2002). H₂O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions, *Plant J* **29**, 257-268.
- [120] **Meyer, G., Feldman, E.L.** (2002). Signaling mechanisms that regulate actin-based motility processes in the nervous system, *Journal of Neurochemistry* **83**, 490-503.
- [121] **Mittermann, I., Fetrow, J.S., Schaak, D.L., Almo, S.C., Kraft, D., Heberle-Bors, E., Valenta, R.** (1998). Oligomerization of profilin from birch, man and yeast. Profilin, a ligand for itself?, *Sex Plant Reprod* **11**, 183-191.
- [122] **Mittermann, I., Heiss, S., Kraft, D., Valenta, R., Heberle-Bors, E.** (1996). Molecular characterization of profilin isoforms from tobacco (*Nicotiana tabacum*) pollen, *Sex Plant Reprod* **9**, 133-139.
- [123] **Mittermann, I., Swobody, I., Pierson, E., Eller, N., Kraft, D., Valenta, R., Heberle-Bors, E.** (1995). Molecular cloning and characterization of profilin isoforms from tobacco (*Nicotiana tabacum*): increased profilin expression during pollen maturation, *Plant Mol Biol* **27**, 137-146.
- [124] **Molendijk, A. J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C. S. V., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., Palme, K.** (2001). Arabidopsis thaliana Rop GTPases are localized to tips of root hairs and control polar growth, *EMBO J* **20**, 2779-2788.
- [125] **Molendijk, A.**, pers. Mitteilung.

- [126] **Mould, M. J. R., and Heath, M. C.** (1999). Ultrastructural evidence of differential changes in transcription, translation, and cortical microtubules during in planta penetration of cells resistant or susceptible to rust infection, *Physiol Molec Plant Pathol* **55**, 225-236.
- [127] **Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Physiol Plant* **15**, 473-479.
- [128] **Naton, B., Hahlbrock, K., and Schmelzer, E.** (1994). Increased metabolic activity precedes infection-induced rapid cell death in suspension cultured plant cells., *Plant Physiol* **105** Suppl, 162.
- [129] **Naton, B., Hahlbrock, K., and Schmelzer, E.** (1996). Correlation of rapid cell death with metabolic changes in fungus-infected, cultured parsley cells., *Plant Physiol* **112**, 433-444.
- [130] **Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of protein in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G 250 and R 250., *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- [131] **Nick, P.** (1999). Signals, Motors, Morphogenesis – the cytoskeleton in plant development, *Plant Biol* **1**, 169-179.
- [132] **Nimchuk, Z., Rohmer, L., Chang, J. H., and Dangl, J. L.** (2001). Knowing the dancer from the dance: R-gene products and their interactions with other proteins from host and pathogen, *Cur Opin Plant Biol* **4**, 288-294.
- [133] **Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.-H., Vogel, J.P., Edwards, H., Somerville, S.C.** (2003). Loss of callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance, *Science* **301**, 969-972.
- [134] **Nisimoto, Y., Freeman, J.L.R., Motalebi, S.A., Hirshberg, M., Lambeth, J.D.** (1997). Rac binding to p67^{phox}, *J Biol Chem* **30**, 18834-18841.
- [135] **Noegel, A.A., Rivero, F., Albrecht, R., Janssen, K.-P., Köhler, J., Parent, C.A., Schleicher, M.** (1999). Assessing the role of the ASP56/CAP homologue of *Dictyostelium discoïdum* and the requirements for subcellular localization, *J Cel Sci* **112**, 3195-3203.
- [136] **Nürnbergger, T.** (1999). Signal perception in plant pathogen defense, *Cell Mol Life Sci* **55**, 167-182.
- [137] **Nürnbergger, T., and Scheel, D.** (2001). Signal transmission in the plant immune response, *Tr Plant Sci* **6**, 372-379.

- [138] **Ono, E., Wong, H. L., Kawasaki, T., Hasegawa, M., Kodama, O., and Shimamoto, K.** (2001). Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice, *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 759-746.
- [139] **Osborne, S.L., Thomas, C.L., Gschmeissner, S., Schiavo, G.** (2001). Nuclear PtdIns(4,5)P₂ assembles in a mitotically regulated particle involved in pre-mRNA splicing, *J Cell Sci* **114**, 2501-2511.
- [140] **Otto, J.J.** (1994). Actin-bundling proteins, *Curr Biol* **6**, 105-109.
- [141] **Pantaloni, D., Carlier, M.-F.** (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of Thymosin β ₄, *Cell* **75**, 1007-1014.
- [142] **Park, J., Choi, H.-J., Lee, S., Lee, T., Yang, Z., Lee, Y.** (2000). Rac-related, GTP-binding protein in elicitor-induced reactive oxygen generation by suspension-cultured soybean cells, *Plant Phys* **124**, 725-732.
- [143] **Parker, J.E.** (2003). Plant recognition of microbial patterns, *Trends in Plant Science* **8**, 245-247.
- [144] **Peng, M., and Kuc, J.** (1992). Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks, *Phytopathology* **82**, 696-699.
- [145] **Pennell, R. I., and Lamb, C.** (1997). Programmed cell death in plants, *Plant Cell* **9**, 1157-1168.
- [146] **Perelroizen, I., Didry, D., Christensen, H., Chua, N.-H., Carlier, M.-F.** (1996). Role of nucleotide exchange and hydrolysis in the function of profilin assembly, *J Biol Chem* **271**, 12302-12309.
- [147] **Potikha, T.S., Collins, C.C., Johnson, D.J., Delmer, D.P., Levine, A.** (1999). The involvement of hydrogen peroxide in the Differentiation of secondary walls in cotton fibers, *Plant Phys* **119**, 849-858.
- [148] **Ragg, H., Kuhn, D.N., Hahlbrock, K.** (1981). , *J Biol Chem* **256**, 10061-10065.
- [149] **Ramachandran, S., Christensen, H. E. M., Ishimaru, Y., Dong, C.-H., Chao-Ming, W., Cleary, A. L., and Chua, N.-H.** (2000). Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis, *Plant Physiol* **124**, 1637-1647.
- [150] **Raucher, D., Stauffer, T., Chen, W., Shen, K., Guo, S., York, J.D., Sheetz, M.P., Meyer, T.** (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion, *Cell* **100**, 221-228.

- [151] **Richberg, M. H., Aviv, D. H., and Dangl, J. D.** (1998). Dead cells do tell tales, *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 480-485.
- [152] **Rothkegel, M., Mayboroda, O., Rohde, M., Wucherpennig, C., Valenta, R., Jockusch, B.M.** (1996). Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells, *J Cell Sci* **109**, 83-90.
- [153] **de Ruijter, N.C.A., Emons** (1999). Actin-binding proteins in plant cells, *Plant biol* **1**, 26-35.
- [154] **Sagasser, M.** (2000). Analyse von *transparent testa*-Mutanten von *Arabidopsis thaliana*, Dissertation, vorgelegt an der Universität zu Köln
- [155] **Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., eds.** (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. (Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- [156] **Sanderfoot, A. A., Kovaleva, V., Bassham, D. C., and Raikhel, N. V.** (2001). Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the Arabidopsis cell, *Mol Biol Cell* **12**, 3733-3743.
- [157] **Sanderfoot, A. A., and Raikhel, N. V.** (1999). The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs, *Plant Cell* **11**, 629-641.
- [158] **Schlüter, K., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M.** (1997). Profilins as regulators of actin dynamics, *Biochim Biophys Acta* **1359**, 97-109.
- [159] **Schlüter, K., Schleicher, M., Jockusch, B.M.** (1998). Effects of single amino acid substitutions in the actin-binding site on the biological activity of bovine profilin I, *J Cell Sci* **111**, 3261-3273.
- [160] **Schmelzer, E.** (2002). Cell polarization, a crucial process in fungal defence, *Tr Plant Sci* **7**, 411-415.
- [161] **Schmelzer, E., Naton, B., Freytag, S., Rouhara, I., Küster, B., Hahlbrock, K.** (1995). Infection-induced rapid cell death in plants: a means of efficient pathogen defense, *Can J Bot* **73**, S426-434.
- [162] **Schmidt, J.M., Zhang, J., Lee, H.-S., Stromer, M.H., Robson, R.M.** (1999). Interaction of Talin with actin: sensitive modulation of filament crosslinking activity, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **366**, 139-150.

- [163] **Schobert, C., Gottschalk, M., Kovar, D.R., Staiger, C.J., Yoo, B.-C., Lucas, W.J.** (2000). Characterization of *Ricinus communis* phloem profilin, RcPRO1, *Plant Mol Biol* **42**, 719-730.
- [164] **Schulze-Lefert, P., Vogel, J.** (2000). Closing the ranks to attack by powdery mildew, *Tr Plant Sci* **5**, 343-348.
- [165] **Schweizer, P., Pokorny, J., Schulze-Lefert, P., Dudler, R.** (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals, *Plant J* **24**, 1-10.
- [166] **Silva, H., Yoshioka, K., Dooner, H.K., Klessig, D.F.** (1999). Characterization of a new Arabidopsis mutant exhibiting enhanced disease resistance, *MPMI* **12**, 1053-1063.
- [167] **Singh, S.S., Chauhan, A., Murakami, N., Chauhan, V.P.S.** (1996). Profilin and Gelsolin stimulate phosphatidylinositol 3-kinase activity, *Biochemistry* **35**, 16544-16549.
- [168] **Škalamera, D., Heath, M.C.** (1996). Cellular mechanisms of callose deposition in response to fungal infection or chemical damage, *Can J Bot* **74**, 1236-1242.
- [169] **Škalamera, D., Heath, M. C.** (1998). Changes in the cytoskeleton accompanying infection-induced nuclear movements and the hypersensitive response in plant cells invaded by rust fungi, *Plant J* **16**, 191-200.
- [170] **Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.-B., Stoutjesdijk, Green, A.G., Waterhouse, P.M.** (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs, *Nature* **407**, 319-320.
- [171] **Snowman, B.N., Kovar, D.R., Shevchenko, G., Franklin-Tong, V.E., Staiger, C.J.** (2002). Signal-mediated depolymerization of actin in pollen during self-incompatibility response, *Plant Cell* **14**, 2613-2626.
- [172] **Snyder, B. A. Nicholson, R. L.** (1990). Synthesis of phytoalexins in sorghum as a site-specific response to fungal ingress, *Science* **248**, 1637-1639.
- [173] **Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., Rothman, J. E.** (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion, *Nature* **362**, 318-324.
- [174] **Somssich, I. E., Hahlbrock, K.** (1998). Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity, *Trends in Plant Science* **3**, 86-90.

- [175] **Staiger, C. J.** (2000). Signaling to the actin cytoskeleton in plants, *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**, 257-288.
- [176] **Staiger, C. J., Gibbon, B. C., Kovar, D. R., Zonia, L. E.** (1997). Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants, *Trends Plant Sci* **2**, 275-281.
- [177] **Staiger, C.J., Goodbody, K.C., Hussey, P.J., Valenta, R., Drøbak, B.K., Lloyd, C.W.** (1993). The profilin multigene family of maize: differential expression of three isoforms, *Plant J* **4**, 631-341.
- [178] **Staiger, C.J., Yuang, M., Valenta, R., Shaw, P.J., Warn, R.M., Lloyd, C.W.** (1994). Microinjected profilin affects cytoplasmic streaming in plant cells by rapidly depolymerizing actin microfilaments, *Curr Biol* **4**, 215-219.
- [179] **Szymanski, D. B., Marks, M. D., Wick, S. M.** (1999). Organized F-actin is essential for normal trichome morphogenesis in Arabidopsis, *Plant Cell* **11**, 2331-2347.
- [180] **Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., Steinbiss, H.-H.** (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions, *Nucleic Acids Research* **15 (14)**, 5890.
- [181] **Takemoto, D., Jones, D.A., Hardham, A.R.** (2003). GFP-tagging of cell components reveals the dynamics of subcellular re-organization in response to infection of *Arabidopsis* by oomycet pathogens, *Plant J* **33**, 775-792.
- [182] **Theriot, J., Mitchison, T.J.** (1993). The three phases of profilin, *Cell* **75**, 835-383.
- [183] **Thomas, C.L., Stell, J., Prestwich, G.D., Schiavo, G.** (1999). Generation of phosphatidylinositol-specific antibodies and their characterization, *Biochemical Society Transactions* **27**, 648-652.
- [184] **Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of non-host resistance, *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351-357.
- [185] **Valenta, R., Duchêne, M., Pettenburger, K., Sillaber, C., Valent, P., Bettelheim, P., Breitenbach, M., Rumpold, H., Kraft, D., Schreiner, O.** (1991). Identification of profilin as a novel pollen allergen: IgE autoreactivity in sensitized individuals, *Science* **253**, 557-560.
- [186] **Valster, A. H., Hepler, P. K., Chernoff, J.** (2000). Plant GTPases: the Rhos in bloom, *Tr Cell Biol* **10**, 141-146.

- [187] **Valster, A.H., Pierson, E.S., Valenta, R., Hepler, P.K., Emons, A.M.C.** (1997). Probing the plant actin cytoskeleton during cytokinesis and interphase by profilin microinjection, *Plant Cell* **9**, 1815-1824.
- [188] **Vance, V., Vaucheret, H.** (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense, *Science* **292**, 2277-2280.
- [189] **Verheyen, E.M., Cooley, L.** (1994). Profilin mutations disrupt actin-dependent processes during *Drosophila* development, *Development* **120**, 717-728.
- [190] **Vidali, L., Hepler, P.K.** (2001). Actin and pollen tube growth, *Protoplasma* **215**, 64-76.
- [191] **Vidali, L., McKenna, S.T., Hepler, P.K.** (2001). Actin polymerization is essential for pollen tube growth, *Molecular Biology of the Cell* **12**, 2534-2545.
- [192] **Vidali, L., Pérez, H.E., Valdés-López, V., Noguez, R., Zamudio, F., Sánchez, F.** (1995). Purification, characterization, and cDNA cloning of profilin from *Phaseolus vulgaris*, *Plant Phys* **108**, 115-123.
- [193] **Volkman, D., Baluška, F.** (1999). Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks, *Microsc Res Tech* **47**, 135-154.
- [194] **Wang, M.-B., Waterhouse, P. M.** (2001). Application of gene silencing in plants, *Curr Op Plant Biol* **5**, 146-150.
- [195] **Welch, M.,D., Rosenblatt, J., Skoble, J., Portnoy, D.A., Mitchison, T.J.** (1998). Interaction of human Arp2/3 complex and the *Listeria monocytogenes* ActA protein in actin filament nucleation, *Science* **281**, 105-108.
- [196] **Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M.-B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbot, D., Stoutjesdijk, P. A., et al.** (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants, *Plant J* **27**, 581-590.
- [197] **Witke, W., Sutherland, J.D., Sharpe, A., Arai, M., Kwiatkowski, D.J.** (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development, *Proc Natl Sci USA* **98**, 3832-3836.
- [198] **von Witsch, M., Baluška, F., Staiger, C.J., Volkman, D.** (1998). Profilin is associated with the plasma mebran in microspores and pollen, *Europ J Cell Biol* **77**, 303-312.

- [199] **Wyand, R.A. and Brown, J.K.M.** (2003). Genetic and forma specialis diversity in *Blumeria graminis* of cereals and its implications for host-pathogen co-evolution, *Molecular Plant Pathology* **3**, 187-198
- [200] **Xing, T., Higgins, V.J., Blumwald, E.** (1997). Race-specific elicitors of *Cladosporium fulvum* promote translocation of cytosolic components of NADPH oxidase to the plasma membrane of tomato cells, *Plant Cell* **9**, 249-259.
- [201] **Yokota, E., Shimmen, T.** (1999). The 135-kDa actin-bundling protein from lily pollen tubes arranges F-actin into bundles with uniform polarity, *Planta* **209**, 264-266.
- [202] **Yu, L.-X., Nasrallah, J., Valenta, R., Parthasarathy, M.V.** (1998). Molecular cloning and mRNA localization of tomato pollen profilin, *Plant Mol Biol* **36**, 699-707.
- [203] **Zheng, Z.-L., Yang, Z.** (2000). The Rop GTPase switch turns on polar growth in pollen, *Tr Plant Sci* **5**, 298-303.
- [204] **Zheng, Z.-L., Yang, Z.** (2000). The Rop GTPase: an emerging signaling switch in plants, *Plant Mol Biol* **44**, 1-9.
- [205] **Zuo, J., Niu, Q.-W., Chua, N.-H.** (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants, *Plant J* **24**, 265-273.

Danksagung

Zum Gelingen dieser Arbeit haben viele beigetragen. Ihnen möchte ich danken.

Herrn Prof. Schulze-Lefert danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung und für richtungsweisende Gespräche. Herrn Dr. Elmon Schmelzer danke ich für die Bereitstellung des Themas, für Gespräche und Anregungen und die Freiräume, die er mir für die Gestaltung der Arbeit gelassen hat.

Ihm und Dr. Matthias Godde danke ich für viele Stunden, die wir zusammen am Mikroskop verbrachten.

Ila Rouhara, Ulrich Martin und Rainer Franzen danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung, Lydia Bollenbach für die Betreuung der Zellkulturen und den Teams von Frank Eickelmann und Caren Dawidson für die Pflege der Pflanzen.

Seminare und Diskussionen haben dieser Arbeit Impulse gegeben. Dafür danke ich allen Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern der Abteilungen Hahlbrock und Schulze-Lefert. Ganz besonders danke ich Dr. Franziska Turck für viele Gespräche und wesentliche Anregungen und ihre freundschaftliche Unterstützung. Dr. Birgit Görnhardt danke ich für ihre engagierte Unterweisung in vielen Arbeitstechniken. Dr. Bekir Ülker danke ich für viele Gespräche und Vektoren.

Ich danke Herrn Prof. Hülskamp für die Bereitschaft, die Begutachtung dieser Arbeit und Herrn Prof. Werr für die Bereitschaft, den Prüfungsvorsitz zu übernehmen.

Frau Maret Kalda und meinem Mann, Dr. Lutz Kämmerer, danke ich für ihre Hilfe beim Erstellen dieser Arbeit.

Erklärung

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn PD Dr. Elmon Schmelzer betreut worden.

Keine Teilpublikationen

Lebenslauf

- Persönliche Daten: Ingeborg Schütz
geboren am 27. 11. 1970 in Jena
verheiratet, ein Kind
- Schulbildung:
- 1976 – 1986 Polytechnische Oberschule in Jena
1986 – 1988 Erweiterte Oberschule in Jena
Allgemeine Hochschulreife 1988
- Hochschulbildung:
- 1988 – 1991 Studium der Mathematik an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Vordiplom 1991
- 1991 – 1997 Studium der Biologie an der
Friedrich-Schiller-Universität Jena
Diplomarbeit am Institut für Botanik
Thema: „Annexine in keimenden Farnsporen“
Diplom 1997
- Berufliche Tätigkeiten:
- 1997 – 1998 Researcher am Advanced Research Laboratory,
Hitachi Ltd., Saitama, Japan
- 1998 – 2002 Laborarbeiten am MPI für Züchtungsforschung in
Köln-Vogelsang zur Dissertation „Polarisation des
pflanzlichen Aktinzytoskeletts bei Infektion –
Profiline in *Arabidopsis thaliana* und
Petroselinum crispum“