

GENETISCHE ANALYSE DER NICHTWIRTSRESISTENZ  
GEGENÜBER BIOTROPHEN MEHLTAUPILZEN IN  
*ARABIDOPSIS THALIANA*

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

vorgelegt von  
**Jan Dittgen**  
aus Saarbrücken

Köln, im Mai 2005

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in Köln in der Abteilung für Molekulare Phytopathologie (Direktor: Prof. Dr. P. Schulze-Lefert) angefertigt.



---

MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Max-Planck-Institut für  
Züchtungsforschung

Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert  
Prof. Dr. Martin Hülskamp

Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Ulf-Ingo Flügge

Tag der Disputation: 4. Juli 2005

**INHALTSVERZEICHNIS**

I	Inhaltsverzeichnis .....	1
II	Abkürzungsverzeichnis .....	5
III	Zusammenfassung .....	7
IV	Summary .....	9
<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>11</b>
<b>1.1</b>	<b>Pflanzliche Resistenzmechanismen .....</b>	<b>11</b>
1.1.1	Unspezifische Abwehr und Basale Resistenz .....	12
1.1.2	Spezifische Abwehr und Rassenspezifische Resistenz .....	13
1.1.3	Komponenten pflanzlicher Resistenzmechanismen .....	16
1.1.4	Nichtwirtsresistenz .....	23
<b>1.2</b>	<b>Pathosysteme zur Analyse der Nichtwirtsresistenz ....</b>	<b>25</b>
1.2.1	Die Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
1.2.2	Gerstemehltau ( <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> ) und Erbsenmehltau ( <i>Erysiphe pisi</i> ) .....	26
<b>1.3</b>	<b>pen-Mutanten identifizieren Komponenten der Nichtwirtsresistenz in <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>29</b>
1.3.1	<i>PEN1</i> .....	30
1.3.2	<i>PEN2</i> .....	32
1.3.3	<i>PEN3</i> .....	33
<b>1.4</b>	<b>Zielsetzung dieser Arbeit .....</b>	<b>34</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>35</b>
2.1.1	Pflanzenmaterial .....	35
2.1.2	Pflanzenpathogene .....	35
2.1.3	Vektoren und Bakterienstämme .....	35
2.1.4	Medien und Antibiotika .....	37
2.1.5	Oligonukleotide .....	37
2.1.6	Enzyme .....	37
2.1.7	Puffer und Lösungen .....	41

2.1.8	Chemikalien .....	43
2.1.9	Datenbanken und sonstige Internetressourcen .....	45
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.2.1	Anzucht der Versuchspflanzen und Kultivierung der Pathogene .....	46
2.2.2	Inokulationen .....	48
2.2.3	Kreuzungen .....	48
2.2.4	Herstellung transgener Linien .....	49
2.2.5	DNA-Extraktion .....	51
2.2.6	RNA-Extraktion .....	51
2.2.7	Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen .....	52
2.2.8	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen .....	55
2.2.9	Detektion von Mutanten, Transgenen und ökotypspezifischen Genomunterschieden .....	56
2.2.10	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse .....	59
2.2.11	Präparation von Blattmaterial zur mikroskopischen Analyse ...	59
2.2.12	Coomassie Blau-Färbung .....	59
2.2.13	Anilinblau-Färbung .....	60
2.2.14	Trypanblau-Färbung .....	60
2.2.15	Kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung .....	60
2.2.16	DAB-Färbung .....	61
2.2.17	Mikroskopische Analyse .....	62
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE – TEIL 1: ANALYSE DER GENETISCHEN INTERAKTION VON <i>PEN2</i> MIT BEKANNTEN RESISTENZ- UND ABWEHR-KOMPONENTEN .....</b>	<b>65</b>
3.1	Isolierung von Transformanden, Doppel- und Tripelmutanten .	65
3.2	Kombinierte Mutationen in <i>PEN1</i> und <i>PEN2</i> führen zu additiver Penetrationsanfälligkeit gegenüber dem Gerstemehltau .....	68
3.3	<i>NDR1</i> , Salicylsäure und <i>NPR1</i> sind nicht wesentlich an der Ausprägung des <i>pen2</i> -Phänotyps beteiligt .....	71
3.4	Mutationen im <i>RAR1-SGT1b</i> -Komplex verstärken den <i>pen2</i> -Phänotyp nur geringfügig .....	73

3.5	Kombinierte Mutationen in <i>PEN2</i> und dem <i>EDS1-PAD4</i> -Komplex erlauben vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum des Gerstemehltaus .....	76
3.6	Die Nichtwirtsresistenz gegenüber dem Erbsenmehltau ist in den Doppelmutanten <i>pen2eds1</i> und <i>pen2 pad4</i> vollständig gebrochen .....	79
3.7	Die Nichtwirtsresistenz gegenüber Erbsen- und Gerstemehltau ist in <i>pad4 sag101</i> -Doppelmutanten vollständig gebrochen .....	83
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE – TEIL 2: REMUTAGENESE DER <i>pen2</i>-MUTANTE UND MUSTERUNG NACH INDIVIDUEN MIT VERÄNDERTEM INFEKTIONSPHÄNOTYP .....</b>	<b>88</b>
4.1	Überprüfung der Mutageneseeffizienz .....	88
4.2	Musterung nach Mutanten mit veränderter Zelltod-Autofluoreszenz nach Gerstemehltau-Inokulation .....	88
4.3	Musterung nach Mutanten mit erhöhter Rate an sekundärem Hyphenwachstum des Gerstemehltau .....	90
4.4	Mikroskopische und molekulare Charakterisierung der isolierten putativen Mutanten .....	90
4.5	Phänotypische Charakterisierung der isolierten putativen Mutanten mit verschiedenen Pathogenen .....	94
4.6	Grobkartierung der Mutation in Linie <i>157a</i> und Ausschluß von Kandidatengen durch DNA-Sequenzierung .....	97
4.7	Untersuchung der Abhängigkeit des beobachteten Phänotyps vom Vorhandensein der <i>pen2</i> -Mutation .....	99
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>101</b>
5.1	Mehrere teilweise unabhängige Signalwege sind an der Ausprägung der Penetrationsresistenz beteiligt .....	101
5.2	Salicylsäure (SA) und Komponenten des SA-Signalwegs sind nur geringfügig an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz beteiligt .....	104

---

5.3	Der <i>RAR1-SGT1</i> -Komplex hat ebenfalls nur eine geringfügige Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz .....	105
5.4	Die <i>EDS1</i> -Komplexe bilden zentrale Elemente der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz .....	107
5.5	<i>EDS1</i> , <i>PAD4</i> und <i>SAG101</i> sind an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion beteiligt .....	110
5.6	Komponenten der Pathogenerkennung und Mechanismen der Zelltodvermittlung .....	110
5.7	Zwei weitgehend unabhängige Abwehrschichten tragen zur Nichtwirtsresistenz bei .....	114
5.8	Die Mutantensichtung liefert weitere putative Mediatoren der Nichtwirtsresistenz .....	118
5.9	Funktionelles Modell der Nichtwirtsresistenz gegenüber Mehltaupilzen in <i>Arabidopsis</i> .....	120
V	LITERATURVERZEICHNIS .....	123
VI	DANKSAGUNG .....	140

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
ABC	ATP-Bindekassette
ATP	Adenosintriphosphat
avr	Avirulenz-
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> ; Gerstemehltau
Bgt	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i> ; Weizenmehltau
bp	Basenpaare
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic stretch</i> ; nach Spaltung polymorpher Sequenzbereich
CC	<i>coiled coil</i> ; superspiralisierte Helix
cDNA	<i>copy</i> -DNA
DAB	Diaminobenzidin
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCAPS	abgewandelter CAPS-marker
dCTP	desoxy-Cytidintriphosphat
dGTP	desoxy-Guanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dpi	Tage nach Inokulation
DTT	Dithiothreitol
dTTP	desoxy-Thymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ET	Ethylen
F1	Filialgeneration 1
F2	Filialgeneration 2
f.sp.	forma specialis
g	Gramm
GFP	grün fluoreszierendes Protein
hpi	Stunden nach Inokulation
HR	Hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonat
Kb	Kilobasen
l	Liter
LRR	Leucinreiche repetitive Sequenzbereiche
m	Milli-
M	molar



---

M1	Filialgeneration 1 nach Mutagenese
M2	Filialgeneration 2 nach Mutagenese
Mb	Megabasen
min	Minuten
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
n	Nano-
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>
NB	Nukleotidbindestelle
p	Wahrscheinlichkeitswert
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	<i>pathogenesis related</i> ; Pathogenese-assoziiert
rel.LF	relative Luftfeuchtigkeit
R	Resistenz
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
SA	Salicylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunden
SNAP	Synaptosom-assoziiertes Protein
SNARE	SNAP-Rezeptor
SSLP	<i>short sequence length polymorphism</i> , kurzer polymorpher Sequenzbereich
T1	Filialgeneration 1 nach Transformation
T2	Filialgeneration 2 nach Transformation
T-DNA	Transposon-DNA
TIR	Toll- und Interleukin-Rezeptor-ähnlich
Tm	Dehybridisierungstemperatur, Schmelztemperatur
TMV	Tabakmosaikvirus
t-SNARE	zielmembranassoziiertes SNARE-Protein
TTSS	Typ III Sekretionssystem
U	Unit (Enzymmenge)
UDP	Uridindiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
v-SNARE	vesikelassoziiertes SNARE-Protein
WT	Wildtyp
YEB	Hefeextrakt- und Bacto-Trypton-haltiges Medium
μ	Mikro-

## ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind während ihres Lebenszyklus einer Vielzahl von potenziellen Pathogenen ausgesetzt. Jedoch sind nur wenige Pathogenarten bzw. Isolate einer Pathogenart in der Lage, eine Pflanzenart zu befallen und sich zu vermehren. Ist eine Pflanzenart resistent gegenüber allen bekannten Isolaten einer Pathogenart, so wird dies als Nichtwirtsresistenz bezeichnet. Eine solche Pflanzenart ist kein natürlicher Wirt für das Pathogen. *Arabidopsis thaliana* ist ein Nichtwirt für die biotrophen Mehltaupilze *Blumeria graminis* und *Erysiphe pisi*. Die natürlichen Wirte dieser Pathogene sind Gräser bzw. Erbsenpflanzen. Morphologische Merkmale und Daten zur molekularen Phylogenie weisen darauf hin, daß *E. pisi* im Gegensatz zu *B. graminis* nahe mit einer auf *Arabidopsis* virulenten Mehltauart (*Erysiphe cruciferarum*) verwandt ist.

In vorangegangenen mutationsanalytischen Studien der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* konnten erstmals Mutanten mit veränderten Infektionstypen gegenüber *B. graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) identifiziert werden (Collins et al., 2003). Mutanten der *PEN1*, *PEN2* und *PEN3*-Loci erlauben eine erhöhte Invasionsrate mit nachfolgender Ausbildung eines Ernährungsorgans (Haustorium) in Blattepidermiszellen. Die weitere Pathogenese wird durch eine posthaustorielle Resistenzreaktion unterbunden, die mit einer Zelltodreaktion korreliert.

Ziel dieser Arbeit war es, genetische Komponenten zu identifizieren, welche zur posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz gegenüber *Bgh* und *E. pisi* beitragen. Dabei wurde von der Arbeitshypothese ausgegangen, daß die posthaustorielle Nichtwirtsresistenz möglicherweise auf Resistenzfaktoren beruht, die auch gegen Wirtspathogene wirksam sind. Durch systematische Einkreuzung einer Vielzahl beschriebener Defektallele in *pen2*-Mutanten konnten *EDS1* und dessen sequenzverwandte Interaktionspartner *PAD4* und *SAG101* als zentrale Komponenten der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz identifiziert werden. Während in *eds1*, *pad4* oder *sag101*-Mutanten der Infektionstyp mit *Bgh* nur leicht verändert ist, konnte in *pad4 sag101*-Doppelmutanten die Bildung seltener *Bgh*-Mikrokolonien beobachtet werden, deren Häufigkeit in *pen2 pad4 sag101*-Tripelmutanten ungefähr verdoppelt ist. Dies ist ein Hinweis auf eine genetische Redundanz von *PAD4* und

*SAG101* und zeigt, daß *PEN2* und *PAD4/SAG101* vermutlich Komponenten unterschiedlicher Resistenzmechanismen sind. In wenigen *Bgh*-Mikrokolonien wurde zudem Konidienbildung beobachtet. Dies belegt, daß *Arabidopsis* ein potenzieller Wirt für *Bgh* ist.

In der Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi* ist eine akkumulative Wirkung des Ausfalls von *PEN2* und *PAD4* oder *EDS1* zu beobachten. Auf *pen2 pad4*, *pen2 eds1* und *pad4 sag101*-Doppelmutanten kommt es häufig zur Sporulation von *E. pisi*. Im Vergleich zur Nichtwirtsinteraktion mit *Bgh* ist das Wachstum von *E. pisi* auf den getesteten Einzel-, Doppel- und Tripelmutanten deutlich erhöht. Diese quantitativen Unterschiede korrelieren mit der engen phylogenetischen Verwandtschaft zwischen *E. pisi* und Wirtspathogenen von *Arabidopsis*.

In einem weiteren, hypothesenfreien experimentellen Ansatz wurden *pen2*-Mutanten remutagenisiert und mehrere Linien mit verändertem Infektionstyp isoliert. In einer dieser Doppelmutanten ist vermehrtes epiphytisches Hyphenwachstum von *Bgh* und *E. pisi* zu beobachten. Dabei scheint in der Doppelmutante die erhöhte Anfälligkeit zumindest gegenüber *Bgh* auf einer Störung der posthaustoriellen Resistenz zu beruhen.

Die Ergebnisse beider experimenteller Ansätze sprechen für ein mehrstufiges Modell der Nichtwirtsresistenz, in dem mindestens zwei genetisch und räumlich trennbare Resistenzfunktionen überwunden werden müssen, um *Arabidopsis* zu einem Wirt für *Bgh* und *E. pisi* zu machen. In diesem Modell wirken *PEN1*, *PEN2* und *PEN3* an der Zelloberfläche, während *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* und weitere Faktoren an der Vermittlung der posthaustoriellen Resistenz beteiligt sind.

## SUMMARY

Plants are constantly exposed to a large number of potential pathogens. However, in nature only few pathogen species or isolates of a pathogen species colonize a single plant species. Resistance of an entire plant species to all isolates of a pathogen species is called “non-host resistance”. *Arabidopsis thaliana* is a non-host for the biotrophic powdery mildew fungi, *Blumeria graminis* and *Erysiphe pisi*, which are natural hosts of grasses and pea plants, respectively. Morphological characters and molecular phylogeny studies indicate that *E. pisi*, unlike *B. graminis*, is closely related to *Erysiphe cichoracearum*, a powdery mildew species that is virulent on *Arabidopsis*.

In previous mutant screens, several *Arabidopsis* lines were identified that are partially susceptible to *B. graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) (Collins et al., 2003). Mutations in the *PEN1*, *PEN2*, or *PEN3* loci each permit increased fungal entry of *Bgh* into attacked leaf epidermal cells, leading to the differentiation of a fungal feeding organ (haustorium). Further pathogenesis is terminated by a post-haustorial resistance response that is tightly linked with a cell death reaction.

This study aimed at the identification of genetic components required for post-haustorial non-host resistance to the inappropriate powdery mildews *Bgh* and *E. pisi*. I hypothesized that post-haustorial non-host resistance might depend on resistance factors that are also effective against host pathogens. By systematic introgression of known defense response mutants in a *pen2* mutant background, EDS1 and its sequence-related interaction partners PAD4 and SAG101 were identified as central components of post-haustorial non-host resistance. Whereas *eds1*, *pad4* or *sag101* mutants displayed only minor changes of *Bgh* infection phenotypes, *pad4 sag101* double mutants allowed the formation of rare *Bgh* microcolonies, whose frequency is approximately doubled in *pen2 pad4 sag101* triple mutants. This indicates that *PAD4* and *SAG101* are genetically redundant and suggests that *PEN2* and *PAD4/SAG101* are presumably components of two independent resistance mechanisms. Importantly, few of the detected *Bgh* microcolonies supported conidiospore formation (completion of asexual lifecycle), thereby showing that *Arabidopsis* is indeed a potential host for *Bgh*.

A cumulative effect of loss-of-function mutations in *PEN2* and *PAD4* or *EDS1* was observed in the non-host interaction with *E. pisi*. On *pen2 pad4*, *pen2 eds1*, and *pad4 sag101* double mutants, sporulation of *E. pisi* was frequently detected. Interestingly, all tested single, double, and triple mutant combinations permitted more epiphytic fungal growth of *E. pisi* in comparison to *Bgh*. These quantitative growth differences correlate with the close phylogenetic relationship of *E. pisi* and host powdery mildews of *Arabidopsis*.

The genetic basis of non-host resistance to *E. pisi* and *Bgh* was also tested by re-mutagenesis of *pen2* mutants and a search for double mutants with altered infection phenotypes to the inappropriate pathogens. One of the isolated double mutants supports enhanced epiphytic growth of both *Bgh* and *E. pisi*. The increased susceptibility of this line to *Bgh* appears to be based on defects in post-haustorial resistance.

Collectively, data generated by both experimental approaches indicate the existence of at least two genetically and spatially separable resistance layers that are active in non-host resistance. In this model, *PEN1*, *PEN2*, and *PEN3* act at the cell periphery, whereas *EDS1*, *PAD4*, *SAG101*, and further components mediate post-haustorial resistance to *E. pisi* and *Bgh*.

## **1. EINLEITUNG**

Pflanzen sind während ihres Lebenszyklus einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt (Hammond-Kosack and Parker, 2003; Mysore and Ryu, 2004). Als sessile Organismen sind sie somit besonders auf effiziente Erkennungs- und Abwehrmechanismen angewiesen, die zudem im Zuge der Coevolution zwischen Pflanze und Pathogen kontinuierlich weiterentwickelt werden (Holub, 2001; Allen et al., 2004).

### **1.1 Pflanzliche Resistenzmechanismen**

Ist eine Pflanze anfällig für einen bestimmten Krankheitserreger, so spricht man von einer kompatiblen Interaktion, im umgekehrten Fall (Resistenz) von einer inkompatiblen Interaktion von Pflanze und Pathogen (Hammond-Kosack and Jones, 2000). An der Ausprägung von Resistenz bzw. Anfälligkeit sind eine Vielzahl von Komponenten beteiligt (Glazebrook, 2001; Hammond-Kosack and Parker, 2003).

Innerhalb der pflanzlichen Resistenzmechanismen werden verschiedene Phänomene voneinander abgegrenzt. Um vorab die wichtigsten Resistenzphänomene kurz zu charakterisieren, sind einige wesentliche Kurzdefinitionen in Box 1 zusammengestellt. Eine ausführlichere Erläuterung erfolgt im weiteren Text.

**BOX 1: Begriffsdefinitionen (nach Eulgem, 2005)****Basale Resistenz:**

Selbst in kompatiblen Interaktionen sind Abwehrkomponenten aktiv, um den Grad der Anfälligkeit gegenüber dem Pathogen zu limitieren. Entfallen diese (z.B. durch Mutation), werden die entsprechenden Pflanzenlinien supersuszeptibel gegenüber kompatiblen Pathogenen. Die entsprechenden Resistenzmechanismen werden unter dem Oberbegriff der Basalen Resistenz zusammengefaßt.

**Rassenspezifische Resistenz:**

Bestimmte Rassen einer ansonsten virulenten Pathogenart sind nicht dazu in der Lage, die eigentliche Wirtspflanze zu befallen. In solchen Fällen wird die Pathogenrasse aufgrund sogenannter Avirulenzfaktoren spezifisch von der attackierten Zelle erkannt. An diesem Erkennungsprozeß sind die Produkte sogenannter R-(rassenspezifischer) Gene beteiligt. Charakteristisch für die Rassenspezifische Resistenz ist die Hypersensitive Zelltodreaktion (HR) der attackierten Zelle, durch welche die Ausbreitung des Pathogens verhindert wird.

**Nichtwirtsresistenz:**

Ist eine Pflanzenspezies resistent gegenüber allen Rassen einer bestimmten Pathogenart, so spricht man von Nichtwirtsresistenz. Diese Form der Resistenz ist für die Mehrzahl der inkompatiblen Interaktionen zwischen Pflanze und Pathogenen verantwortlich.

**1.1.1 Unspezifische Abwehr und Basale Resistenz**

Die Pathogen-induzierte Aktivierung von Abwehrmechanismen setzt zunächst voraus, daß der Pathogenangriff von der Pflanze wahrgenommen wird. Im Gegensatz zur Rassenspezifischen Resistenz (vgl. Box 1 und 1.1.2) sind innerhalb der Basalen Resistenz jedoch eher unspezifische Effektormoleküle (Elicitoren) an Erkennung und Abwehrinduktion beteiligt. Durch diese werden zahlreiche Abwehrvorgänge aktiviert, so unter anderem die Bildung antimikrobieller Sekundärmetabolite wie z.B. den Phytoalexinen (Dixon, 2001).

Camalexin, ein Phytoalexin des Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (vgl. 1.2.1) liefert ein gut untersuchtes Beispiel hierzu. Die Biosynthese wird beispielsweise in Interaktionen mit inkompatiblen Pathogenen induziert (Tsuji et al., 1992). Allerdings konnte bisher nur in einem Einzelfall eine direkt resistenzvermittelnde Wirkung von Camalexin nachgewiesen werden. Durch Mutation in einem Camalexin-

Biosyntheseenzym (*PAD3*; Zhou et al., 1999) werden *Arabidopsis*-pflanzen anfällig gegenüber dem nekrotrophen Pathogen *Alternaria brassicicola* (Thomma et al., 1999). Gegenüber anderen getesteten Pathogenen zeigte die *pad3*-Mutante hingegen keine veränderte Anfälligkeit (Glazebrook et al., 1997; Reuber et al., 1998). Abwehr-induzierende Elicitoren können entweder durch mikrobielle Aktivität aus pflanzlichem Material abgeleitet sein (z.B. Zellwand-Degradationsprodukte; Esquerré-Tugayé et al., 2000), oder vom Pathogen selbst stammen (z.B. lösliche Bestandteile der Pathogenoberfläche; Schweizer et al., 2002).

Oftmals werden Pathogene direkt anhand charakteristischer molekularer Eigenschaften (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) erkannt. Dabei handelt es sich in der Regel um Peptidstrukturen der Pathogenoberfläche, die für eine ganze Gruppe von Pathogenen charakteristisch ist (Boller, 2005). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist *flg-22*, ein Peptid, welches die höchstkonservierte Domäne in bakteriellem Flagellin repräsentiert, und somit als charakteristisch für begeißelte Bakterien angesehen werden kann. Im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* (vgl. 1.3.1) wird dieses Peptid durch den Rezeptor *FLS2* erkannt. (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Dadurch wird wiederum eine Signalkaskade ausgelöst, die zu erhöhter Resistenz gegenüber bakteriellen (*Pseudomonas syringae*) und pilzlichen (*Botrytis cinerea*) Erregern führt. Die hypersensitive Zelltodreaktion ist daran jedoch nicht beteiligt (Asai et al., 2002). Formal kann dieses Phänomen also den Mechanismen der Basalen Resistenz zugeordnet werden.

### **1.1.2 Spezifische Abwehr und Rassenspezifische Resistenz**

Die Mechanismen der Basalen Resistenz reichen in vielen Fällen nicht aus, um den Befall durch spezifische Pathogene erfolgreich abzuwehren. Es wird daher angenommen, daß diese Pathogene im Laufe der Evolution spezifische Virulenzfaktoren entwickelt haben, die ihnen trotz aktiver Basaler Resistenzmechanismen einen Befall ihrer jeweiligen Wirtspflanze ermöglichen (Nurnberger et al., 2004).

Die Rassenspezifische Resistenz (vgl. Box 1, Seite 12) beruht nun wiederum auf einer spezifischen Erkennung dieser Pathogene durch pflanzliche Rezeptoren. Klassischerweise wird dies mit der Gen-für-Gen-Hypothese erklärt (Flor, 1954).



Demnach werden spezifische Faktoren einer Pathogenrasse durch jeweils komplementäre pflanzliche Rezeptoren erkannt. Besitzt die Pflanze einen Rezeptor für mindestens einen dieser Faktoren, so wird eine effiziente Pathogenabwehr ausgelöst (die Interaktion zwischen Pflanze und Pathogen ist inkompatibel). Der entsprechende Pathogenfaktor wird somit als Avirulenzfaktor bezeichnet, da sein Vorhandensein bzw. seine Erkennung durch die Pflanze eine effiziente Pathogenabwehr auslöst. Wird das Pathogen hingegen nicht spezifisch erkannt, kommt es zur Ausprägung einer sogenannten kompatiblen Interaktion, d.h. die Pflanze ist anfällig für das entsprechende (virulente) Pathogen.

Eine direkte Interaktion zwischen Avirulenzfaktor und pflanzlichem Rezeptor würde jedoch eine nahezu unüberschaubare Anzahl von Rezeptoren erfordern, um spezifische Resistenz gegenüber der Vielzahl existierender Pathogene zu vermitteln. Man geht daher davon aus, daß die Avirulenzfaktoren oftmals indirekt erkannt werden. So könnten beispielsweise deren intrazellulären Ziele (z.B. Interaktoren oder Substrate) durch Rezeptoren überwacht werden. Die Avirulenzfaktoren würden demnach durch ihre Aktivität am überwachten Zielmolekül erkannt (Dangl and Jones, 2001).

Ein Beispiel hierfür liefert *RIN4*, ein Protein, welches als Zielmolekül mehrerer bakterieller Effektoren identifiziert werden konnte. Eine direkte Interaktion zwischen einem dieser Effektormoleküle und dem entsprechenden resistenzvermittelnden Rezeptor konnte in keinem der untersuchten Fälle nachgewiesen werden, allerdings interagieren sowohl der Effektor *AvrRpt2* als auch der Rezeptor *RPS2* mit *RIN4*. Der Komplex aus *RPS2* und *RIN4* liegt in uninfiziertem Gewebe konstitutiv vor (Mackey et al., 2002; Mackey et al., 2003). Neuere Befunde legen nahe, daß *RIN4* durch die proteolytische Aktivität des C-Terminus von *avrRpt2* degradiert wird, wodurch eine *RPS2*-abhängige Abwehrreaktion ausgelöst wird (Axtell and Staskawicz, 2003, Coaker et al, 2005). *RIN4* kann demnach eine reprimierende Funktion auf die resistenzvermittelnde Aktivität von *RPS2* zugeschrieben werden. Der Avirulenzfaktor *avrRpt2* würde somit indirekt durch dessen Aktivität am Zielmolekül *RIN4* wahrgenommen werden, und durch Aufhebung der Repression von *RPS2* eine Abwehrreaktion auslösen.

Die Rezeptoren, welche an der Erkennung der Pathogen-Effektoren beteiligt sind, werden als R-Proteine, die entsprechenden Gene als R-Gene bezeichnet. Sie zeichnen sich in der Regel durch eine zentrale putative Nucleotidbindestelle (NB) und eine C-terminale Leucin-reiche Repetitivsequenz (LRR) aus, welche charakteristisch für Proteininteraktionsdomänen ist (McDowell and Woffenden, 2003; Meyers et al., 2003). In *Arabidopsis* können je nach N-Terminus zwei Haupttypen von R-Proteinen unterschieden werden: bei *CC-NB-LRR*-Proteinen bildet der N-Terminus die Sekundärstruktur einer superspiralisierten  $\alpha$ -Helix (*coiled coil*) aus, wohingegen bei *TIR-NB-LRRs* der N-Terminus hohe Homologien zum Toll- bzw. Interleukin-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* bzw. *Homo sapiens* hat. Die bereits erwähnten tierischen und pflanzlichen PAMP-Rezeptoren zeichnen sich durch ähnliche Strukturmerkmale aus, was einen gemeinsamen evolutionären Ursprung vermuten läßt (Nurnberger et al., 2004).

Die einzig bisher bekannte Ausnahme in *Arabidopsis* bildet *RPW8*, welches sich nicht nur in seiner Struktur von allen anderen R-Genen unterscheidet, sondern auch effektiv Resistenz gegen alle getesteten Mehltauspezies vermittelt (Xiao et al., 2001). Hier kann man also im Gegensatz zur Rassenspezifischen Resistenz von einer Breitspektrum-Resistenz sprechen.

Bisher konnten R-Proteine aus mehreren Organismen charakterisiert werden. Bei *Cf-9* aus Tomate<sup>1</sup> und *Xa21* aus Reis<sup>2</sup> handelt es sich beispielsweise um membranständige Rezeptoren mit extrazellulärer LRR-Domäne (Jones et al., 1994; Song et al., 1995). Die Pathogenerkennung kann somit extrazellulär erfolgen, und über den C-Terminus ins Cytosol vermittelt werden.

Andere R-Proteine sind hingegen im Cytosol lokalisiert. Beispiele hierfür sind die *MLA*-Proteine aus Gerste<sup>3</sup> (Bieri et al., 2004) sowie die bisher isolierten *NB-LRR*-Proteine aus *Arabidopsis* (Nurnberger et al., 2004). Die cytoplasmatische Lokalisation der R-Proteine setzt voraus, daß die von ihnen erkannten Effektoren ebenfalls im Cytoplasma vorliegen. Bakterielle Pathogene wie z.B. *Pseudomonas syringae* übermitteln ihre Effektoren über sogenannte Typ-III-

---

<sup>1</sup> erkennt das Effektorprotein *Avr9* aus *Cladosporium fulvum*, dem Erreger der Samtfleckenkrankheit.

<sup>2</sup> erkennt das Effektorprotein *AvrXa21* aus *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, dem Erreger der Weißblättrigkeit.

<sup>3</sup> erkennen Stamm-spezifische Effektoren des Gerstemehltaus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*.

Sekretionssysteme (TTSS) ins Cytoplasma (Alfano and Collmer, 2004). Im Falle biotropher Pilze ist jedoch noch unklar, wie die entsprechenden Effektormoleküle ins pflanzliche Cytoplasma gelangen können. Ebenfalls offen ist, auf welchem Wege die Signaltransduktion bei R-Proteinen ohne Kinasedomäne, so z.B. bei den *Arabidopsis*-R-Proteinen, erfolgt.

Entscheidende weitere Komponenten der Signaltransduktion in *Arabidopsis* konnten jedoch bereits identifiziert werden. R-Proteine vom *TIR-NB-LRR*-Typ benötigen in der Regel *EDS1*, ein Lipase-ähnliches Protein. Bei *CC-NB-LRR*-Proteinen bildet hingegen *NDR1* ein zentrales Element der Signaltransduktion (Aarts et al., 1998). Beide Komponenten sind im Folgenden näher erläutert (vgl. 1.1.2).

Eine Ausnahme hierzu bildet das *CC-NB-LRR*-Protein *RPP8*, welches unabhängig von *EDS1* und *NDR1* Resistenz gegenüber dementsprechend avirulenten *Peronospora parasitica*-Stämmen vermittelt. Für diesen Fall muß also ein zusätzlicher Signalweg angenommen werden (McDowell et al., 2000).

### 1.1.2 Komponenten pflanzlicher Resistenzmechanismen

Genetische Komponenten von Resistenzmechanismen wurden hauptsächlich an der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (vgl. 1.2.1) untersucht. Der bisherige Schwerpunkt lag dabei auf Komponenten, die an der Vermittlung Basaler und Rassenspezifischer Resistenz beteiligt sind. Klassische *Arabidopsis*-Mutantensichtungen waren ausgerichtet auf die Isolierung von Linien, welche

- a) in Rassenspezifischen Resistenzmechanismen beeinträchtigt sind, beispielsweise also ihre Resistenz gegenüber dem *avrB*-exprimierenden *Pseudomonas syringae*-Stamm DC3000 verloren haben (*non-race-specific disease resistance*, *ndr*; Century et al., 1995).
- b) in Basalen Resistenzmechanismen beeinträchtigt sind. Hierbei wurden verschiedene Parameter angewandt, beispielsweise die reduzierte oder ausbleibende Synthese des Phytoalexins Camalexin nach Inokulation mit dem virulenten *Pseudomonas syringae*-Stamm ES4326 (*phytoalexin deficient*, *pad*; Glazebrook and Ausubel, 1994), die ausbleibende Induktion Salicylsäure-induzierter PR-Gene (s.ff.; *nonexpressors of PR genes*, *npr*; Cao et al., 1994),

oder die erhöhte Anfälligkeit gegenüber virulenten *Pseudomonas syringae*- bzw. *Peronospora parasitica*-Stämmen (*enhanced disease susceptibility, eds*; Glazebrook et al., 1996; Parker et al., 1996).

Dabei wurden unter anderem die bereits erwähnten Komponenten *NDR1* und *EDS1* identifiziert, die wesentliche Elemente der R-Protein-abhängigen Signalwege sind (vgl. 1.1.2; Century et al., 1995; Parker et al., 1996; Aarts et al., 1998). *NDR1* besitzt zwei Proteinbereiche, die Charakteristika von Transmembrandomänen aufweisen, ist also möglicherweise membranassoziiert (Century et al., 1997). Die subzelluläre Lokalisation sowie die genaue Funktion von *NDR1* sind jedoch bisher noch unbekannt.

*EDS1* konnte, ebenso wie dessen *in vivo*-Interaktionspartner *PAD4*, aufgrund von Homologien in der Proteinsequenz als putative Lipase charakterisiert werden (Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999; Feys et al., 2001). Die genaue Funktion beider Proteine ist jedoch bislang noch unklar. Während *EDS1* vorwiegend aufgrund seiner Funktion bei der Vermittlung der Hypersensitiven Zelltodreaktion charakterisiert wurde, konnte *PAD4* hauptsächlich eine regulatorische Funktion bei der Synthese des Signalmoleküls Salicylsäure (SA) zugeschrieben werden (Zhou et al., 1998). Innerhalb eines positiven Regulationszyklus wird SA nach Pathogenbefall *PAD4*-abhängig gebildet; gleichzeitig induziert wiederum SA die Expression von *PAD4* (Jirage et al., 1999). Aufgrund der *in vivo*-Interaktion der beiden Proteine sowie deren wechselseitigem Einfluß auf ihre Expression (Feys et al., 2001) können spezifische Funktionen von *EDS1* und *PAD4* jedoch nur begrenzt voneinander separiert werden. Zusammenfassend kann somit also dem *EDS1-PAD4*-Komplex eine zentrale Rolle sowohl in Rassenspezifischer als auch Basaler Resistenz zugeschrieben werden.

Salicylsäure ist ein zentrales Signalmolekül pflanzlicher Resistenzmechanismen. Wird SA durch das bakterielle Transgen *NahG* aus *Pseudomonas putida* eliminiert (You et al., 1991), so führt dies zu einer deutlich gesteigerten Anfälligkeit der transgenen Pflanzen gegenüber zahlreichen getesteten Pathogenen (Delaney et al., 1994). Auch andere Mutantenlinien mit Defekten in der Induktion des SA-Signals (*salicylic acid induction deficient; sid1, sid2*; Nawrath and Metraux, 1999; Dewdney et al., 2000) weisen veränderte Infektionsphänotypen nach Pathogeninokulation auf.

Mit *SID2* bzw. der dadurch codierten Isochorismatsynthase konnte eine Komponente der pathogeninduzierten SA-Biosynthese in *Arabidopsis* charakterisiert werden (Wildermuth et al., 2001). *SID1* hingegen codiert für ein Transporterprotein mit bislang ungeklärtem Wirkmechanismus innerhalb der pflanzlichen Resistenz (Nawrath et al., 2002).

Mutationen in *SID1* (alternativ: *EDS5*) und *SID2* (alternativ: *EDS16*) führen zu intermediärer Anfälligkeit gegenüber dem auf entsprechenden Wildtyp-Pflanzen avirulenten *Peronospora parasitica*-Stamm Emwa1. Beide Mutantenlinien sind zudem erhöht anfällig gegenüber dem virulenten Stamm Noco2 (Nawrath and Metraux, 1999; van der Biezen et al., 2002). Zudem konnte für *sid1*-Mutanten auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den virulenten Pathogenen *Golovinomyces orontii* (Isolat MGH) sowie *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Stamm ES4326) nachgewiesen werden (Glazebrook et al., 1996; Rogers and Ausubel, 1997; Reuber et al., 1998). Dies läßt auf eine zentrale Rolle von SA sowohl in basalen als auch in rassenspezifischen Resistenzmechanismen schließen.

Desweiteren wird auch die Bildung sogenannter PR (*pathogenesis related*)-Proteine nach Pathogenbefall durch SA induziert. Diese sind charakteristisch für die Ausprägung der sogenannten systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR), welche nach lokaler Infektion mit einem Pathogen zur verringerten Anfälligkeit distaler Pflanzenorgane führt (Shah, 2003; Durrant and Dong, 2004).

Mit dem SA-bindenden Protein 2 (*SABP2*) aus Tabak konnte erstmals ein Protein identifiziert werden, dessen Lipaseaktivität durch Bindung von SA signifikant erhöht werden konnte, und dessen posttranskriptionelle Ausschaltung zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber dem Tabakmosaikvirus (TMV) führt. Sowohl lokale als auch systemische Anfälligkeit sind in diesem Fall erhöht. *SABP2* wird somit als SA-Rezeptor mit entscheidender Funktion in der Signaltransduktion diskutiert. Die Charakterisierung entsprechender Komponenten aus *Arabidopsis* ist jedoch vermutlich durch die hohe Zahl an *SABP*-homologen Proteinen mit möglicherweise redundanter Funktion erschwert (Kumar and Klessig, 2003).

In *Arabidopsis* hingegen wurde zudem *NPR1* als zentrales Element der SA-Signaltransduktion identifiziert. Die entsprechende Mutante ist insensitiv gegenüber

SA sowie analogen synthetischen und biologischen Elicitoren der SAR. In Wildtyp-Pflanzen führt sowohl SA-Behandlung als auch Inokulation mit einem avirulenten Bakterienstamm zur deutlich verringerten Anfälligkeit gegenüber einer nachfolgenden Infektion mit virulentem *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. In *npr1*-mutanten Linien ist eine derartige systemische Resistenzreaktion jedoch nicht zu beobachten (Cao et al., 1994). *NPR1* stellt also ein Kontrollelement der SAR dar.

Die Aminosäuresequenz von *NPR1* weist vier repetitive Bereiche auf, die charakteristisch für Protein-Protein-Interaktionen sind, und zuvor bereits in einigen anderen Proteinen mit zum Teil transkriptionsregulierender Funktion nachgewiesen wurden (Cao et al., 1997). In biochemischen Studien konnte in der Folge eine Interaktion von *NPR1* mit dem Transkriptionsfaktor *TGA2* gezeigt werden (Fan and Dong, 2002). Cytologische Untersuchungen lieferten schließlich ein vollständigeres Bild der Wirkungsweise von *NDR1*. Demnach sind im uninduzierten Zustand mehrere *NPR1*-Moleküle über intermolekulare Schwefelbrücken zu einem cytosolisch lokalisierten Oligomer verbunden. Durch Änderungen im Redoxzustand der Zelle, die mit der Induktion der SAR einhergehen, werden die Schwefelbrücken reduziert und die *NPR1*-Monomere freigesetzt. Diese wandern in den Zellkern, wo sie durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren, z.B. *TGA2*, die Expression SA-responsiver Gene regulieren und somit systemische Resistenzreaktionen vermitteln können (Mou et al., 2003).

Weitere entscheidende Komponenten der Rassenspezifischen Resistenz konnten indes in Gerste (*Hordeum vulgare*) identifiziert werden. In einer Mutantensichtung nach Linien mit Verlust der *MLA12*-vermittelten Resistenz gegenüber dem Gerstemehltau wurde *rar1* (*required for MLA-mediated resistance*) isoliert (Freialdenhoven et al., 1994). Analog dazu wurden auch in *Arabidopsis rar1*-mutante Allele isoliert, welche zum Verlust der Rassenspezifischen Resistenz gegenüber dem *Peronospora parasitica*-Isolat Noco2 bzw. ausbleibender Zelltodreaktion nach induzierter transgener Expression des *Pseudomonas syringae*-Avirulenzfaktors *avrRPM1* führen (Muskett et al., 2002; Tornero et al., 2002).

Die *RAR1*-Aminosäuresequenz ist durch zwei zinkbindende Domänen charakterisiert (CHORD-I bzw. CHORD-II; Shirasu et al., 1999). CHORD-II ist zumindest *in vitro* an der Interaktion von *RAR1* mit *SGT1* beteiligt. Beide Proteine interagieren auch *in vivo*

(Azevedo et al., 2002). *SGT1* wurde ursprünglich in Hefe isoliert; der Name geht auf die Funktion des homologen Hefeproteins in der Regulation des Zellzyklus zurück (*suppressor of the G<sub>2</sub> allele of skp1*; Kitagawa et al., 1999). In *Arabidopsis* konnten zwei hochgradig sequenzverwandte Kopien von *SGT1* identifiziert werden, die beide mit *RAR1* interagieren (Azevedo et al., 2002). Parallele Mutantenmusterungen charakterisierten schließlich *SGT1b* als Regulator der Rassenspezifischen Resistenz gegenüber verschiedenen *Peronospora parasitica*-Stämmen (Austin et al., 2002; Tor et al., 2002). In Gerste konnten zudem individuelle und additive Effekte von *SGT1* und *RAR1* bei der Vermittlung der *MLA1*- und *MLA6*-spezifischen Resistenz gegenüber dem Gerstemehltau nachgewiesen werden (Azevedo et al., 2002).

Beide Komponenten sind also an der Vermittlung der Hypersensitiven Zelltodreaktion innerhalb der Rassenspezifischen Resistenz beteiligt. Trotzdem unterscheiden sich sowohl in *Arabidopsis* als auch in Gerste einige R-Gene in ihrer Abhängigkeit von *RAR1* und *SGT1*. In einigen Fällen werden beide Komponenten, in anderen wiederum nur eine der beiden zur Ausprägung der Rassenspezifischen Resistenz benötigt (Austin et al., 2002; Shen et al., 2003). Dies legt eine teils kooperative, teils unterschiedliche Funktion beider Komponenten nahe.

Für beide Proteine wird eine Funktion bei der Stabilisierung von R-Protein-Komplexen diskutiert. In Tabak wurde neben *SGT1* auch das Chaperon *HSP90* als *in vitro*-Interaktor von *RAR1* identifiziert (Liu et al., 2002). Auch in *Arabidopsis* konnte *HSP90* als *in vitro*- und *in vivo*-Interaktor von *RAR1* und *SGT1* identifiziert werden, der zudem zur Ausprägung der *RPS2*-vermittelten Rassenspezifischen Resistenz benötigt wird (Takahashi et al., 2003). Zudem konnte eine Interaktion von *HSP90* mit dem R-Protein *RPM1* sowie ein quantitativer Effekt von *HSP90* auf dessen Funktion nachgewiesen werden (Hubert et al., 2003). Insgesamt legen diese Daten also nahe, daß die Interaktionspartner *HSP90*, *RAR1* und *SGT1b* innerhalb von Proteinkomplexen eine stabilisierende Wirkung auf R-Proteine ausüben. Eine quantitative Reduktion von R-Proteinmengen in *rar1*-Mutanten konnte auch bereits in unterschiedlichen Untersuchungen an *Arabidopsis* und Gerste beobachtet werden (Tornerio et al., 2002; Bieri et al., 2004).

Für *SGT1b* wurde zudem auch in mehreren Systemen eine Interaktion mit dem Ubiquitin-Ligase-Komplex nachgewiesen (Kitagawa et al., 1999; Azevedo et al.,

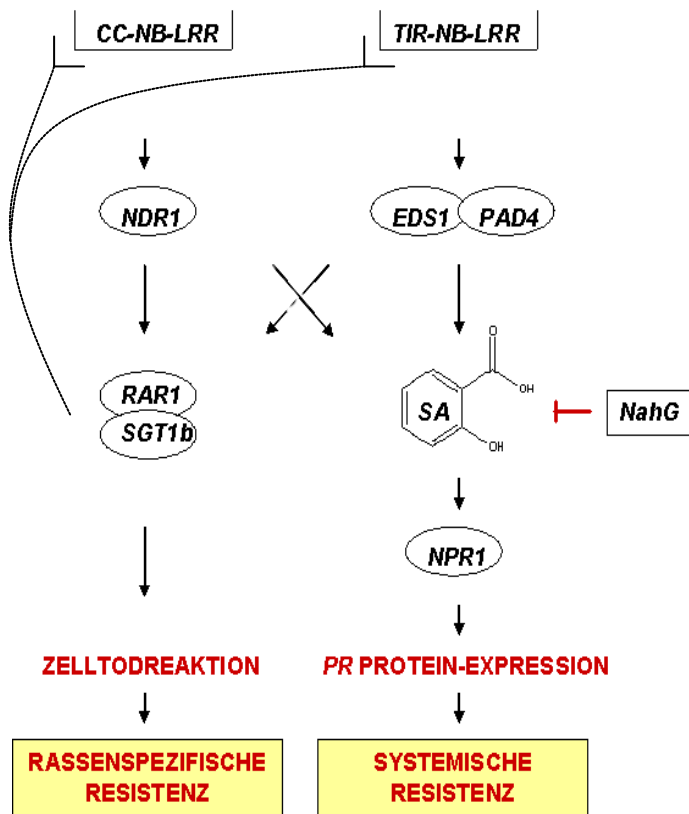
2002). Durch diesen werden Proteine mit Ubiquitin markiert und somit zur proteasomalen Degradation bestimmt (Devoto et al., 2003; von Arnim, 2003). Es ist also auch denkbar, daß *SGT1* über den Ubiquitin-Ligase Komplex eine regulatorische Funktion auf die Stabilität von resistenzvermittelnden Proteinen hat. Im Falle von transkriptionellen Regulatoren der Auxinantwort konnte bereits eine Beteiligung von *SGT1b* an deren Degradation nachgewiesen werden (Gray et al., 2003).

Das Zusammenspiel einiger der bisher beschriebenen Komponenten pflanzlicher Resistenzmechanismen, auf welche auch im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher Bezug genommen wird, ist in Abbildung 1 (Seite 22) in einem vereinfachten Modell dargestellt.

Zusätzlich zu den hier beschriebenen Faktoren konnte auch Elementen der Jasmonat(JA)- und Ethylen(ET)-Signaltransduktion eine Funktion in der Vermittlung pflanzlicher Resistenz zugeschrieben werden (Glazebrook, 2001; Kunkel and Brooks, 2002; Hammond-Kosack and Parker, 2003). Klassischerweise wird dem JA-Signalweg eine Funktion in der Reaktion auf Herbivore zugeschrieben. Beide Signalwege sind zudem an der Vermittlung der Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen beteiligt (Kunkel and Brooks, 2002). Vergleichende Untersuchungen legen zudem distinkte Funktionen des SA- und JA-Signalwegs in der Abwehr biotropher bzw. nekrotropher Pathogene nahe (Thomma et al., 1998).

Unterschiedliche Signalwege und Resistenzmechanismen für beide Pathogenklassen sind notwendig, da beispielsweise die Zelltodreaktion attackierter Zellen in biotrophen Interaktionen zur lokalen Eindämmung des Pathogens führt und somit an der Resistenzvermittlung beteiligt ist (Abramovitch et al., 2003), während umgekehrt die Induktion der Zelltodreaktion in Interaktionen mit nekrotrophen Pathogenen einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt (Lincoln et al., 2002).





**Abbildung 1: Vereinfachtes Modell des Zusammenspiels zentraler Faktoren in pflanzlichen Resistenzmechanismen**

Die Abbildung beinhaltet nur die genetischen Komponenten, die schwerpunktmäßig in dieser Arbeit behandelt werden. In einer Rassenspezifischen Resistenzreaktion werden Avirulenzproteine inkompatibler Pathogene durch R-Proteine erkannt. Je nach Typ (*CC-NB-LRR* bzw. *TIR-NB-LRR*) wird die Signaltransduktion in der Regel entweder über *NDR1* oder den *EDS1-PAD4*-Komplex vermittelt. In beiden Fällen ist Salicylsäure (SA) ein zentrales Signalmolekül, welches über die *NPR1* die Expression von *Pathogenesis-Related (PR)*-Proteinen induziert und systemische Resistenz vermittelt. Durch das *NahG*-Transgen kann SA zu Catechol degradiert werden. Der *RAR1-SGT1b*-Komplex wurde zunächst als Konvergenzpunkt zur Vermittlung der Zelltodreaktion in Rassenspezifischen Resistenzreaktionen angesehen. Neuere Erkenntnisse legen jedoch auch eine Funktion bei der Stabilisierung von R-Proteinen nahe (nach Glazebrook, 2001 und Hammond-Kosack and Parker, 2003)

Dementsprechend konnte auch eine antagonistische Wirkung von SA- und JA-Signalweg nachgewiesen werden (Niki et al., 1998). So wird beispielsweise der JA-Signalweg durch Aktivierung des SA-Signalwegs inhibiert (Gupta et al., 2000); *NPR1* ist an diesem Prozess beteiligt (Spoel et al., 2003). Neuere Untersuchungen deuten zudem auf eine zentrale Funktion von *EDS1* und *PAD4* bei der Regulierung der gegenseitigen Inhibition beider Signalwege hin (Brodersen et al., 2005).

Innerhalb der Rassenspezifischen und Basalen Resistenz gegenüber biotrophen Pathogenen spielen JA- und ET-Signalweg somit nur eine untergeordnete Rolle.

#### **1.1.4 Nichtwirtsresistenz**

Im Gegensatz zur Rassenspezifischen Resistenz waren molekulare Komponenten der Nichtwirtsresistenz (vgl. Box 1, Seite 12) zu Beginn dieser Arbeit weitgehend unbekannt. Lediglich in einzelnen Fällen wurde eine Beteiligung genetischer Komponenten an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz nachgewiesen (Mysore and Ryu, 2004).

Ein erstes näher untersuchtes Beispiel in *Arabidopsis* liefert *NHO1*, welches für eine Glycerolkinase codiert. Während Wildtyp-Pflanzen keine Symptome nach Inokulation mit verschiedenen inkompatiblen *Pseudomonas syringae*-Stämmen zeigen, ist die *nho1*-Mutante deutlich anfällig gegenüber diesen Pathogenen. In weiteren Untersuchungen wurde zudem auch eine Funktion von *NHO1* in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *Botrytis cinerea*, nicht jedoch gegenüber anderen getesteten nekrotrophen Pathogenen beobachtet (Lu et al., 2001; Kang et al., 2003). Die Funktion von *NHO1* innerhalb der Nichtwirtsresistenz ist somit also auf bestimmte Pathogene beschränkt; der resistenzvermittelnde Mechanismus von *NHO1* ist jedoch noch unklar.

Neben den beschriebenen genetischen Studien lieferten auch pharmakologische Untersuchungen Hinweise auf Komponenten der Nichtwirtsresistenz in verschiedenen Systemen. Durch Behandlung mit dem Actin-Inhibitor Cytochalasin konnte beispielsweise der Penetrationserfolg mehrerer Pathogene auf verschiedenen Nichtwirtspflanzen signifikant erhöht werden (Kobayashi et al., 1997a; Kobayashi et al., 1997b). Die Kombination von Cytochalasinbehandlung und Mutation von *EDS1*

fürte in *Arabidopsis* sogar zum Verlust der Nichtwirtsresistenz gegenüber dem Weizenmehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*; Yun et al., 2003).

Bisher wurde jedoch keine Mutantenlinie oder Mutantenkombination beschrieben, in der die Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegenüber Mehлтаupilzen ohne pharmakologische Behandlung gebrochen werden konnte. Eine rein genetische Charakterisierung dieser Nichtwirtsresistenz ist also bisher nicht erfolgt.

In Genexpressionsstudien konnte jedoch gezeigt werden, daß sich die Expressionsmuster in Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen grundlegend unterscheiden. Während nach Inokulation mit biotrophen Nichtwirtspathogenen die Expression von Komponenten und Zielgenen des JA-Signalwegs hochreguliert wird, werden nach Inokulationen mit biotrophen Wirtspathogenen hauptsächlich charakteristische Gene des SA-Signalwegs induziert (Huitema et al., 2003; Zimmerli et al., 2004).

Zudem konnte in einem ersten Fall auch die Fähigkeit zur Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen als entscheidender Unterschied zwischen Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen beschrieben werden. In Untersuchungen mit virulenten und nichtvirulenten Stämmen des Wurzelpathogens *Pseudomonas syringae* wurde gezeigt, daß die virulenten Stämme im Gegensatz zu avirulenten Stämmen dazu in der Lage sind, die Ausscheidung von antimikrobiellen Wurzelexsudaten zu unterdrücken, was ihnen einen Befall des Wurzelgewebes ermöglicht (Bais et al., 2005).

Aufgrund der bislang vorliegenden Erkenntnisse wurde jedoch lediglich ein mehrstufiges Modell der Nichtwirtsresistenz vorgeschlagen, demzufolge ein Pathogen mehrere Hürden überwinden muß, um eine Pflanze erfolgreich befallen zu können. So können beispielsweise die Beschaffenheit der Wirtsoberfläche, sowie präformierte und induzierte Barrieren an der Pathogenabwehr beteiligt sein. Im weiteren Verlauf sind schließlich der Zugang des Pathogens zu Nährstoffen sowie die Vermeidung der Erkennung durch pflanzliche Abwehrsysteme entscheidend (Thordal-Christensen, 2003).

Zudem wurden je nach symptomatischer Ausprägung zwei Klassen der Nichtwirtsresistenz unterschieden. Bei Typ I kommt es zu keinerlei makroskopisch erkennbaren Symptomen, wohingegen Typ II durch das Auftreten einer Zelltodreaktion an der Interaktionsstelle gekennzeichnet ist (Mysore and Ryu, 2004).

Diese Befunde und Modelle legen nahe, daß auch Komponenten anderer Resistenzmechanismen an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz beteiligt sein könnten. Ob bzw. in welchem Maße dies der Fall ist, war jedoch zu Beginn dieser Arbeit unklar.

## **1.2 Pathosysteme zur Analyse der Nichtwirtsresistenz**

Die genetischen Analyse der Nichtwirtsresistenz erfolgte hauptsächlich an den Pathosystemen *Arabidopsis*-Gerstemehltau und *Arabidopsis*-Erbsenmehltau. Diese konnten bereits in vorangegangenen Studien, welche die Grundlage dieser Arbeit bilden, etabliert werden (Collins et al., 2003; V. Lipka, unveröffentlicht). Bisher konnte auf keinem der getesteten *Arabidopsis*-Ökotypen eine Reproduktion dieser Mehлтаupilze beobachtet werden (Zimmerli et al., 2004; V. Lipka, persönliche Mitteilung; und eigene Beobachtungen). Es handelt sich somit also in beiden Fällen um eine Nichtwirtsinteraktion. Die Komponenten der beiden Pathosysteme werden im Folgenden näher erläutert.

### **1.2.1 Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana***

Die Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*, vgl. Abbildung 2, Seite 26) ist eine Blütenpflanze aus der Familie der Brassicaceen, welche aufgrund ihrer relativen anspruchslosigkeit hinsichtlich Aufzuchtfläche und -Bedingungen, ihrem schnellen Reproduktionszyklus von ca. 6 Wochen sowie ihrem mit 5 Chromosomen relativ kleinen Genom besonders gut für genetische Untersuchungen geeignet ist. Zudem ist ihre gesamte genomische Sequenz bekannt (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). *Arabidopsis* wurde daher bereits in zahlreichen physiologischen und genetischen Studien als Modellpflanze etabliert (Somerville and Koornneef, 2002). Auch die biotische Interaktion von *Arabidopsis* und Mehлтаupilzen diente in den vergangenen Jahren als Modell zur genetischen Analyse kompatibler Wirt-Pathogen-Systeme (Vogel und Somerville, 2002).



**Abbildung 2: *Arabidopsis thaliana***

**Links:** 3 Wochen alte Pflanzen; mit Pflanzen in diesem Stadium wurden die Inokulationsexperimente durchgeführt. **Rechts:** 6 Wochen alte (adulte) Pflanzen.

### **1.2.2 Gerstemehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) und Erbsenmehltau (*Erysiphe pisi*)**

Mehltaupilze sind weit verbreitete pflanzliche Krankheitserreger, deren Name auf das resultierende Krankheitsbild (dichte Sporenbildung auf der Ober- und/oder Unterseite von befallenen Blättern) zurückgeht. Je nach phylogenetischer Zugehörigkeit unterscheidet man Echte Mehltaupilze (Echte Pilze aus dem Stamm der Ascomyceten) von den dazu komplementär benannten „Falschen Mehltaupilzen“, die zum Stamm der Oomyceten zählen (Schlösser, 1997; Braun et al., 2002).

Gerstemehltau (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*; *Bgh*) und Erbsenmehltau (*Erysiphe pisi*) zählen zu den Echten Mehltaupilzen der Ordnung *Erysiphales*. Sie zeichnen sich u.a. dadurch aus, daß sie nur Epidermiszellen oberirdischer Pflanzenteile befallen (Green et al., 2002).

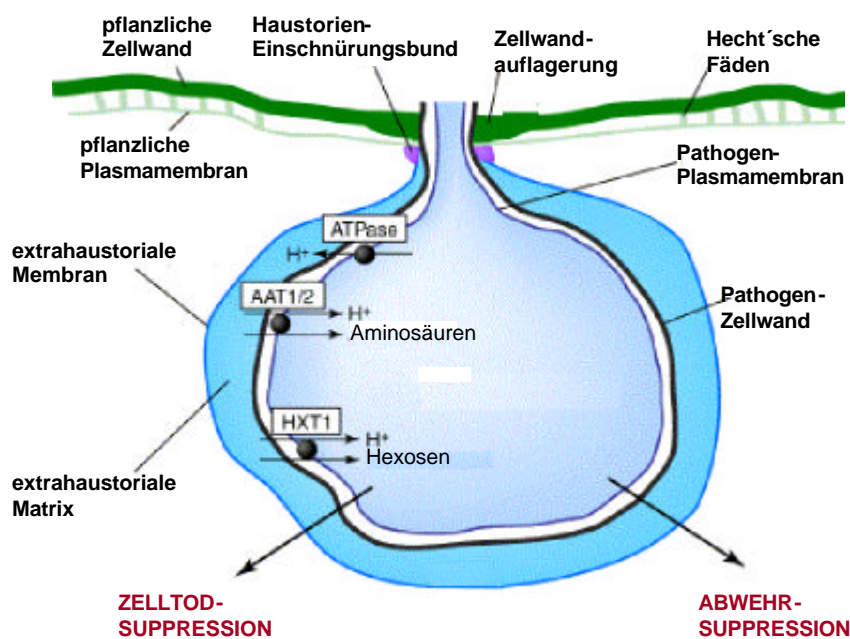
Der Infektionsprozess beginnt zunächst mit dem Auskeimen der Mehлтаuspore auf der Blattoberfläche. Diese wird bereits durch die Beschaffenheit bzw. die chemische Zusammensetzung der Blattoberfläche beeinflusst (Tsuba et al., 2002, und eigene Beobachtungen). *Bgh*-Sporen bilden zunächst einen primären Keimschlauch aus, mit dem sie sich an der Blattoberfläche anheften. Am gegenüberliegenden Sporende wird sodann der sekundäre Keimschlauch ausgebildet, mit dem der Pilz versucht, die Epidermiszelle zu penetrieren. Im Gegensatz dazu keimen die Sporen des Erbsenmehltaus mit nur einem Keimschlauch aus, welcher somit auch die Funktion der Infektionshyphs übernimmt (Green et al., 2002).

Die Penetration der Epidermiszelle erfolgt mittels eines stilettähnlichen Penetrationsapparates (Appressorium) an der Spitze der Infektionshyphs, und kann sowohl durch enzymatische Degradation der Zellwand als auch durch mechanischen Druck erfolgen (Green et al., 2002). Bei *Bgh* wurde eine Beteiligung beider Faktoren am Penetrationsvorgang nachgewiesen (Pryce-Jones et al., 1999).

Ein weiteres Charakteristikum der Echten Mehltäupilze ist die Biotrophie, d.h. sie sind auf lebendes Wirtsgewebe angewiesen. Um ihren Wirtszellen Nährstoffe entziehen zu können, bilden die Mehltäupilze nach erfolgreicher Penetration ein Ernährungsorgan (Haustorium) aus (vgl. Abbildung 3, Seite 28). Dieses bleibt zwar durch mehrere Membranschichten vom Cytoplasma der Wirtszelle getrennt, jedoch konnten mehrere Transporterproteine in der Extrahaustoriellen Membran nachgewiesen werden, über welche beispielsweise Aminosäuren oder Hexosemonosaccharide transportiert werden. Um diesen Transport aufrecht erhalten zu können, muß der Pilz zudem in der Lage sein, die befallene Zelle aktiv am Leben zu erhalten und Abwehrreaktionen zu unterdrücken (Panstruga, 2003). Genexpressionsstudien weisen darauf hin, daß die dazu notwendige teilweise genetische Umprogrammierung der Wirtszelle aktiv vom Pilz beeinflusst wird (Gjetting et al., 2004).

Im Gegensatz dazu verursachen nekrotrophe (z.B. *Alternaria spec.*) oder hemibiotrophe Pathogenen (z.B. *Colletotrichum spec.*, *Phytophthora infestans*) das Absterben des Wirtsgewebes gleich zu Beginn bzw. im Verlauf des Infektionsprozesses, um sich anschließend von dem abgestorbenen Gewebe zu ernähren (Mendgen and Hahn, 2002; Oliver and Ipcho, 2004).

In kompatiblen Interaktionen kommt es nach der Ausbildung eines Primärhaustoriums und der darüber erfolgenden Nährstoffaufnahme zu einer weiteren Ausbreitung der Pilzkolonie auf der Blattoberfläche. Die in der Folge ausgebildeten Hyphen werden als Sekundärhyphen, die nachfolgenden Penetrationsereignisse als Sekundärpenetrationen bezeichnet. Der Lebenszyklus des Pilzes schließt sich letztlich mit der Ausbildung von Sporangienträgern (Conidiophoren), an deren oberem Ende Sporen (Conidien) abgeschnürt werden, die wiederum andere Pflanzen oder Pflanzenteile befallen können (Schlösser, 1997).



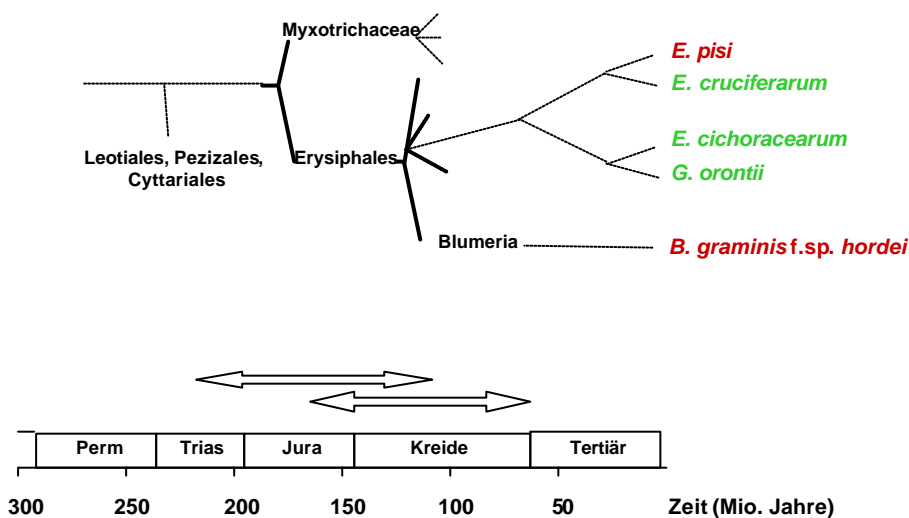
### Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Haustoriumquerschnitts

Zwischen Pilz und Wirtszelle entsteht eine komplexe Struktur, die sich sowohl aus pflanzlichen als auch aus pilzlichen Zellwand- und Membranschichten aufbaut. Über Transporter in der Pathogen-Plasmamembran versorgt sich der Pilz mit von der Wirtszelle gebildeten Aminosäuren und Hexosen. Zur Aufrechterhaltung der Biotrophie muß das Pathogen in der Lage sein, die pflanzliche Abwehr und die Zelltodreaktion der Wirtszelle zu unterdrücken (nach Panstruga, 2003).

Im Gegensatz zu *Bgh* und *E. pisi* sind beispielsweise *Erysiphe cichoracearum*, *Golovinomyces orontii* und *Erysiphe crucifrarum* dazu in der Lage, ihren Lebenszyklus auf Wildtyp-*Arabidopsis* zu komplementieren (Vogel and Somerville, 2002). Vergleichende Analysen ribosomaler DNA-Sequenzen lassen auf eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zwischen *E. pisi* und einem der *Arabidopsis*-pathogenen Mehltaupilze (*E. cruciferarum*) schließen. Im Vergleich dazu ist die

evolutionäre Distanz von *Bgh* sowohl zu *E. pisi* als auch zu den *Arabidopsis*-pathogenen Mehltäupilzen deutlich größer (vgl. Abbildung 4; Saenz and Taylor, 1999; V. Lipka, unveröffentlicht).

Die Untersuchung beider Nichtwirts-Interaktionen kann somit also auch Aufschluß über die Grundlagen der Ausbildung verschiedener Wirtsspektren im Laufe der Evolution geben.



#### Abbildung 4: Phylogenie der Mehltäupilze

Phylogenetische Verwandtschaft der *Arabidopsis*-pathogenen Mehltäupilze (grün) und der in dieser Arbeit verwendeten Nichtwirts-Pathogene (rot; nach Saenz & Taylor, 1997).

### 1.3 *pen*-Mutanten identifizieren Komponenten der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis*

In mehreren parallelen Mutantensichtungen konnten Linien identifiziert werden, die eine erhöhte Penetrationsrate von *Bgh* auf Blattepidermiszellen aufweisen. Bisher konnten 3 der entsprechenden *PEN*-Gene näher charakterisiert werden. Mutationen in diesen führen zwar zu einer erhöhten Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh*, die



weitere Entwicklung des Pilzes ist jedoch durch eine nachfolgend einsetzende Zelltodreaktion gestoppt (Collins et al., 2003).

### 1.3.1 *PEN1*

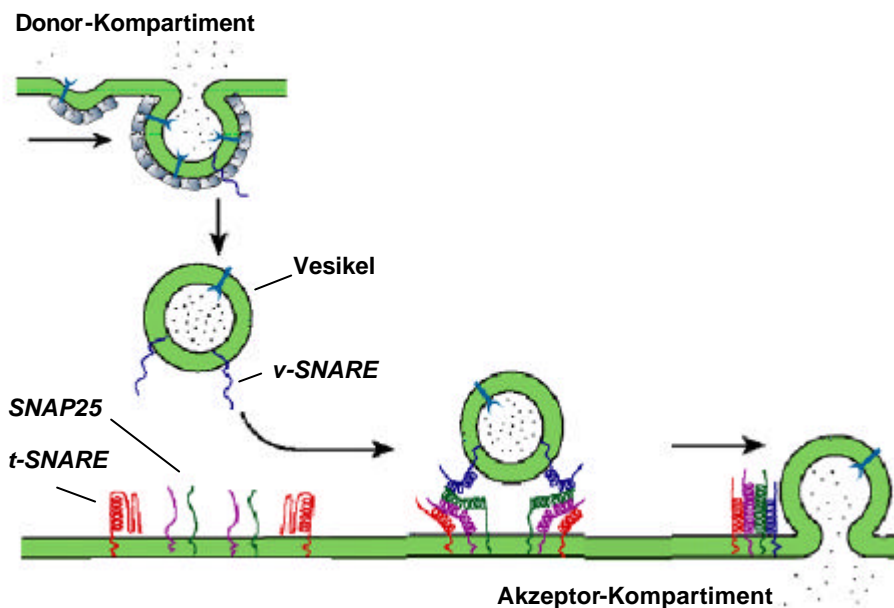
*PEN1* (At3g11820) codiert für ein plasmamembranlokalisiertes Syntaxin, was auf eine Beteiligung an Vesikelfusionsprozessen schließen läßt (Collins et al., 2003).

An der Vesikelfunktion sind Synaptosom-assoziierte Proteine (*SNAPs*) sowie Syntaxine (*SNAP-Rezeptoren*; *SNAREs*) beteiligt. Man unterscheidet zwischen vesikel-assoziierten *v-SNAREs* und zielmembran-(target-)assoziierten *t-SNAREs*. Bei *PEN1* handelt es sich somit also um ein *t-SNARE*-Protein. Gemeinsam mit zwei Domänen des ebenfalls zielmembranständigen *SNAP*-Proteins bilden *t-SNAREs* einen ternären Komplex in offener Konformation, der als Rezeptor für das entsprechende *v-SNARE* dient. Bei Interaktion mit diesem wird ein quarternärer Komplex gebildet, der schließlich die Fusion von Vesikelmembran und Zielmembran katalysiert (vgl. Abbildung 5, Seite 31; Xue and Zhang, 2002; Pratelli et al., 2004). Ein mit *PEN1* interagierendes *v-SNARE*-Protein bzw. die dadurch ins Zielkompartiment beförderte Vesikelladung konnte jedoch bisher noch nicht isoliert werden.

Der beobachtete Effekt der *pen1*-Mutation auf den Infektionsphänotyp scheint zudem spezifisch für Echte Mehltaupilze zu sein. Nach Inokulation mit diversen anderen biotrophen, hemibiotrophen und nekrotrophen Pathogenen konnte keine erhöhte Anfälligkeit der *pen1*-Mutante festgestellt werden (V. Lipka, unveröffentlicht).

Interessanterweise ist *PEN1* homolog zu dem Gersteprotein *ROR2*, welches als notwendiger Faktor der *mlo*-vermittelten Resistenz in Gerste identifiziert wurde (Freialdenhoven et al., 1996; Collins et al., 2003). Bei *MLO* handelt es sich um ein Transmembranprotein, dessen Vorhandensein zur Anfälligkeit von Gerste gegenüber Gerstemehltau führt. Homozygote *mlo*-Mutanten hingegen sind resistent gegenüber *Bgh* (Buschges et al., 1997). Ähnliche Mechanismen sind offenbar auch in *Arabidopsis* konserviert. Während Wildtyp-Pflanzen anfällig für die *Arabidopsis*-pathogenen Mehltauarten *Erysiphe cichoracearum* und *Golovinomyces orontii* sind, führen Mutationen in *AtMLO2* (Synonym: *AtPMR2*) zur vollständigen bzw. deutlich

erhöhten Resistenz gegenüber diesen Pathogenen (Vogel and Somerville, 2000; Consonni, 2004).



### Abbildung 5: Modell der Syntaxin- vermittelten Vesikelfusion

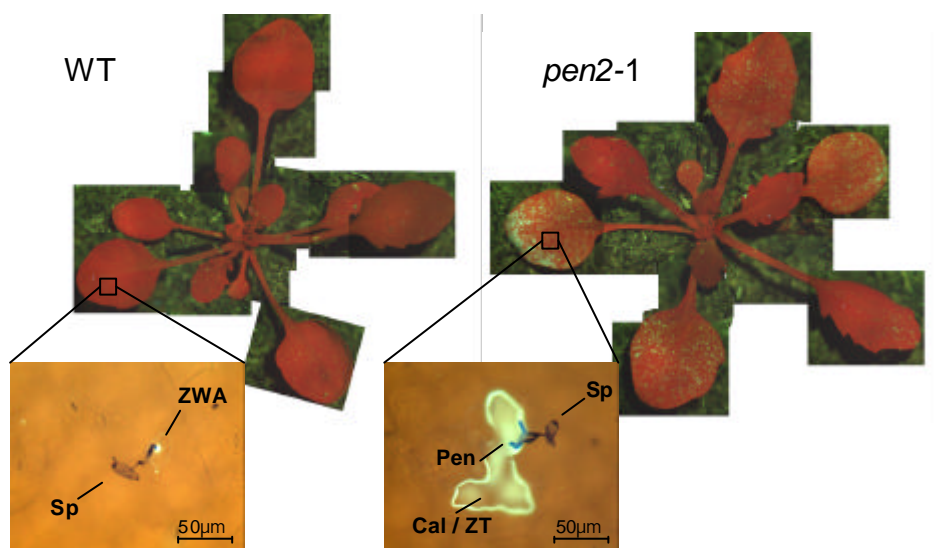
Um ihre Ladung von einem Donor- zu einem Akzeptorkompartiment transportieren zu können, müssen Vesikel mit der Membran des Akzeptor-kompartiments fusionieren. Dies wird durch zwei Domänen (violett und grün) eines zielfembranständigen Synaptosom-assoziierten Proteins (*SNAP*) sowie *SNAP*-Rezeptorproteinen (*SNARE*, Syntaxine) vermittelt, die in der Vesikel- (*v-SNARE*; blau) oder Zielmembran (*target*; *t-SNARE*; rot) verankert sind. Ein quarternärer Komplex aus *v-SNARE*, den beiden *SNAP*-Domänen und *t-SNARE* vermittelt die Fusion des Vesikels mit der Zielmembran. Dadurch wird die Vesikelladung ins Akzeptor-Kompartiment entlassen (nach (Bock et al., 2001).

Interaktions- und Lokalisationsstudien weisen zudem auf eine Pathogen-induzierte Colokalisation unterhalb von *Bgh*-Interaktionsstellen sowie eine spezifische Interaktion von *PEN1/ROR2* und *MLO* hin (Assaad et al., 2004; Consonni, 2004; Bhat et al., 2005; R. Bhat, unveröffentlicht).

Aufgrund dieser Daten kann vermutet werden, daß *ROR2/PEN1* durch *MLO* sequestriert und in einem inaktiven Komplex gebunden wird. In *MLO*-Linien würde dadurch der Vesikeltransport in Richtung der Penetrationsstelle reduziert, was zu deren erhöhter Anfälligkeit gegenüber Mehltaupilzen beitragen könnte (Schulze-Lefert, 2004).

### 1.3.2 *PEN2*

Die *pen2*-Mutante bildet den Ausgangspunkt für die Mehrzahl der in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen. Der Phänotyp, der zur Isolierung der *pen*-Mutanten führte, ist daher repräsentativ am Beispiel der *pen2-1*-Mutante in Abbildung 6 dargestellt. Der erhöhte *Bgh*-Penetrationserfolg führt nachfolgend zu einer erhöhten Zelltodrate. Die Zelltod-assoziierte Autofluoreszenz kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.



#### **Abbildung 6: Phänotyp der *pen2*-Mutante nach Inokulation mit Gerstemehltau**

**Oben:** Vergleich 4 Wochen alter Pflanzen (Wildtyp (WT) und *pen2-1*-Mutante) 72 Stunden nach Inokulation mit Sporen des Gerstemehltaus; Aufnahme unter UV-Licht zur Detektion der Zelltodautofluoreszenz.

**Unten:** Mikroskopische Aufnahmen Anilinblau-gefärbter, repräsentativer Interaktionsstellen. *Sp*: Spore, *ZWA*: Zellwandapposition, *Pen*: Penetrationsstelle, *Cal*: zellumschließende Callosedeposition, *ZT*: Zelltodautofluoreszenz.

*PEN2* (At2g44490) codiert für eine Familie 1-*b*-Glycosylhydrolase, also einem Enzym, welches Glucosereste von einem Substrat abspalten kann. Daneben weist *PEN2* mit einer C-terminalen, putativ membranassoziierten Domäne ein weiteres spezifisches Merkmal auf. Obwohl der Großteil des *PEN2*-Proteins im Cytoplasma lokalisiert ist, sind sowohl katalytische Aktivität als auch das Vorhandensein der

putativen Membranlokalisationsdomäne für die Funktion von *PEN2* innerhalb der Pathogenabwehr erforderlich (V. Lipka, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu *pen1* führt die *pen2*-Mutation auch zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber mehreren getesteten biotrophen, hemibiotrophen und nekrotrophen Wirts- bzw. Nichtwirtspathogenen. Der *PEN2*-vermittelte Resistenzmechanismus ist somit nicht nur auf Interaktionen mit Mehлтаupilzen beschränkt. Weitere Hinweise auf den Wirkmechanismus werden von der noch ausstehenden Isolierung des Substrates von *PEN2* erwartet.

### 1.3.3 *PEN3*

*PEN3* (At1g59870) codiert für ein ABC-(*ATP binding cassette*)-Transporterprotein (M. Stein, persönliche Mitteilung). Diese katalysieren Transportprozesse durch Bindung und Hydrolyse von ATP oder anderer Nucleotide, und sind häufig an Entgiftungsprozessen beteiligt (Martinoia et al., 2002). Bisher konnten zwei chemisch induzierte *pen3*-mutante Allele isoliert werden; beide weisen eine Mutation in der ATP-Bindestelle auf. Vorläufige Ergebnisse lassen zudem darauf schließen, daß es sich auch bei diesen Allelen um Nullmutanten handelt. Das von *PEN3* transportierte Substrat ist jedoch ebenfalls noch nicht bekannt (M. Stein, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu *pen1* und *pen2* führen *pen3*-Mutationen nicht nur zu einer stark erhöhten Penetrationsrate von *Bgh*, sondern erlauben auch die verstärkte Ausbildung von mehrfach verzweigtem sekundärem Hyphenwachstum. Charakteristischerweise weisen zahlreiche *Bgh*-Kolonien auf *pen3*-Mutanten mehrfache Verzweigungen des Myzels auf, wie sie in dieser Form nur äußerst selten auf *pen1*- oder *pen2*-Mutanten beobachtet werden können. Eine massive Koloniausbreitung, die letztendlich sogar zur Sporulation von *Bgh* führen würde, konnte jedoch auch auf *pen3*-Mutanten bisher nicht beobachtet werden. Weitere phänotypische Untersuchungen lassen zudem auf eine gegensätzliche Funktion von *PEN3* in Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen schließen. Im Gegensatz zur erhöhten Anfälligkeit gegenüber den Nichtwirten *Bgh* und *E. pisi* zeigen *pen3*-Mutanten eine erhöhte Resistenz gegenüber dem *Arabidopsis*-Mehltau *Erysiphe cichoracearum* (M. Stein, persönliche

Mitteilung). Die molekularen Grundlagen dieses Phänomens sind jedoch bislang noch unklar.

#### **1.4 Zielsetzung dieser Arbeit**

In den beschriebenen *pen*-Mutanten kommt es in erhöhtem Maße zur erfolgreicher Penetration von *Bgh* und *E. pisi*. Trotz verstärkter Haustorienausbildung in attackierten Blattepidermiszellen sind diese Mutanten nicht voll anfällig gegenüber diesen beiden Pathogenen. Die dauerhafte Nutzung der penetrierten Zellen als Nahrungsquelle wird durch das Einsetzen einer posthaustoriellen Zelltodreaktion verhindert. Dadurch wird auch eine großflächige weitere Ausbreitung der Kolonien auf der Blattoberfläche bzw. die Reproduktion des Pilzes unterbunden.

Somit müssen also noch weitere Faktoren angenommen werden, welche an der Vermittlung dieser posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war es nun, ausgehend vom Phänotyp der *pen2*-Mutante, einige dieser Faktoren zu isolieren und zu charakterisieren. Dazu wurden zwei parallele Ansätze verfolgt:

- 1) „*reverse genetics*“: Analyse der genetischen Interaktionen von *PEN2* mit anderen bereits bekannten Resistenz- und Abwehrkomponenten.
- 2) „*forward genetics*“: Isolierung von *pen2*-Suppressormutanten mit verändertem Infektionsphänotyp.

Die Ergebnisse beider Ansätze werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

## **2. MATERIAL & METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Pflanzenmaterial**

In dieser Arbeit wurden *Arabidopsis*-Pflanzen der Ökotypen Columbia (Col-0; Col-3 *gll*), Landsberg erecta (La-er) und Wassilewskija (Ws-0) verwendet. Das Saatgut der Wildtyp-Pflanzen wurde vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASc) bezogen. EMS-remutagenisiertes *pen2-1*-Saatgut wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Volker Lipka. Eine Übersicht der verwendeten Mutantenlinien, ihres jeweiligen Ökotyps und der Bezugsquelle ist in Tabelle 1 (siehe Seite 36) aufgeführt.

Zur Kultivierung der Pathogene wurde Gerste (*Hordeum vulgare*) des Kultivars *Ingrid* Linie I-10 sowie Erbsen (*Pisum sativum*) der Kultivare *Linga* und *Wunder von Kelvedon* verwendet.

#### **2.1.2 Pflanzenpathogene**

Die Inokulationsexperimente wurden mit Gerstemehltau (*Blumeria graminis* f.sp.*hordei* Isolat K1) sowie mit Erbsenmehltau (*Erysiphe pisi*, Birmingham-Isolat) durchgeführt.

#### **2.1.3 Vektoren und Bakterienstämme**

Zum posttranskriptionellen *silencing* des *PAD4*-Gens wurden *Arabidopsis*-Pflanzen mit dem *pJawohl8-PAD4i* Konstrukt transformiert, welches die gesamte genomische *PAD4*-Sequenz in inverser Wiederholung enthält. Zur Transformation wurde der *Agrobacterium tumefaciens* – Stamm GV3101 (pMP90RK) verwendet. Konstrukt und Bakterienstämme wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christina Neu.

**Tabelle 1: Verwendete Mutantenlinien**

<b>Mutante Allele</b>	<b>Ökotyp</b>	<b>Referenz</b>	<b>Bezugsquelle</b>
<i>edr1-1</i>	Col-0	Frye <i>et al.</i> , 1998; Frye <i>et al.</i> , 2001	R. Innes, Indiana University
<i>eds1-1</i>	Ws-0	Parker <i>et al.</i> , 1996; Falk <i>et al.</i> , 1999	J. Parker, Köln
<i>eds1-2</i>	La-er	Aarts <i>et al.</i> , 1998; Falk <i>et al.</i> , 1999	J. Parker, Köln
<i>eds5-1 (=sid1-1)</i>	Col-0	Rogers & Ausubel, 1997; Nawrath <i>et al.</i> , 2002	F. Ausubel, Harvard
<i>eds16-1 (=sid2-1)</i>	Col-0	Nawrath & Métraux, 1999; Wildermuth <i>et al.</i> , 2001	F. Ausubel, Harvard
<i>ein2-1</i>	Col-0	Guzmán & Ecker, 1990; Roman <i>et al.</i> , 1995	NASC, Nottingham
<i>ein4-1</i>	Col-0	Roman <i>et al.</i> , 1995	NASC, Nottingham
<i>etr1-1</i>	Col-0	Bleecker <i>et al.</i> , 1988; Chang <i>et al.</i> , 1993	NASC, Nottingham
<i>jar1-1</i>	Col-0	Staswick <i>et al.</i> , 1992; Staswick <i>et al.</i> , 2002	NASC, Nottingham
<i>lol1-1</i>	Ws-0	Epple <i>et al.</i> , 2003	J. Dangl, North Carolina
<i>NahG</i> <sup>1</sup>	Col-0	You <i>et al.</i> , 1991; Delaney <i>et al.</i> , 1994	NASC, Nottingham
<i>ndr1-1</i>	Col-0	Century <i>et al.</i> , 1995; Century <i>et al.</i> , 1997	NASC, Nottingham
<i>npr1-1</i>	Col-0	Cao <i>et al.</i> , 1994; Cao <i>et al.</i> , 1997	NASC, Nottingham
<i>pad1-1</i>	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1994	NASC, Nottingham
<i>pad2-1</i>	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1994	NASC, Nottingham
<i>pad3-1</i>	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1994; Zhou <i>et al.</i> , 1999	NASC, Nottingham
<i>pad4-1</i>	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1996; Jirage <i>et al.</i> , 1999	J. Parker, Köln
<i>pad4-5</i>	Ws-0	Feys <i>et al.</i> , 2001	J. Parker, Köln
<i>parp1-1</i>	Col-0	Babiychuk <i>et al.</i> , 1998 <sup>2</sup>	GABI-KAT, Köln
<i>parp2-1</i>	Col-0	Babiychuk <i>et al.</i> , 1998 <sup>2</sup>	GABI-KAT, Köln
<i>pen1-1</i>	Col-0	Collins <i>et al.</i> , 2003	H.Thordal-Christensen, Riso
<i>pen2-1</i>	Col-3	-	V.Lipka, Köln
<i>pen3-1</i>	Col-0	-	M.Stein, Stanford
<i>pmr4-1</i>	Col-0	Vogel & Somerville, 2000; Nishimura <i>et al.</i> , 2003	S. Somerville, Stanford
<i>rar1-10</i>	La-er	Muskett <i>et al.</i> , 2002	J. Parker, Köln
<i>sag101-1</i>	Col-0	He <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup>	J. Jones, Norwich
<i>sag101-2</i>	Col-0	He <i>et al.</i> , 2002 <sup>3</sup>	J. Jones, Norwich
<i>sgt1b-1</i>	La-er	Azevedo <i>et al.</i> , 2002; Austin <i>et al.</i> , 2002	J. Parker, Köln

<sup>1)</sup> Transgen aus *Pseudomonas syringae*

<sup>2)</sup> Referenz beschreibt Wildtyp-Gen; Mutante stammt aus Kollektion von *T-DNA*-Insertionslinien

<sup>3)</sup> Referenz beschreibt Wildtyp-Gen; Mutante stammt aus Kollektion von *dSpm*-Insertionslinien

### 2.1.4 Medien und Antibiotika

Transformierte Agrobacterium-Linien wurden in YEB-Medium kultiviert und durch Zusatz von Antibiotika selektioniert.

YEB-Medium:        5 g Fleischextrakt  
                          1 g Hefeextrakt  
                          5 g Bacto-Trypton  
                          5 g Saccharose  
                          1 l H<sub>2</sub>O

Zur Selektion:     Carbenicillin 50 µg/ml  
                          Rifampicin 25 µg/ml  
                          Kanamycin 25 µg/ml

### 2.1.5 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 2 (siehe Seite 38 ff.) aufgelistet.

### 2.1.6 Enzyme

Tabelle 3 (siehe Seite 40) liefert eine Übersicht über die verwendeten Enzyme und die zugehörigen Puffer.



**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotide**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
AC76	AGCACACAACCTCTGCCACG
AC77	GTGGAGACGAATGAGTTAC
ARLIM15.1-1	TGCTGCTTTATTTTGTGCGGATGTT
ARLIM15.1-2	GCCAGTTTTTTCCTGCACATCAATC
AthBIO2b-F	TGACCTCCTCTCCATGGAG
AthBIO2b-R	TTAACAGAAACCCAAAGCTTTC
CAPS-sgt1b-F	GCT GGA GAG GAA GCT TAT CA
CAPS-sgt1-R	TCA TAG CTG CAT CTC CAT CAA
ciw1-1	ACATTTTCTCAATCCTTACTC
ciw1-2	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT
ciw2-1	CCAAAAGTTAATTATACTGT
ciw2-2	CCGGGTTAATAATAAATGT
ciw3-1	GAAACTCAATGAAATCCACTT
ciw3-2	TGAACTTGTTGTGAGCTTTGA
ciw4-1	GTTTCATTAACCTTGCGTGTGT
ciw4-2	TACGGTCAGATTGAGTGATTC
ciw5-1	GGTTAAAAATTAGGGTTACGA
ciw5-2	AGATTTACGTGGAAGCAAT
ciw6-1	CTCGTAGTGCACCTTTCATCA
ciw6-2	CACATGGTTAGGGAAACAATA
ciw7-1	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT
ciw7-2	CCATGTTGATGATAAGCACAA
ciw8-1	TAGTGAAACCTTTCTCAGAT
ciw8-2	TTATGTTTTCTTCAATCAGTT
ciw9-1	CAGACGTATCAAATGACAAATG
ciw9-2	GACTACTGCTCAAACCTATTCCG
ciw10-1	CCACATTTTCTTCTTTCATA
ciw10-2	CAACATTTAGCAAATCAACTT
ciw11-1	CCCCGAGTTGAGGTATT
ciw11-2	GAAGAAATTCCTAAAGCATTC
ciw12-1	AGGTTTTATTGCTTTTCACA
ciw12-2	CTTTCAAAGCACATCACA
CTR1.2-1	CCACTTGTTTCTCTCTAG
CTR1.2-2	TATCAACAGAAACGCACCGAG
dCAPS-npr1-F	AAT CCG AGG GGA TAT ACG GTG CC
dCAPS-npr1-R	AAG AGG GAG GAA CAT CTC TAG GAA T
edrR-CAPS-DdeI	CGT TAT TCA AAC CTG ATT TAG TG
F18P14-F	ATTCCCGCAATTTATTTTGTTT
F18P14-R	GTTTGATGGCAGATTTGTTTTC
F21M12-1	TTACTTTTTGCCTCTTGTCATTG
F21M12-2	GGCTTTCTCGAAATCTGTCC
Fedr-dCAPS-BtsZ	AGG CTG AAA GGA CAG ATT CTG TAT A
F-pen1-1dCAPS	CAA CGA AAC ACT CTC TTC ATG TCA CGC
G4711-1	CCTGTGAAAAACGACGTGCAGTTTC
G4711-2	ACCAAATCTTCGTGGGGCTCAGCAG
GABI-TDNA-F	CAGTATAGTTAGTTAGAAATAATCC
GSL5-2-F	CAGTATAGTTAGTTAGAAATAATCC
GSL5-2-R	CGCAGATGCTGCATATAA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'3')</b>
JD1-pen2outerF	TTT GGA ACT GCT TCA TCT TCT TAT CAG G
JD2-pen2outerR	CCT GTA CAA GAA ATC AAT CAC AGA TCT TCA
JD3-rar1.10-F	CCA GTA CAA AAG GCT GTG AT
JD4-rar1.10-R	ACA GTG AAA GAA AAG GGT CA
JD9-PR1 -F	CAA CTT AGA AAA ATG AAT TTT ACT GGC TAT TCT CGA TTT TTA ATC GTC
JD10-PR1 -R	CAT TAG TAT GGC TTC TCG TTC ACA GAA TTC CCA
JD24-eds1PaulF	ACA CAA GGG TGA TGC GAG ACA
JD25-eds1PaulR	CGG AAT TCT GCA GTC AGG TAT CTG TTA TTT CAT CCA T
JD58-ACTIN1 -F	TGC GAC AAT GGA ACT GGA ATG
JD60-ACTIN1 -Rneu	CTG TCT CGA GTT CCT GCT CG
JD71-pen3MonicaF	TGA AAG CTT CTG CTG CTC AA
JD72-pen3MonicaR	TGA GGT GAA CGA TTT GTT GC
JD73-nga172-F	AGC TGC TTC CTT ATA GCG TCC
JD74-nga172-R	CCA TCC GAA TGC CAT TGT TC
JD75-MSA6-F	TTG GAG GTG CTC TTA GGT TC
JD76-MSA6-R	GGG CTT TTC ACA TAC GCT TTC
JD77-nga139 -F	AGG GTT TCG TTT CAC TAT CCA G
JD78-nga139-R	TGA GAG CTA CCA GAT CCG ATG
JD79-PAD4-F1	ATA GGA ACA AGC CAA GAA GA
JD80-PAD4-R1	CCA CAT GCC TTG AAG ATA AT
JD81-PAD4-F2	AGG AAG GTA ATC TAT AAT CAG TT
JD82-MZN14-F	CAA TAC ACT TTA TCC AGA TGC TG
JD83-MZN14-R	GGG ATT TGT TGA TTG AAA AAG GAC
JD84-dSpm11(eph1)	GGT GCA GCA AAA CCC ACA CTT TTA CTT C
JD85-BF52(eph1)	CAC GCG TCC GAA GAT CTT GGA GAT ACA TA
JD86-BF53(eph1)	ACT TCC GGG TGT TCA TAA ACT CGG TCA AG
nahG-F	ATG AAA AAC AAT AAA CTT GGC TTG C
nahG-R	GCG TCG ATG AAA TCC GCC CG
ndr1.1-F	CTC ACC TCT CTT TTC TTA TGG
ndr1.1-Fneu	GTT TCG TTT TGG GTC TCT TTT A
ndr1.1-R	CCA TTA GGC AAA ACC GCT CG
ndrJaneR	GGA CGG TTT CAA TTC TGT GAT AG
nga6-1	ATGGAGAAAGCTTACACTGATC
nga6-2	TGGATTTCTTCCTCTCTTCAC
nga111-1	TGTTTTTTTAGGACAAATGGCG
nga111-2	CTCCAGTTGGAAGCTAAAGGG
nga162-1	CTCTGTCACTCTTTTCCTCTGG
nga162-2	CATGCAATTTGCATCTGAGG
nga168-1	GAGGACATGTATAGGAGCCTCG
nga168-2	TCGTCTACTGCACTGCCG
nga280 -1	GGCTCCATAAAAAGTGCACC
nga280 -2	CTGATCTCACGGACAATAGTGC
nga1107 -1	CGACGAATCGACAGAATTAGG
nga1107 -2	GCGAAAAAACAAAAAATCCA
nga1126 -1	GCACAGTCCAAGTCACAACC
nga1126 -2	CGCTACGCTTTTCGGTAAAG
NME59	CAGCTACAAGAATTGTTTCG
NME60	GTGGTTGGATGAGGCGAG
NME63	CTAAGTCTCGATTGCGTC
NT204-1	TGGAAGCTCTAGAAACGATCG
NT204-2	ACCACCTAAACCGAGAATTGG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz (5'-3')</b>
padJaneF	GCG ATG CAT CAG AAG AG
padJaneR	TTA GCC CAA AAG CAA GTA TC
PARP1-F	AGGACGAAGCGCTGTGCATGAAG
PARP1-Rneu	AGGGAGAGAAGAGGAGAAGAAGAC
PARP2-F	ATGCCAACACTGGCGCTAATG
PARP2-R	GATTTGTTCCACATTGTAGACTA
PHYC.3-1	AAACTCGAGAGTTTTGTCTAGATC
PHYC.3-2	CTCAGAGAATTCCCAGAAAAATCT
R-pen1 -1dCAPS	CAT CAA TTT CTT CCT GAG AC
Sorb15-1	CATACTTGGGTCCCTTCGTC
Sorb15-2	GTCGCGAGTTCTCTCCAATC
Sorb27-1	TCAGGCTGCGATACTTTGTT
Sorb27-2	AACCTTGAAGCGGTTGAGAA
Sorb32-1	GGAGATATCATCCGCCCTCT
Sorb32-2	ATGAGCAAGTGCTTGTGTGC
Sorb34-1	GGAGAAGCGCTTTGTTTCTCAGA
Sorb34-2	TGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCG
Sorb36-1	AAAAATTGAGGCCAACTAGAAAAA
Sorb36-2	CGGTCCTGAACCTCATCAAA
Sorb39-1	CGAGATTGTCGACCAAGGTT
Sorb39-2	GGACTCAGTGTCAAGGAATCG
T6H20-F	CGGCTGAAACTTGGAAAGGGAC
T6H20-R	AGGAAGAACGTGTGATTGTG

**Tabelle 3: Verwendete Enzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Puffer</b>	<b>Bezugsquelle</b>
AvrII (XmaJI)	Y+/Tango	MBI Fermentas
BsmFI	NEB4	New England BioLabs
BspPI	Y+/Tango	MBI Fermentas
Bst1107I	O+	MBI Fermentas
EcoRI	EcoRIbuffer	New England BioLabs
HindIII	B	Roche Diagnostics
HphI	B+	MBI Fermentas
MluI	R+	MBI Fermentas
MnII	G+	MBI Fermentas
NheI	Y+/Tango	MBI Fermentas
RT Superscript II	5x First Strand Buffer	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	PCR reaction buffer, 10x concentrated	Roche Diagnostics

### 2.1.7 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden verwendet:

#### Agarosegel, 1%

1 g Agarose  
100 ml DNA-Gelelektrophoresepuffer  
2 µl Ethidiumbromidlösung, 1%

#### Anilinblau-Färbelösung

150 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
0.01 % Anilinblau  
in  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 9.5 mit KOH einstellen

#### Coomassieblau-Färbelösung

0.25 % Coomassie Blau in Ethanol

#### DAB-Färbelösung

1 mg/ml DAB in  $\text{H}_2\text{O}$   
pH 3.8 mit HCl einstellen

#### DAB-Entfärbelösung

1 Milchsäure  
1 Glycerol  
1 Ethanol

#### DAB-Neutralisationslösung

3%  $\text{KMnO}_4$   
2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$   
in  $\text{H}_2\text{O}$

DNA-Färbelösung (10x)

50 % Glycerin

0.1 % Xylencyanol

0.1 % Bromphenolblau

DNA-Gelelektrophoresepuffer (1x)

4.8 g/l TRIS

0.37 g/l EDTA

1.14 ml Essigsäure

ad 1 l H<sub>2</sub>O

DNA-Größenmarker (50 ng/μl)

50 μl 1Kb DNA-Größenmarker

100 μl DNA-Färbelösung (10x)

ad 1 ml H<sub>2</sub>O

Edwards-Puffer

200 mM TRIS-HCl pH 7.5

250 mM NaCl

25 mM EDTA

0.5% SDS

in H<sub>2</sub>O

Lactophenol-Stammlösung

100 ml Phenol

100 ml Milchsäure

200 ml Glycerin

100 ml H<sub>2</sub>O

vor Gebrauch 1:2 mit Ethanol verdünnen

PCR-Puffer

100 mM TRIS HCl pH 8.4

500 mM KCl

20 mM MgCl<sub>2</sub>

in H<sub>2</sub>O

Trypanblau-Färbelösung (Stammlösung)

250 mg/l Trypanblau in Lactophenol-Stammlösung

vor Gebrauch 1:1 mit Ethanol verdünnen

Trypanblau-Entfärbelösung:

2.5 g/ml Chloralhydrat in H<sub>2</sub>O

**2.1.8 Chemikalien**

Die verwendeten Chemikalien und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 4 (siehe Seite 44) aufgelistet.

**Tabelle 4: Verwendete Chemikalien und Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Spezifikation</b>	<b>Bezugsquelle</b>
1 Kb DNA-Größenmarker	1Kb DNA ladder, 1µg/µl	Invitrogen
Agarose	SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis	Cambrex Bio Science
Anilinblau	Aniline Blue	Sigma
BASTA	Basta	Hoechst Schering AgrEvo
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Merck
Carbenicillin	Carbenicillin Disodium	Duchefa
Chloralhydrat	Chloral Hydrate	Sigma
Chloroform	Chloroform, p.a.	Merck
Coomassie Blau	Coomassie® Brilliant Blue R250	Fluka
DAB	3,3'-Diamino-Benzidin, 99%	Sigma
dATP	dATP (2-deoxyadenosin-5'-triphosphat)	Roth
dCTP	dCTP (2-deoxycytidin-5'-triphosphat)	Roth
dGTP	dGTP (2-deoxyguanosin-5'-triphosphat)	Roth
DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO), getrocknet	Merck
DTT	Dithiothreitol, 0.1M DTT	Invitrogen
dTTP	dTTP (2-deoxythymidin-5'-triphosphat)	Roth
EDTA	Ethylendiamintetraacetat; Titriplex® III	Merck
Essigsäure	Essigsäure (eisessig), 100%, wasserfrei	Merck
Ethanol	Ethanol, 96%	Roth
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid-Lösung, 1% (10mg/ml) Stammlösung	Roth
Fleischextrakt	Fleischextrakt, trocken, "granuliert"	Merck
Glycerin	Glycerin, wasserfrei, reinst	Merck
HCl	Salzsäure 32%, p.a.	Merck
Hefeextrakt	Bacto™ Yeast Extract	Difco
Isopropanol	2-Propanol, p.a.	Merck
Kanamycin	Kanamycindisulfate, for biochemistry	Merck
KCl	Kaliumchlorid, p.a.	Merck
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat, p.a.	Merck
KMnO <sub>4</sub>	Kaliumpermanganat, p.a.	Merck
KOH	Kaliumhydroxid Plätzchen, p.a.	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.	Merck
Milchsäure	DL-Milchsäure, 90%	Roth
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat, p.a.	Merck
NaCl	Natriumchlorid, p.a.	Merck
NaOH	Natriumhydroxid Plätzchen, p.a.	Merck
Phenol	Phenol, 90%	Riedel-de-Haën
Rifampicin	Rifampicin	Duchefa
Saccharose	Saccharose, für die Mikrobiologie	Merck
SDS	SDS / Natriumlaurylsulfat	Roth
Silwet L-77	VAC-IN-STUFF (Silwet L-77)	Lehle Seeds
TRI-Reagenz	TRI® Reagent	Sigma
TRIS	UltraPure™ Tris Hydrochloride	Invitrogen
Trypanblau	Trypan Blue	Sigma
Trypton	Bacto™ Trypton	BD Beckton, Dickinson and Company
Xylencyanol	Xylene Cyanole FF	Sigma

### 2.1.9 Datenbanken und sonstige Internetressourcen

Folgende Datenbanken und Internetressourcen wurden genutzt:

Abfrage von genomischen und codierenden DNA-Sequenzen:

[http://mips.gsf.de/proj/thal/db/search/search\\_frame.html](http://mips.gsf.de/proj/thal/db/search/search_frame.html)

<http://www.arabidopsis.org/>

Sequenzanalyse und zum Sequenzvergleich:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

Suche nach Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen:

<http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>

Übersetzung von DNA- in Aminosäuresequenzen:

<http://www.expasy.org/tools/#translate>

Erwerb und Analyse von T-DNA-Insertionslinien:

<http://signal.salk.edu/>

Suche nach kurzen repetitiven Genomsequenzen :

<http://c3.biomath.mssm.edu/trf.intermediate.submit.html>

Abfrage von bereits publizierten Genexpressionsdaten (*microarrays*):

[http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=expr&search\\_action=new\\_search](http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?type=expr&search_action=new_search)

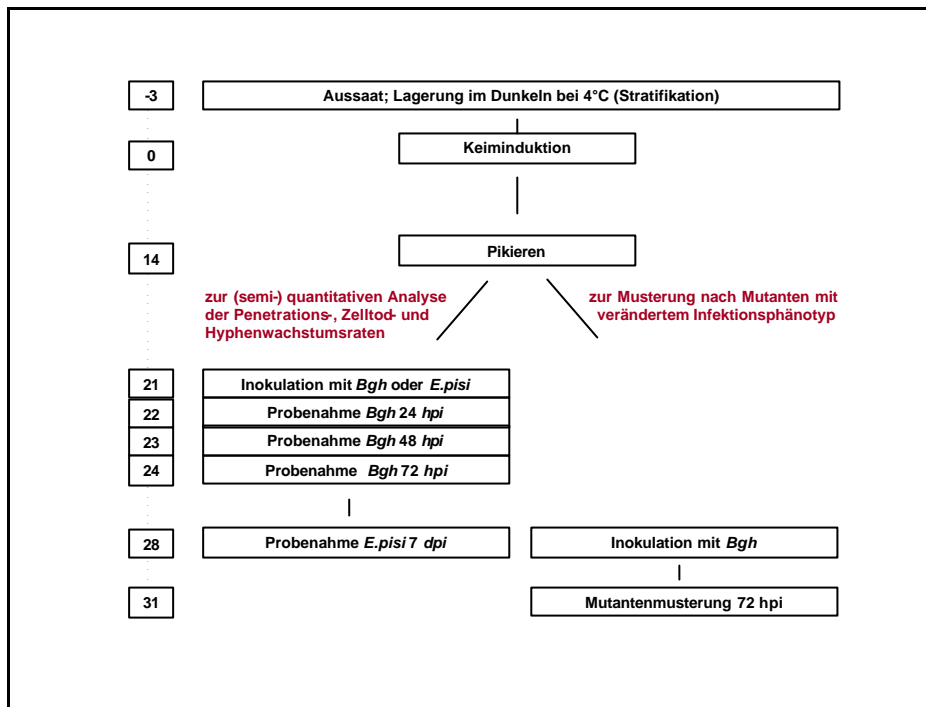


## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Anzucht der Versuchspflanzen und Kultivierung der Pathogene

Die in den Experimenten verwendeten *Arabidopsis*-Pflanzen wurden in einem Torfsubstratmix (Stender Substrate, Wesel-Scharmbeck) mit Zusatz von 0,001% Confidor WG70 (Bayer, Leverkusen) angezogen. Um eine möglichst gleichmäßige Keimung zu erreichen, wurden die Pflanzen nach der Aussaat zunächst 3 Tage im Dunkeln bei 4°C gelagert (Stratifikation). Die Keimung wurde anschließend durch Licht und Lagerung bei 20-23°C induziert (vgl. Tabelle 5). Zwei Wochen nach der Keiminduktion wurden die Pflanzen pikiert und vereinzelt (5 Pflanzen auf 9 x 9 cm), um gegenseitiges Überwachsen zu verhindern und eine möglichst ungehinderte Ausbreitung der Blattrosetten zu ermöglichen. Da dies mit Verletzungen der Pflanzenwurzeln einhergeht, erfolgte die Inokulation der Pflanzen erst eine Woche nach dem Pikieren. Der zeitliche Abstand ist erforderlich, um etwaige Strebeffekte auf die Ausprägung des Infektionsphänotyps zu minimieren. Der standardisierte Ablaufplan der Pflanzenaufzucht ist in Abbildung 7 (Seite 47) dargestellt.

Die verwendeten Pathogene wurden auf ihren jeweiligen Wirtspflanzen kultiviert. Dazu wurden Gerste- bzw. Erbsenpflanzen für 2 bzw. 5 Wochen in geschützter Atmosphäre aufgezogen und anschließend mit Gerste- bzw. Erbsenmehltau aus der vorangegangenen Population inokuliert. Nach einer weiteren Woche waren die Krankheitssymptome deutlich ausgebildet und das Blattmaterial der Wirtspflanzen mit sporulierenden Mehltaukolonien überzogen. Diese wurden dann zur Inokulation der *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet (vgl. 2.2.2).



### Abbildung 7: Ablaufplan der Pflanzenaufzucht zur Analyse der Infektionsphänotypen

Links: Zeitachse (Tage vor/nach Keiminduktion). Die Inokulation der Versuchspflanzen erfolgte je nach Experiment entweder 21 oder 28 Tage nach der Keiminduktion.

Die klimatischen Bedingungen in den jeweiligen Phytokammern sind in Tabelle 5 wiedergegeben. Die Lagerung der *Arabidopsis*-Pflanzen unter mehreren unterschiedlichen Bedingungen während der Aufzucht war aus logistischen Gründen unvermeidlich. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß geringfügige Wechsel der klimatischen Bedingungen keinen wesentlichen Einfluß auf die Ausprägung der Infektionsphänotypen haben.

**Tabelle 5: Aufzuchtbedingungen**

Pflanze	Stadium	Photoperiode	T <sub>Tag</sub> (°C)	T <sub>Nacht</sub> (°C)	rel.LF (%)
Arabidopsis	Stratifikation	0h Licht , 24 h Dunkel	4	4	variabel
Arabidopsis	Keimung / Woche 1	12 h Licht , 12 h Dunkel	23	20	60
Arabidopsis	vor Inokulation / Woche 2	12 h Licht , 12 h Dunkel	22	22	70
Arabidopsis	nach <i>Bgh</i> -Inokulation	16 h Licht , 8 h Dunkel	21	21	70
Arabidopsis	nach <i>E.pisi</i> -Inokulation	12 h Licht , 12 h Dunkel	22	22	70
Gerste	durchgehend	16 h Licht , 8 h Dunkel	21	21	70
Erbse	durchgehend	12 h Licht , 12 h Dunkel	22	20	70

### **2.2.2 Inokulationen**

Sämtliche Inokulationsexperimente wurden mit 3 Wochen alten *Arabidopsis*-Pflanzen sowie Wirtspflanzen 7 Tage nach Infektion durchgeführt. Um eine möglichst gleichmäßige Inokulationsdichte zu gewährleisten, wurden die Pflanzen unter einen speziell angefertigten Inokulationsturm platziert, über dessen oberer Öffnung die Sporen von den infizierten Wirtspflanzen abgeschüttelt wurden. Nach einigen Minuten haben sich die Sporen auf den darunter befindlichen Blattrosetten abgesetzt.

Durch Verwendung unterschiedlicher Mengen an infizierten Wirtspflanzen läßt sich somit auch die für den jeweiligen Versuch ideale Sporendichte einstellen. So eignet sich beispielsweise eine geringere Sporendichte für quantitative Auswertungen; eine semiquantitative Auswertung der Phänotypen erfordert hingegen eher höhere Inokulationsdichten.

### **2.2.3 Kreuzungen**

Zur Durchführung von Kreuzungen sind erfahrungsgemäß solche *Arabidopsis*-Pflanzen am besten als Mutterpflanze geeignet, die gerade die ersten Blütenstände ausgebildet haben. Von diesen Blütenständen wurden wiederum diejenigen Einzelblüten verwendet, welche kurz vor der Blütenöffnung stehen, bei denen jedoch noch keine weißen Kelchblätter (Petalen) von außen zu erkennen sind. Dies verhindert eine versehentliche Selbstbestäubung der Blüte im Verlauf der Kreuzung, da die Staubblätter (Stamina) in diesem Entwicklungsstadium noch nicht ausgereift sind.

Zunächst wurden unter dem Stereomikroskop mit einer fein ausgezogenen Pinzette sämtliche benachbarten Seitentriebe sowie sämtliche nicht zur Kreuzung verwendeten Einzelblüten entfernt. Bereits dabei wurde auf eine geringstmögliche Verletzung des Sprosses bzw. der Blütenstände geachtet. Unter möglichst geringfügiger Torsion der Blüte oder gar Verletzung der Fruchtblätter (Karpelle) wurden sodann die Petalen sowie die Stamina entfernt.

Die auf diese Weise emaskulierten Blüten wurden mit Pollen einer geöffneten Blüte (mit demzufolge reifen Pollensäcken) der jeweiligen Vaterlinie bestäubt. Möglichst unmittelbar nach der Bestäubung wurden die Blütenstände mit einer Plastikhaube umhüllt und für einige Tage bei gesättigter Luftfeuchtigkeit gelagert, um eine Austrocknung der ungeschützten bestäubten Fruchtblätter zu verhindern.

Nach jeder einzelnen Kreuzung wurde zudem die verwendete Pinzette gründlich mit Ethanol gereinigt und getrocknet, um eine unerwünschte Bestäubung der nachfolgenden Mutterblüte mit Pollen der vorangegangenen Vaterlinie zu vermeiden.

Der Erfolg der Kreuzungen wurde in den Folgegenerationen durch molekulare Marker überprüft (vgl. 2.2.8).

#### **2.2.4 Herstellung transgener Linien**

Bei der Herstellung transgener *Arabidopsis*-Linien durch *Agrobacterium*-vermittelten Gentransfer wird ein genetisches Vektorkonstrukt mithilfe von *Agrobacterium tumefaciens* in das pflanzliche Gewebe eingebracht (vgl. Shaw et al., 1983). Dazu muß zunächst der verwendete *Agrobacterium*-Stamm mit dem jeweiligen Konstrukt transformiert werden, welches in die Pflanze eingebracht werden soll. Ein bereits mit dem Vektor zum posttranskriptionellen *silencing* des *PAD4*-Gens transformierter *Agrobacterium*-Stamm wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Christina Neu (vgl. 2.1.3).

Zur genetischen Transformation von *Arabidopsis* wurden Pflanzen mit mehreren geöffneten Blütenständen verwendet. Dabei wird nach folgendem Protokoll verfahren (nach Clough and Bent, 1998; verändert):

- 3-5 ml YEB-Medium mit dem jeweiligen *Agrobacterium*-Stamm inokulieren. Zur Selektion enthält das Medium bereits die Antibiotika, für welche der Vektor Resistenzgene trägt (hier: Carbenicillin, Rifampicin und Kanamycin; vgl. 2.1.4).
- Starterkultur für 2-3 Tage bei 28°C auf einem Schüttler inkubieren.
- 200 ml YEB-Medium (+ Antibiotika) mit 3 ml der Starterkultur inokulieren.
- Kultur erneut für 2-3 Tage bei 28°C auf einem Schüttler inkubieren.
- Bakteriensuspension abzentrifugieren (4.800 rpm, 20 min, RT).
- Pellet zunächst in 50 ml 5% Saccharoselösung resuspendieren, danach in 400 ml 5% Saccharoselösung aufnehmen.
- 200 µl Silwet L-77 zugeben und gut vermischen.
- zu transformierende Arabidopsis-Pflanzen für ca. 30 Sekunden mit den Blütenständen in die Suspension getaucht. Dabei Rosettenblätter möglichst nicht benetzen.
- Pflanzen für 24 h unter einer Abdeckung waagrecht im Dunkeln lagern.

Nach einigen Wochen kann von den transformierten Pflanzen Saatgut geerntet werden. Da jedoch nur diejenigen Nachkommen das Vektorkonstrukt enthalten, welche aus einer transformierten Eizelle hervorgegangen sind, ist in der ersten Nachkommengeneration ( $T_1$ -Generation) ein erneuter Selektionsschritt notwendig. Dazu werden ca. 2 Wochen alte  $T_1$ -Pflanzen mit dem Herbizid BASTA® besprüht. Da der verwendete Vektor auch ein Resistenzgen gegen dieses Herbizid enthält, überleben nur Pflanzen, die das gewünschte Konstrukt auch tatsächlich enthalten. Bei Bedarf und zum Ausschluß von falschpositiven kann die Behandlung mit BASTA ggf. 1-2 Mal im Abstand von wenigen Tagen wiederholt werden.

### 2.2.5 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion aus Blattgewebe erfolgt nach folgendem Protokoll (nach Edwards et al., 1991)

- Blattgewebe (mindestens 10 x 10 mm Blattfläche) unter Stickstoff mörsern.
- das noch gefrorene gemörserte Blattmaterial auf Eis in einem 1.5 ml-Reaktionsgefäß mit 300 µl Edwards-Puffer (vgl. 2.1.7) versetzen.
- die Proben zur DNA-Extraktion für 10 min bei 65°C im Wasserbad inkubieren, anschließend nochmals 10min auf Eis lagern.
- 200 µl eisgekühltes Chloroform zusetzen und mischen.
- 5 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- 200 µl der oberen Phase in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß transferieren.
- mit 200 µl kaltem Isopropanol versetzen; dadurch wird die DNA gefällt.
- 5 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugieren.
- Überstand abgießen; Pellet an der Luft oder bei 37°C trocknen, bis sämtliches Isopropanol verdampft ist.
- Pellet in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendieren.

Die auf diese Weise gewonnenen DNA-Proben können für einige Wochen bzw. Monate bei 4°C bzw. -20°C gelagert werden. Trotz gelegentlich auftretender makroskopisch sichtbarer Verunreinigungen (z.B. durch Chlorophyll) ist die Qualität der DNA-Proben für die in dieser Arbeit angewandten weiterführenden Methoden (siehe ff.) ausreichend.

### 2.2.6 RNA-Extraktion

Aufgrund der erhöhten Instabilität von RNA sowie der Gefahr der Degradation durch RNasen sind bei der RNA-Extraktion besondere Vorsichtsmaßnahmen zu treffen (durchgängiges Arbeiten mit Handschuhen, Verwendung autoklavierter Gefäße, Durchführung der Arbeiten auf Eis, sofern nicht anders angegeben). Zur besseren Handhabung wurden RNA-Extraktionen daher mit einem Fertigreagenz durchgeführt

(TRI-Reagenz, vgl. 2.1.8). Die RNA-Extraktion aus Blattgewebe erfolgte nach dem entsprechenden Protokoll (nach Chomczynski and Sacchi, 1987; verändert):

- Blattmaterial unter Stickstoff fein mörsern und in ein 2 µl-Reaktionsgefäß transferieren
- 1 ml TRI-Reagenz zufügen
- 5 min bei RT inkubieren
- 200 µl Chloroform zufügen und kräftig mischen
- min bei RT inkubieren
- 15 min bei 13.000 rpm, 4°C abzentrifugieren
- obere Phase abnehmen und in ein neues 1.5 ml-Reaktionsgefäß überführen
- 500 µl Isopropanol hinzufügen und mischen
- 10 min bei RT inkubieren
- 10 min bei 13.000 rpm, 4°C abzentrifugieren
- Überstand abgießen und Pellet durch Zugabe von 1 ml eiskaltem 70% Ethanol waschen
- min bei 13.000 rpm, 4°C abzentrifugieren
- Pellet an der Luft bei RT trocknen
- Pellet in 30 µl RNase-freiem Wasser resuspendieren

Die auf diese Weise gewonnenen RNA-Proben können für einige Tage bzw. Wochen bei -20°C bzw. -80°C gelagert werden.

### **2.2.7 Amplifikation von Nukleinsäuremolekülen**

#### a) PCR:

Mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase (vgl.2.1.6) können in der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) spezifische DNA-Fragmente amplifiziert werden. Dazu müssen Enzym und DNA-Matrize in einem Reaktionsansatz mit einer Desoxynukleotidmischung (dNTPs) und spezifischen Oligonukleotiden, welche den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt begrenzen, versetzt werden (Sambrook *et al.*, 1989).

Zur Standard-PCR wurden folgender Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen gewählt:

2 µl DNA-Probe (Matrize)  
2 µl 10x PCR-Puffer (vgl. 2.1.7)  
je 2 µl Oligonukleotid (10 µM Stammlösung)  
0.5 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
0.25 µl Taq-DNA-Polymerase (4U/µl)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

- 1) 2 min 95°C (Denaturierung der doppelsträngigen DNA)
- 2) 1 min 95°C (Denaturierung der doppelsträngigen DNA)
- 3) 1 min 55°C<sup>1</sup> (Anlagerung der Oligonukleotide an die Einzelstränge)
- 4) 1 min 72°C (Synthese des komplementären Stranges)
- 5) 34x zurück zu Schritt 2 (insgesamt 35 Synthesezyklen)
- 6) 10 min 72°C

Dieser Ansatz wurde zur Amplifikation kleiner (< 200 bp) DNA-Fragmente zur Detektion ökotypspezifischer Polymorphismen (vgl. Tabelle 7, Seite 58) wie folgt modifiziert:

2 µl DNA-Probe (Matrize)  
2 µl 10x PCR-Puffer (vgl. 2.1.7)  
je 2 µl Oligonukleotid (10 µM Stammlösung)  
1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
1 µl Taq-DNA-Polymerase (4U/µl)  
ad 20 µl H<sub>2</sub>O

---

<sup>1</sup> Die ideale Anlagerungstemperatur variiert je nach Art der verwendeten Oligonukleotide. Sie sollte in jedem Fall einige Grade unterhalb der Dehybridisierungstemperatur der Oligonukleotide liegen, welche sich aus  $T_m = 2*(A+T) + 4*(C+G)$  ergibt.



- 1) 10 min 95°C
- 2) 30 sec 95°C
- 3) 30 sec 55°C
- 4) 30 sec 72°C
- 5) 39x zurück zu Schritt 2 (insgesamt 40 Syntheszyklen)
- 6) 10 min 72°C

#### b) RT-PCR

Mittels RT-PCR kann die Transkriptionsaktivität von Genen über die Erfassung von deren Transkript-(RNA-)akkumulation analysiert werden. Dazu werden die mRNA-Transkripte der zu analysierenden Gene zunächst im Verhältnis 1:1 in cDNA revers transkribiert (RT). Eine anschließende PCR-Reaktion amplifiziert das Signal. Die nach gelelektrophoretischer Auftrennung erhaltene Signalstärke ist somit proportional zur Menge an ursprünglich vorhandener mRNA.

Um die Intensitäten der erhaltenen Signale besser in Relation setzen zu können, wurde in jedem Ansatz sowohl die Expression des zu untersuchenden Gens als die einer internen konstitutiv exprimierten Kontrolle (*Actin-1*) untersucht.

Die Reverse Transkription erfolgte nach folgendem Ansatz:

- 7 µl RNA-Probe
- 1 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- je 1 µl komplementäres ("R"-) Oligonukleotid

5 min 65°C

1 min 4°C

4  $\mu$ l 5x RT-Puffer  
2  $\mu$ l DTT  
1  $\mu$ l RT Superscript II  
3  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

50 min 42°C  
10 min 70°C

Die anschließende PCR erfolgte ähnlich wie unter 2.2.7 a) beschrieben, jedoch in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l, unter Einsatz von 5  $\mu$ l cDNA, sowie unter Zusatz von 2.5  $\mu$ l DMSO, um die sich häufig ausbildenden Sekundärstrukturen der cDNA-Fragmente zu brechen, welche ansonsten eine Amplifikation der jeweiligen Fragmente erschweren oder verhindern würden.

### **2.2.8 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen**

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR- bzw. RT-PCR-Produkte zunächst mit DNA-Färbelösung (vgl. 2.1.7) versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 1.0% – 3.5% Agarosegelen in DNA-Elektrophoresepuffer (vgl. 2.1.7) bei max. 200V. Die höherprozentigen Agarosegele sind zur deutlichen Auftrennung kleiner (<500bp) DNA-Fragmente erforderlich.

Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die Nukleinsäurefragmente werden diese auf dem Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Größenstandard (1 KB DNA-Marker; vgl. 2.1.8) mit aufgetrennt.

### **2.2.9 Detektion von Mutationen, Transgenen und ökotypspezifischen Genomunterschieden**

Bei den in dieser Arbeit verwendeten mutanten Allelen handelt es sich entweder um Deletionen oder Punktmutationen. Zur Detektion von Deletionen mittels PCR werden Oligonukleotide ausgewählt, die in deletions-flankierenden Regionen hybridisieren. Die PCR-Produkte von Wildtyp- und mutatem Allel unterscheiden sich demnach in ihrer Länge (SSLP-Marker; short sequence length polymorphism). Zur Überprüfung kann ggf. eine zweite Oligonukleotidkombination gewählt werden, bei der eines der Oligonukleotide im deletierten Bereich liegt. In diesem Fall liefert nur das Wildtyp-Allel ein Signal.

Punktmutationen können detektiert werden, indem ein Fragment, welches die Punktmutation enthält, spezifisch amplifiziert und anschließend durch ein Restriktionsenzym gespalten wird, welches nur entweder die Wildtyp- oder die mutante Sequenz erkennt (CAPS-marker; cleaved amplified polymorphic stretch). Ist ein solches Enzym nicht erhältlich, kann oftmals durch Einfügen einer zweiten Punktmutation durch entsprechendes *design* der Oligonukleotide eine passende Restriktionsschnittstelle generiert werden (*d*CAPS-Marker; Michaels and Amasino, 1998; Neff et al., 1998).

Zur Identifizierung transgener Linien werden Fragmente des Transgens spezifisch amplifiziert. Ist der Insertionsort des Transgens bekannt, läßt sich durch eine Kontroll-PCR mit Oligonukleotiden, die in flankierenden Regionen liegen, zwischen homozygoten und heterozygoten Linien unterscheiden. Ist der Insertionsort nicht bekannt, so kann eine Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten Linien nur durch Analyse der Folgegeneration erfolgen.

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-, SSLP- und (*d*-)CAPS-Marker zur Detektion von mutanten Allelen und Transgenen wurden weitestgehend unter Zuhilfenahme der in 2.1.9. aufgeführten Datenbanken und Internetressourcen selbst entwickelt, und sind in Tabelle 6 (Seite 57) zusammengefaßt.

**Tabelle 6: PCR-, SSLP- und CAPS-marker zur Detektion von mutanten Allelen und Transgenen**

Allel / Transgen	PCR-Amplifikation Oligonukleotidpaar	T <sub>m</sub> (°C)	Restriktionsverdau		Größe des Produkts (bp)	
			Enzym	Bedingungen	WT-Allel	Mutantes Allel
<i>edr1-1</i>	Fedr, edrR	55	Bst1107I	37°C, 2h	268 + 23	291
<i>eds1-2</i>	JD24, JD25	60	-	-	~1400 + ~1200	~500
<i>NahG</i>	nahG-F, nahG-R	65	-	-	-	350
<i>ndr1-1</i>	ndr1.1-Fneu, ndrJaneR	64	-	-	1931	696 <sup>1</sup>
	ndr1.1-F, ndr1.1-R	60	-	-	350	-
<i>npr1-1</i>	dCAPS-npr1-F, dCAPS-npr1-R	60	MnII	37°C, ÜN	236 + 32	268
<i>pad4-1</i>	padJaneF, padJaneR	52	BsmFI	65°C, 2h	281 + 110	391
<i>parp1-1</i> <sup>2</sup>	PARP1-F, PARP1-Rneu	55	-	-	~600	-
	GABI-TDNA-F, PARP1-Rneu	55	-	-	-	~600
<i>parp2-1</i> <sup>2</sup>	PARP2-F, PARP2-R	55	-	-	~600	-
	GABI-TDNA-F, PARP2-R	55	-	-	-	~600
<i>pen1-1</i>	F-pen1-1dCAPS, R-pen1-1dCAPS	62	MluI	37°C, 2h	250	226 + 24
<i>pen2-1</i>	JD1, JD2	60	BspPI	55°C, 2h	179 + 169	348
<i>pen3-1</i>	JD71, JD72	50	HphI	37°C, 2h	438 + 102	540
<i>pmr4-1</i>	GSL5-2-F, GSL5-2-R	50	NheI	37°C, 2h	1362	1110 + 252
<i>rar1-10</i>	JD3, JD4	56	-	-	195	190
<i>sag101-1</i> <sup>2</sup>	JD84, JD85	60	-	-	-	~1300
	JD85, JD86	60	-	-	~1770	-
<i>sag101-2</i> <sup>2</sup>	JD84, JD85	60	-	-	-	~700
	JD85, JD86	60	-	-	~1770	-
<i>sgt1b-1</i>	CAPS-sgt1b-F, CAPS-sgt1-R	58	AvrII	37°C, 2h	~600	~400 + ~200

<sup>1)</sup> Heterozygote Linien liefern nur Signal für mutantes Allel, daher ergänzende PCR notwendig

<sup>2)</sup> Beide PCRs notwendig zur eindeutigen Unterscheidung zwischen homozygot mutant, heterozygot und homozygot Wildtyp

Zur Kartierung von Mutationen im Genom werden ebenfalls SSLP- und CAPS-marker verwendet; diese unterscheiden jedoch nicht zwischen Wildtyp- und mutanten Allelen, sondern zwischen ökotypspezifischen Genomunterschieden. Da die Position dieser Genomunterschiede bekannt ist, lassen sich über die Häufigkeit der Cosegregation eines bestimmten ökotypspezifischen Markers mit dem Phänotyp der zu kartierenden Mutation Rückschlüsse über die Lage der Mutation im Genom ziehen (vgl. Lukowitz et al., 2000).

Die zur Mutationskartierung verwendeten SSLP- und CAPS-marker sind in Tabelle 7 (Seite 58) zusammengefaßt.

**Tabelle 7: SSLP- und CAPS-marker zur Detektion von ökotypspezifischen Polymorphismen**

Chr.	Marker	Position (Mb)	Oligonukleotidpaar	T <sub>m</sub> (°C)	Restr.Enzym	Produktgröße (bp)	
						Col	La-er
I	F21M12	3.2	F21M12-1, F21M12-2	52	-	200	~160
I	ciw 12	9.6	ciw12-1, ciw12-2	55	-	128	~115
I	ciw 1	18.0	ciw1-1, ciw1-2	55	-	159	~135
I	nga 280	20.5	nga280-1, nga280-2	52	-	105	85
I	nga 111	27.4	nga111-1, nga111-2	58	-	128	162
II	ciw 2	1.2	ciw2-1, ciw2-2	58	-	105	90
II	ciw 3	6.4	ciw3-1, ciw3-2	55	-	230	~200
II	nga 1126	11.6	nga1126-1, nga1126-2	52	-	191	199
II	nga 168	16.3	nga168-1, nga168-2	55	-	151	135
II	AthBIO2b	18.0	AthBIO2b-F, AthBIO2b-R	53	-	141	209
III	nga 172	0.8	JD73, JD74	53	-	162	136
III	nga 162	4.6	nga162-1, nga162-2	55	-	107	89
III	NT204	5.6	NT204-1, NT204-2	53	-	~200	~190
III	MSA6	7.4	JD75, JD76	53	-	175	225
III	ARLIM15.1	8.1	ARLIM15.1-1, ARLIM15.1-2	53	EcoRI	~450	~500
III	G4711	9.0	G4711-1, G4711-2	53	HindIII	~1500	~1000
III	ciw 11	9.8	ciw11-1, ciw11-2	58	-	179	~230
III	MZN14	10.7	JD82, JD83	53	-	150	143
III	T6H20	16.0	T6H20-F, T6H20-R	53	-	273	293
III	Sorbo 34 <sup>1)</sup>	18.2	Sorb34-1, Sorb34-2	55	-	118	~110
III	Sorbo 36 <sup>1)</sup>	18.6	Sorb36-1, Sorb36-2	55	-	117	~125
III	ciw 4	18.9	ciw4-1, ciw4-2	58	-	190	~215
III	Sorbo 15 <sup>1)</sup>	19.4	Sorb15-1, Sorb15-2	55	-	131	~120
III	Sorbo 39 <sup>1)</sup>	20.4	Sorb39-1, Sorb39-2	55	-	106	~90
III	Sorbo 27 <sup>1)</sup>	21.3	Sorb27-1, Sorb27-2	55	-	149	~130
III	nga 6	23.0	nga6-1, nga6-2	58	-	143	123
III	Sorbo 32 <sup>1)</sup>	23.3	Sorb32-1, Sorb32-2	55	-	137	~125
IV	ciw 5	0.7	ciw5-1, ciw5-2	55	-	164	~144
IV	ciw 6	7.9	ciw6-1, ciw6-2	58	-	162	~148
IV	ciw 7	11.5	ciw7-1, ciw7-2	52	-	130	~123
IV	nga 1107	18.1	nga1107-1, nga1107-2	55	-	150	~140
V	CTR1	1.0	CTR1.2-1, CTR1.2-2	55	-	159	143
V	ciw 8	7.5	ciw8-1, ciw8-2	58	-	100	~135
V	PHYC	14.0	PHYC.3-1, PHYC.3-2	55	-	207	222
V	ciw 9	16.8	ciw9-1, ciw9-2	55	-	165	~145
V	ciw 10	24.5	ciw10-1, ciw10-2	55	-	140	~130

<sup>1)</sup> freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Göllner

### **2.2.10 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten zur Überprüfung auf vorhandene Mutationen wurde vom Automatischen DNA-Isolierung und Sequenzierungs-Service des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung (<http://adis.mpiz-koeln.mpg.de/>) durchgeführt. Sequenzvergleiche und Analyse der Sequenzdaten erfolgten mithilfe der unter 2.1.9 aufgeführten Datenbanken und Internetressourcen.

### **2.2.11 Präparation von Blattmaterial zur mikroskopischen Analyse**

Zur mikroskopischen Analyse einzelner Interaktionsstellen wurden pflanzliche und pilzliche Zellstrukturen mit unterschiedlichen Methoden angefärbt (vgl. 2.2.12 – 2.2.16). In den meisten Fällen, und sofern nicht anders erwähnt, wurden dazu die Blattproben zunächst für mindestens 48 Stunden in Lactophenol (vgl. 2.1.7) inkubiert. Dabei werden die zu untersuchenden Proben zugleich zum gewünschten Zeitpunkt fixiert, als auch von Chlorophyll entfärbt, welches ansonsten bei UV-Mikroskopie eine rote Störfluoreszenz liefern würde.

Bei der Probennahme wurde zudem darauf geachtet, daß immer Blätter gleichen Alters abgeerntet wurden, um vergleichbare Ergebnisse zu gewährleisten. Die erfahrungsgemäß stark penetrationsanfälligen Primärblätter wurden gänzlich von der Analyse ausgenommen.

Im Anschluß an alle durchgeführten Färbungen wurden die Blattproben in 50% Glycerin zur Mikroskopie präpariert.

### **2.2.12 Coomassie Blau-Färbung**

Durch Coomassie Blau-Färbung können Pilzstrukturen auf der Blattoberfläche (primäres und sekundäres Hyphenwachstum) sichtbar gemacht werden. Dazu wurde das Blattmaterial zunächst wie unter 2.2.11 beschrieben fixiert, anschließend durch kurzes (ca. 1 Minute) Schwenken in Coomassieblau-Färbelösung (vgl. 2.1.7) gefärbt, und

mit Wasser geklärt. Hierbei ist zu beachten, daß die Qualität der Färbung stark abnimmt, je mehr Lactophenol mit den zu färbenden Blättern in die Coomassieblau-Färbelösung gerät. Bei größeren zu färbenden Blattmengen sollten diese daher zuvor in 50% Ethanol gewaschen werden.

Die Coomassie Blau-Färbung wurde zudem auch im Anschluß an die Anilinblau-Färbung (siehe 2.2.13) sowie die DAB-Färbung (siehe 2.1.16) angewandt.

### **2.2.13 Anilinblau-Färbung**

Mit der Anilinblau-Färbemethode wurden Callosedepositionen, wie sie beispielsweise unterhalb pilzlicher Penetrationsversuche auftreten, angefärbt (nach Adam and Somerville, 1996; verändert). Dazu wurden die Blattproben zunächst in Lactophenol fixiert und entfärbt (vgl. 2.2.11), anschließend vorsichtig zunächst in 50% Ethanol, danach in Wasser gespült. Die Anfärbung der Callosedepositionen erfolgte durch Inkubation in Anilinblau-Färbelösung (vgl. 2.1.7) über Nacht.

### **2.2.14 Trypanblau-Färbung**

Mit dieser Färbemethode werden sowohl selektiv tote Epidermiszellen als auch – teilweise sogar invasiv wachsende- Pilzstrukturen angefärbt (nach Peterhansel et al., 1997). Die frisch geernteten Blattproben wurden dazu in Trypanblau-Färbelösung (vgl. 2.1.7) aufgekocht, wodurch sie gleichzeitig fixiert, von Chlorophyll entfärbt und selektiv gefärbt wurden. Nach Erkalten wurden die Proben für mindestens zwei Tage in Trypanblau-Entfärbelösung (vgl. 2.1.7) geklärt.

### **2.2.15 Kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung**

Eine Kombination aus Trypanblau- und Anilinblau-Färbung erwies sich als erforderlich und geeignet, um Penetrationserfolg und Zelltodraten in Mutantenlinien mit reduzierter Callosedeposition an Infektionsstellen erfassen zu können. Hierbei liefern sowohl (schwache) Callosedeposition als auch (in diesem Fall ebenfalls abgeschwächte)

Trypanblau-Färbung einen Hinweis auf den Status der jeweiligen Interaktion. Zudem wird durch das ausbleibende Aufkochen der Proben (vgl. 2.2.14) auch verhindert, daß große Zahlen an Pilzsporen von den Blattoberflächen abfallen, was die mikroskopische Auswertung einzelner Infektionstellen nach Trypanblaufärbung häufig erschwert.

Zur kombinierten Trypanblau-Anilinblau-Färbung wurden zunächst frisch geerntete Blätter für 2 Tage in frisch angesetzter Trypanblau-Färbelösung inkubiert, anschließend in 50% Ethanol, danach in Wasser gewaschen, schließlich für 2 Tage in Trypanblau-Entfärbelösung geklärt, und zuletzt nochmals für 2 Tage in Anilinblau-Färbelösung inkubiert (alle Lösungen siehe 2.1.7). Eine zusätzliche Färbung der Pilzstrukturen ist nicht erforderlich, da diese auch hier bereits durch Trypanblau angefärbt werden.

### **2.2.16 DAB-Färbung**

Mit dieser Färbemethode werden selektiv Zellen angefärbt, die reaktive Sauerstoffspezies bilden („oxidativer Ausbruch“ nach Pathogenbefall; vgl. (Lamb and Dixon, 1997) . Hierzu erwies sich eine Probennahme 48 Stunden nach Inokulation als am besten geeignet. Zur Färbung wurden die frisch geernteten Blätter mit den Blattstielen (Petiolen) in frisch zubereitete DAB-Färbelösung getaucht, lichtgeschützt abgedeckt, und in möglichst feuchter Atmosphäre über Nacht gelagert, um Austrocknung der Proben zu vermeiden. Anschließend werden die Proben durch 5-minütiges Aufkochen in DAB-Entfärbelösung geklärt (nach Thordal-Christensen et al., 1997).

Da es sich bei der DAB-Färbelösung um eine hochgiftige Verbindung handelt, müssen neben den üblichen Schutzmaßnahmen im Anschluß an die Färbung auch sämtliche kontaminierten Materialien sowie restliche Färbelösung durch Zusatz einer gleichen Menge DAB-Neutralisationslösung entgiftet bzw. entsorgt werden (alle Lösungen siehe 2.1.7).



### **2.2.17 Mikroskopische Analyse**

Die Analyse der Infektionsphänotypen erfolgte in jedem Fall mikroskopisch; je nach Fragestellung entweder semiquantitativ oder quantitativ durch statistische Erfassung einzelner Infektionsstellen.

#### a) quantitative Analyse der Infektionsphänotypen

Sofern nicht anders erwähnt, erfolgte die quantitative Analyse der Infektionsphänotypen in den *Bgh*-Inokulationsexperimenten jeweils 24, 48 und 72 Stunden nach der Infektion (*hpi*, *hours post inoculation*). Dabei wurden jeweils einzelne Interaktionsstellen mikroskopisch auf Penetrationserfolg und Zelltod hin untersucht. Als Marker hierfür wurde, sofern nicht anders erwähnt, Callosedeposition um Penetrationsstellen und tote Zellen sowie Zelltodautofluoreszenz herangezogen.

Die Zelltod- und Anilinblaufluoreszenz wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht, für alle anderen Färbungen genügte Durchlicht. Bei kombinierten Färbungen erwies sich eine Kombination von Durchlicht und UV-Licht als am besten geeignet.

Die einzelnen Interaktionsstellen wurden folgenden Kategorien zugeordnet:

- fehlgeschlagener Penetrationsversuch
- Penetration ohne Zelltod
- Penetration mit Zelltod

Desweiteren wurde das sekundäre Hyphenwachstum in folgenden Kategorien erfasst:

- kein sekundäres Hyphenwachstum
- (wenig verzweigtes) sekundäres Hyphenwachstum
- mehrfach (>2) verzweigtes sekundäres Hyphenwachstum

Ausgewertet wurden pro Zeitpunkt und Genotyp jeweils 100 Interaktionsseiten auf mindestens je 4 verschiedenen Blättern von 2 bis 5 verschiedenen Pflanzen. Blattrandbereiche, Trichomzellen sowie Stomata wurden dabei aufgrund ihrer erfahrungsgemäß erhöhten bzw. reduzierten Anfälligkeit nicht erfaßt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Mittelwertbildung, Angabe der Standardabweichung und Anwendung des Student's t-test, wobei ein p-Wert  $\leq 0.05$  als Maß für einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen zwei Zahlenreihen angenommen wird (vgl. Bailey, 1992).

#### b) semiquantitative Analyse der Infektionsphänotypen

Die Intensität des sekundären Hyphenwachstums wurde im Falle der Inokulationsexperimente mit *E. pisi* sowie in einigen Bgh-Inokulationsexperimenten 7 Tage nach Inokulation (7 dpi, *days post inoculation*) erfaßt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da die Pathogene auch auf ihren jeweiligen Wirtspflanzen 5-7 Tage benötigen, um makroskopisch sichtbare Symptome auszubilden bzw zu sporulieren. Zu diesem Zeitpunkt konnte das Ausmaß des sekundären Hyphenwachstums jedoch nur semiquantitativ erfaßt werden, da eine Einzelauswertung von Interaktionsstellen aufgrund der teilweise massiven Kolonieausbreitungen unmöglich war.

Dazu wurden die Pilzstrukturen angefärbt wie unter 2.2.12 beschrieben. Die Mikroskopie erfolgte unter Weißlicht und ohne Phasenkontrast, da dies bei mehrfach übereinander geschichteten Pilzhyphen zu undeutlichen Bildaufzeichnungen führt.

#### c) Parameter bei der Musterung nach *pen2*-Enhancer-/Suppressormutanten

Der wichtigste Parameter bei der Musterung nach *pen2*-Enhancer-/Suppressormutanten war die Zelltodautofluoreszenz ganzer Blätter unter UV-Licht nach Bgh-Inokulation (vgl. Abbildung 6, Seite 32). Die Pflanzen wurden dazu 72 hpi mit einem Stereomikroskop mit GFP1-Filter unter UV Licht gesichtet.

Individuen mit deutlich erhöhter oder erniedrigter Zellto autofluoreszenz wurden in der Folgegeneration erneut auf ihren Phänotyp hin überprüft, um Falschpositive auszuschließen. Durch eine kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung (vgl. 2.2.15) konnten zudem Linien ausgeschlossen werden, bei denen die reduzierte Zellto autofluoreszenz nicht durch eine reduzierte Anfälligkeit, sondern lediglich durch reduzierte Callosedeposition an Infektionsstellen zustande kam.

Als weiterer Parameter diente die Intensität des sekundären Hyphenwachstums von Gerstemehltau 72 hpi. Dazu wurden jeweils Blätter einzelner Pflanzen wie unter 2.2.12 beschrieben präpariert und mikroskopisch semiquantitativ analysiert. Auch hier erfolgte eine Überprüfung der Phänotypen auffälliger Linien in der Folgegeneration.

Sämtliche verbleibenden Linien beider Ansätze wurden zudem noch auf ihre Anfälligkeit gegenüber *E.pisi* getestet. Hierbei diente das sekundäre Hyphenwachstum 7 dpi als Parameter. Auch hier erfolgte die semiquantitative Analyse nach Coomassieblau-Färbung (vgl. 2.2.12).

### **3. ERGEBNISSE – TEIL 1:**

#### **ANALYSE DER GENETISCHEN INTERAKTION VON *PEN2* MIT BEKANNTEN RESISTENZ- UND ABWEHRKOMPONENTEN**

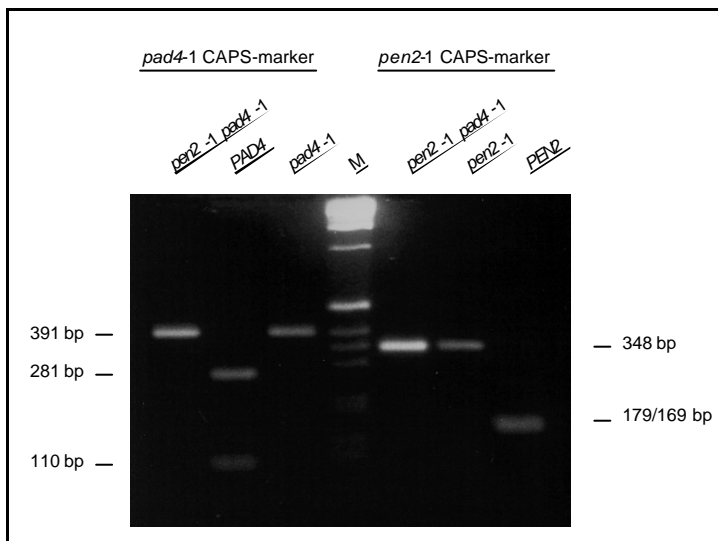
Durch Mutationen in einem der *PEN*-Loci (*PEN1*, *PEN2*, *PEN3* Collins et al., 2003) werden *Arabidopsis*pflanzen deutlich anfälliger für Penetrationen von *Bgh* und *E. pisi*. Trotz der erhöhten Frequenz an invasivem Wachstum des Pilzes sind *pen*-mutante Linien jedoch nicht voll anfällig gegenüber diesen Nichtwirtspathogenen, da eine weitere Entwicklung des Pilzes durch eine HR-ähnliche Zelltodreaktion der attackierten Zellen verhindert wird. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob Komponenten, die bereits in anderen Resistenz- und Abwehrsignalwegen beschrieben wurden, an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion in *pen2*-Mutanten beteiligt sind. Dazu wurden entsprechende Doppel- und Tripelmutantenlinien erzeugt und auf ihren Infektionsphänotyp nach Pathogeninokulation hin untersucht.

#### **3.1 Isolierung von Transformanden, Doppel- und Tripelmutanten**

Zur Analyse der genetischen Interaktion von *PEN2* mit bekannten Resistenz- und Abwehrkomponenten wurde die *pen2-1*-Mutante mit einer Reihe weiterer Mutanten gekreuzt wie unter 2.2.3 beschrieben. Der Fokus dieser Arbeit lag dabei hauptsächlich auf Mutanten der salicylsäureabhängigen Signalkaskade. In einer Kollaboration mit Dr. Lore Westphal und Jörn Landtag, IPB Halle, wurden jedoch auch Mutantenkombinationen aus *pen2-1* und Mutanten des Ethylen- und Jasmonatsignalwegs isoliert und untersucht (siehe Tabelle 8 Seite 67).

Desweiteren wurden einige ausgewählte Linien auch mit den ebenfalls erhöht penetrationsanfälligen Mutantelinien *pen1-1* und *pen3-1* (vgl. 1.3) gekreuzt. Die Isolierung und Analyse der *pen3-1*-Doppelmutantelinien wurde in einer Kollaboration mit Monica Stein und Dr. Shauna Somerville, Stanford, durchgeführt.

Die Isolierung der Doppelmutantelinien in der F<sub>2</sub>-Generation erfolgte mittels der in Tabelle 6 (Seite 57) aufgeführten molekularen Marker. Beispielhaft ist dies in Abbildung 8 für die Doppelmutante *pen2-1 pad4-1* gezeigt.



### Abbildung 8: Isolierung von Doppelmutanten durch Genotypisierung mittels molekularer Marker

Durch PCR-Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments und anschließenden Restriktionsverdau mit *BsmFI* kann eindeutig zwischen *PAD4* und *pad4-1* (linke Hälfte) sowie *PEN2* und *pen2-1* (rechte Hälfte) unterschieden werden. Mittels beider Marker kann die Doppelmutante *pen2-1 pad4-1* eindeutig genotypisiert werden. Zur Generierung und Funktionsweise der molekularen Marker: vgl. 2.2.9 (Seite 56 ff.). M: DNA-Größenmarker.

**Tabelle 8: Isolierte und analysierte transgene Linien, Doppel- und Tripelmutanten**

<b>Im Rahmen dieser Arbeit</b>	<b>In Kooperation mit L. Westphal, J. Landtag; IPB Halle</b>	<b>In Kooperation mit M. Stein, S.Somerville; Stanford</b>
<i>pen1-1 pen2-1</i>	<i>pen21 ein21</i>	<i>pen2-1 pen3-1</i>
<i>pen1-1 eds1-2</i>	<i>pen21 ein4-1</i>	<i>pen3-1 eds1</i>
<i>pen1-1 NahG</i>	<i>pen21 etr1-1</i>	<i>pen3-1 jar1-1</i>
<i>pen1-1 pad4-1</i>	<i>pen21 pad1-1</i>	<i>pen3-1 NahG</i>
	<i>pen21 pad2-1</i>	<i>pen3-1 pad4-1</i>
<i>pen2-1 eds1-2</i>	<i>pen21 pad3-1</i>	<i>pen3-1 sid2-1</i>
<i>pen2-1 NahG</i>		
<i>pen2-1 ndr1-1</i>		
<i>pen2-1 npr1-1</i>		
<i>pen2-1 pad4-1</i>		
<i>pen2-1 rar1-10</i>		
<i>pen2-1 sag101-1</i>		
<i>pen2-1 sag101-2</i>		
<i>pen2-1 sgt1b-1</i>		
<i>pen2-1 pad4-1 sag101-1</i>		
<i>pen2-1 pad4-1 sag101-2</i>		
<i>pen2-1 rar1-10 sgt1b-1</i>		
<i>rar1-10 sgt1b-1</i> <sup>1</sup>		
<i>pad4-1 sag101-1</i> <sup>1</sup>		
<i>pad4-1 sag101-2</i> <sup>1</sup>		
<i>pen2-1 NahGPAD4i</i>		

<sup>1)</sup> freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Parker, Köln

Die isolierten Doppelmutantenlinien wurden im Folgenden auf ihren Infektionsphänotyp nach Inokulation mit *Bgh* und *E. pisi* hin untersucht. Dabei wurde verfahren wie unter 2.2.1 ff. beschrieben.

### **3.2 Kombinierte Mutationen in *PEN1* und *PEN2* führen zu additiver Penetrationsanfälligkeit gegenüber dem Gerstemehltau**

Zur Untersuchung der genetischen Interaktionen von *PEN1* und *PEN2* wurde zunächst die Doppelmutantenlinie *pen1-1 pen2-1* mit den jeweiligen Einzelmutanten und einer Wildtypkontrolle mit *Bgh*-Sporen inokuliert und wie unter 2.2.11 ff. beschrieben analysiert. Bei diesen, wie auch bei den im Folgenden erwähnten Einzelmutanten handelt es sich jeweils um *knockout*-Allele, d.h. die Funktionalität des Wildtypproteins ist beispielsweise durch mutationsbedingte Einfügung eines vorzeitigen Transkriptionsterminationssignals, durch Insertion eines T-DNA-Fragmentes oder durch Deletion eines größeren Genbereichs vollständig aufgehoben.

Zur quantitativen Analyse der Infektionsphänotypen wurden die Häufigkeit von *Bgh*-Penetrationen sowie von penetrations-assoziierten Zelltodsymptomen im Zeitverlauf (24, 48 und 72 *hpi*) erfaßt. Die quantitative Auswertung (vgl. Abbildung 9, Seite 70) zeigt zunächst die deutlich erhöhte Penetrationsanfälligkeit der *pen2-1*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp, die bereits 24 *hpi* deutlich zu erkennen ist. Zwischen 48 und 72 *hpi* ist zudem kein signifikantes Fortschreiten der Infektion mehr zu beobachten. Die Analyse des Infektionszeitverlaufs endete daher nach 72 Stunden. In einem Kontrollexperiment wurden jedoch Proben 7 Tage nach Inokulation mit den Proben 72 *hpi* verglichen. Auch dabei konnte keine signifikante Veränderung des Infektionsphänotyps beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

In Wiederholungsexperimenten stellte sich heraus, daß geringfügige Änderungen in den Anzuchtbedingungen von Versuchspflanzen oder Pathogen zu einer beachtlichen Variabilität der Penetrationsanfälligkeit der Wildtyp-Pflanzen führen kann. So kann der Penetrationserfolg von *Bgh*-Sporen auf Wildtyp-Blattepidermis 72 *hpi* selbst auf jeweils gleichalten, physiologisch vergleichbaren Blättern zwischen 5 und 35 % schwanken. In allen beobachteten Fällen lag jedoch die Penetrationsanfälligkeit der *pen2-1*-Linie immer um 25 bis 35 % über der des Wildtyps.

Gleiches gilt im übrigen auch für alle anderen getesteten Linien (s.ff.). Die dargestellten Ergebnisse beziehen sich jeweils auf ein repräsentatives Experiment, welches jedoch mehrfach unter Erlangung vergleichbarer Daten wiederholt werden konnte.

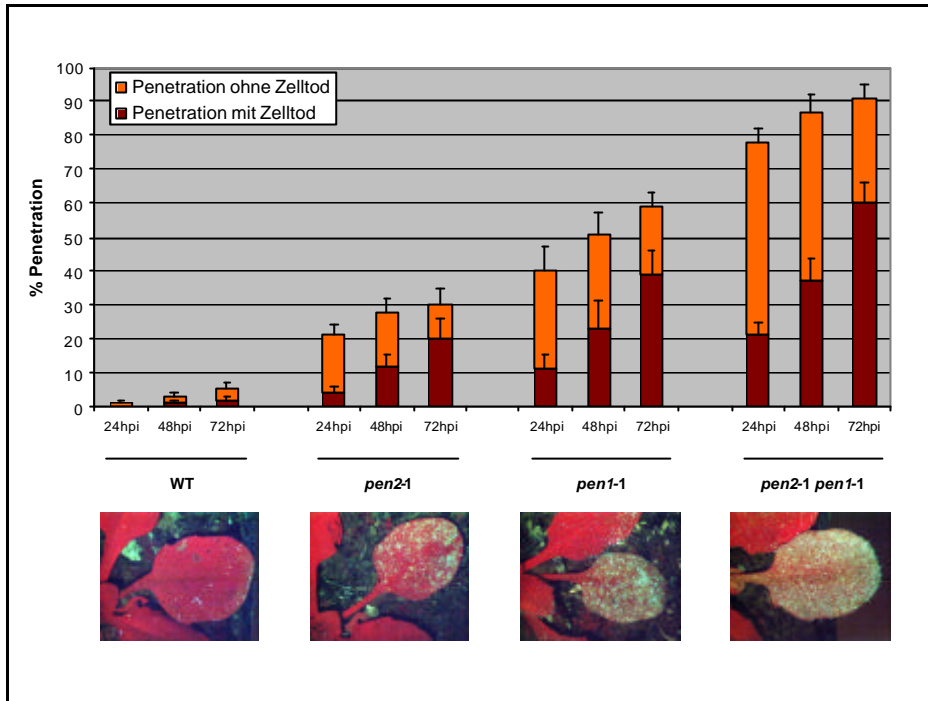
Ein weiterer Vergleich der Daten zeigt zudem, daß die *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit der *pen1-1*-Mutante im Vergleich zu *pen2-1* nochmals um ca. 30 % erhöht ist. Die relativen Anteile der Interaktionsstellen mit Zelltodsymptomen bleiben jedoch unverändert, d.h. eine veränderte Zelltodkinetik läßt sich nicht beobachten.

Bei der phänotypischen Analyse der Doppelmutante läßt sich ein weiterer Anstieg der *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit erkennen. Dabei ist auffällig, daß die relativen Abstände zwischen den Einzelmutanten und dem Wildtyp in der Doppelmutante fast exakt additiv ausgeprägt sind. Gleiches gilt zudem für den relativen Anteil der Interaktionsstellen mit Zelltodsymptomen. Auch in der Doppelmutante läßt sich somit keine Veränderung der Zelltodkinetik beobachten.

*pen1-1* und *pen2-1* haben also einen kombinatorischen (additiven) Effekt auf die *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit. Dies zeigt sich auch in der Intensität der Zelltodautofluoreszenz gleichmäßig inokulierter Arabidopsisblätter 72 *hpi* (vgl. Abbildung 9, unten). Beide Komponenten liefern also einen wesentlichen, nach



formalgenetischer Interpretation voneinander unabhängigen Beitrag zur Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh*.



**Abbildung 9: Kombiniertes Effekt von *pen1-1* und *pen2-1* auf die Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh***

**Oben:** Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien im Zeitverlauf (24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (*hpi*)).

Ausgewertet wurden jeweils mindestens 500 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie und Zeitpunkt. Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz und zellumschließende Callosedeposition (Anilinblau-Färbung). Die Unterschiede in den Penetrationsanfälligkeiten der verschiedenen Linien ist jeweils statistisch signifikant ( $p = 0.05$ ).

**Unten:** Aufnahme von *Bgh*-inokulierten Blättern 72 *hpi* unter UV-Licht zur Detektion der Zelltodautofluoreszenz.

### **3.3 *NDR1*, Salicylsäure und *NPR1* sind nicht wesentlich an der Ausprägung des *pen2*-Phänotyps beteiligt**

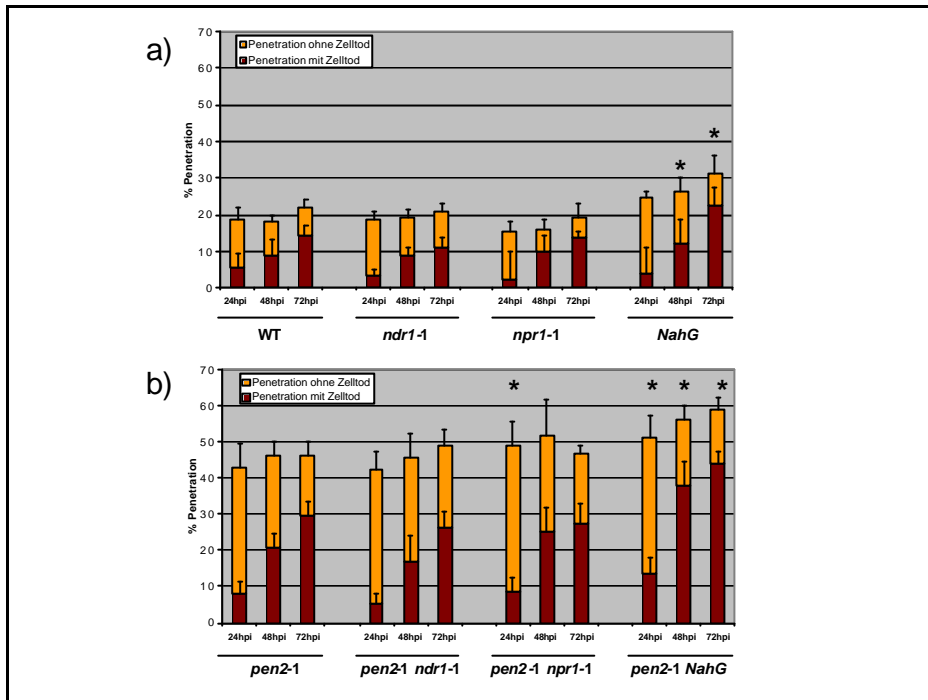
Bei der Analyse der ersten isolierten Kombinationen aus *pen2* und weiteren Resistenz-Mutanten konnten keine bis nur geringfügige Veränderungen des Infektionsphänotyps festgestellt werden. Die phänotypische Analyse der *ndr1-1*- und *npr1-1*-Mutantenlinien läßt zunächst keine Veränderung der *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit im Vergleich zum Wildtyp erkennen (vgl. Abbildung 10a, Seite 72).

Im Falle von *ndr1-1* bestätigt sich dies auch in Kombination mit der *pen2-1*-Mutation. Die entsprechende Doppelmutante ist nach *Bgh*-Inokulation phänotypisch nahezu identisch mit der *pen2-1*-Mutante (vgl. Abbildung 10b). *NDR1* scheint also nicht an der Ausprägung des *pen2*-Phänotyps beteiligt zu sein bzw. die Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh* nicht signifikant zu beeinflussen.

Im Falle der Doppelmutante *pen2-1 npr1-1* läßt sich hingegen – im Unterschied zur Einzelmutante – 24 *hpi* eine signifikant erhöhte Penetrationsanfälligkeit feststellen. Dies ist jedoch im weiteren Zeitverlauf nicht mehr zu beobachten, was allerdings durch die zu den späteren Zeitpunkten (48 und 72 *hpi*) stellenweise deutlich verstärkte Callosedeposition an Penetrationsstellen bedingt sein könnte (Daten nicht gezeigt). Durch diese könnten zunächst erfolgreiche Penetrationsereignisse maskiert worden sein, was die für die Doppelmutante *pen2-1 npr1-1* 48 *hpi* und 72 *hpi* erhaltenen Daten möglicherweise verfälscht.

Die *pen2-1 NahG*-Linien zeigen hingegen zu allen erfaßten Zeitpunkten eine signifikant erhöhte *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit. Dies läßt sich auch 48 und 72 *hpi* bereits in der *NahG*-Linie (im Wildtyp-Hintergrund) erkennen. In beiden Fällen sind die Penetrationsraten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle um ca. 10-15% erhöht.

Insgesamt sprechen also die Analyseergebnisse der Doppelmutante *pen2-1 npr1-1* 24 hpi sowie der transgenen *NahG*-Linien für einen zwar geringfügigen, jedoch signifikanten Beitrag von Salicylsäure und *NPR1* zur Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh*.



**Abbildung 10: Effekte von *ndr1-1*, *npr1-1* und *NahG* auf die Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh***

Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien im Zeitverlauf (24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi)).

**a)** Mutanten im Wildtyp-(WT) Hintergrund.

**b)** Mutanten in Kombination mit der *pen2-1*-Mutante.

Ausgewertet wurden jeweils mindestens 500 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie und Zeitpunkt. Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz und zellumschließende Callosedeposition (Anilinblau-Färbung). \* zeigt einen statistisch signifikanten ( $p = 0.05$ ) Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

### **3.4 Mutationen im *RAR1-SGT1b*-Komplex verstärken den *pen2*-Phänotyp nur geringfügig**

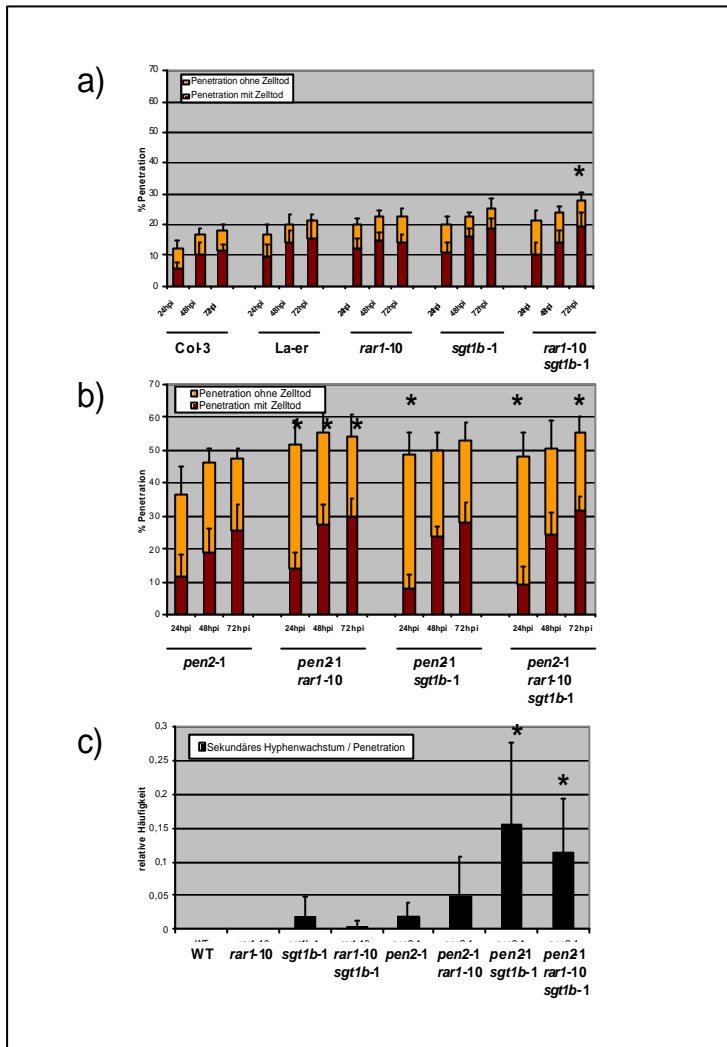
Bei der Analyse des Infektionsphänotyps der Mutantenkombinationen von *pen2-1* mit *rar1-10* und *sgt1b-1* ist zunächst zu beachten, daß diese Linien aus Kreuzungen unterschiedlicher Ökotypen hervorgehen, wodurch es zu ökotypbedingter phänotypischer Varianz zwischen den resultierenden Linien kommen kann.

Tatsächlich weist La-er im Vergleich zu Col-3 (*gl1*) eine leicht (jedoch nicht signifikant) erhöhte *Bgh*-Penetrationsanfälligkeit auf (siehe Abbildung 11 a, Seite 75). Um dadurch bedingte ökotypspezifische Effekte in den entsprechenden Mutantenlinien zu relativieren, wurden 10 unabhängige Linien der Tripelmutante *pen2-1 rar1-10 sgt1b-1* sowie je 5 unabhängige Linien der jeweiligen Doppelmutantenkombinationen isoliert und getestet. In Abbildung 11 sind die Ergebnisse aller getesteten Linien zusammengefaßt.

Da zwischen den jeweiligen Einzellinien nur eine geringe phänotypische Varianz beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt), kann angenommen werden, daß ökotypspezifische Unterschiede zwischen Columbia und Landsberg erecta keinen wesentlichen Effekt auf die Ausbildung des *Bgh*-Infektionsphänotyps haben. Bei den im weiteren Verlauf analysierten Kombinationen von Doppelmutanten unterschiedlicher Ökotypen (siehe 3.5) wurden daher nur jeweils drei unabhängige Linien isoliert und getestet.

Beim weiteren Vergleich der Daten (Abbildung 11 b) fällt auf, daß alle Doppel- und Tripelmutantenkombinationen im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle eine erhöhte Penetrationsanfälligkeit aufweisen. Diese ist zwar nicht zu allen erfaßten Zeitpunkten signifikant, jedoch durchgehend als Tendenz zu beobachten, und läßt daher auf einen geringfügigen Beitrag des *RAR1-SGT1b*-Komplexes auf die Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh* schließen.

Der Vergleich der Raten an sekundärem Hyphenwachstum (Abbildung 11 c) zeigt zudem eine geringfügig, jedoch signifikant erhöhte Anfälligkeit der Linien *pen2-1 sgt1b-1* und *pen2-1 rar1-10-sgt1b-1*. Dies geht einher mit einer veränderten Zelltodkinetik in den entsprechenden Linien. Die Zelltodraten 24 hpi sind in diesen Linien jeweils leicht verringert im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 11 b). Dies legt die Vermutung nahe, daß das Pilzwachstum durch verzögertes Einsetzen der Zelltodreaktion begünstigt ist. Da der beobachtete Effekt nur in Kombinationen von *pen2-1* und *sgt1b-1* auftritt, nicht aber in der Doppelmutante *pen2-1 rar1-10*, kann eine spezifische Beteiligung von *SGT1b* an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion angenommen werden.



**Abbildung 11: Effekte von Mutationen im RAR1-SGT1b-Komplex auf die Anfälligkeit gegenüber Bgh**

**a) und b)** Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien im Zeitverlauf (24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (*hpi*)). Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz und zellumschließende Callose-deposition (Anilinblau-Färbung).

**a)** Mutanten im Wildtyp (WT) Hintergrund.

**b)** Mutanten in Kombination mit der *pen2-1*-Mutante.

**c)** relative Häufigkeit des sekundären Hyphenwachstums 72 Stunden nach Inokulation mit *Bgh*-Sporen.

Ausgewertet wurden jeweils mindestens 400 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie und Zeitpunkt. Zur Erzeugung einiger Doppel- und Tripelmutanten wurden Elternlinien unterschiedlicher Ökotypen (Col-0 bzw La-er) verwendet. Zur Relativierung möglicher ökotypspezifischer Effekte wurden in diesen Fällen jeweils 5 bis 10 unabhängige Linien isoliert und analysiert. Die gezeigten Daten repräsentieren jeweils die zusammengefaßten Werte aller getesteten Linien.

\* zeigt einen statistisch signifikanten ( $p = 0.05$ ) Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

### **3.5 Kombinierte Mutationen in *PEN2* und dem *EDS1-PAD4*-Komplex erlauben vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum des Gerstemehltaus**

Durch Mutationen im *EDS1-PAD4*-Komplex wird die Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh* nicht erhöht (siehe Abbildung 12 a, Seite 78). Jedoch läßt sich in diesen Linien eine verringerte Callosedeposition an Infektionsstellen und um tote Zellen feststellen (Daten nicht gezeigt). Um Zelltodsymptome deutlich sichtbar zu machen, mußten die Blattproben in diesem Fall mittels der kombinierten Trypanblau-Anilinblau-Färbemethode (vgl. 2.2.15) angefärbt werden. Dadurch können sowohl Callosedeposition als auch Trypanblaufärbung zur mikroskopischen Evaluierung einzelner Interaktionsstellen herangezogen werden.

In Vorversuchen mit Wildtyp- und *pen2-1*-Linien wurde die Effizienz dieser Methode mit der ansonsten angewandten Anilinblau-Färbemethode (vgl. 2.2.13) verglichen. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 12 wiedergegebenen Daten sind somit trotz teilweise unterschiedlicher Färbemethoden mit den Ergebnissen der übrigen Experimente vergleichbar.

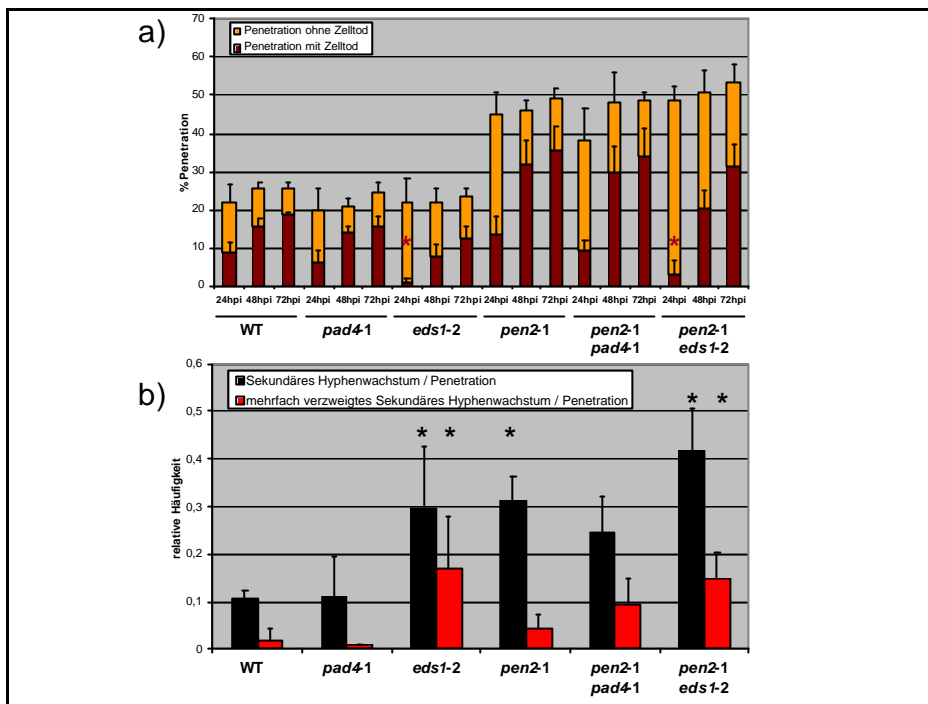
Ein auffälliges Merkmal der *pad4-1* sowie der *eds1-2*-Mutantenlinien ist die bisweilen deutlich verstärkte Ausbreitung bzw. Verzweigung einzelner Pilzkolonien (vgl. Abbildung 12 b). Die Rate an sekundärem Hyphenwachstum ist in *pen2-1* bereits signifikant erhöht. Mehrfach verzweigtes sekundäres Hyphenwachstum bleibt in dieser Linie jedoch noch selten.

Sowohl in der *eds1-2*-Einzelmutante als auch in der Kombination *pen2-1 eds1-2* sind hingegen sowohl die Raten an sekundärem Hyphenwachstum als auch an mehrfach verzweigtem sekundärem Hyphenwachstum signifikant erhöht. Wie bereits im Falle der *pen2-1 sgt1b-1*-Mutantenkombinationen als Tendenz beobachtet (vgl. 3.4), geht dies auch hier mit einem verzögerten Einsetzen der Zelltodreaktion einher (vgl. Abbildung 12a). Die Zelltodfrequenz ist in den entsprechenden Linien 24 *hpi* deutlich verringert.

Die Doppelmutante *pen2-1 pad4-1* erlaubt ebenfalls gelegentliches mehrfach verzweigtes sekundäres Hyphenwachstum. Allerdings handelt es sich hier lediglich um eine statistisch nicht signifikante Tendenz, die zudem auch nicht mit einer signifikanten Veränderung der Zelltodrate 24 *hpi* einhergeht.

Mutationen im *EDS1-PAD4*-Komplex führen also sowohl zu einer Veränderung der Zelltodsymptomatik (Reduktion der Callosedeposition an Infektionsstellen), als auch zu einem vermehrten Pilzwachstum auf der Blattoberfläche, was im Falle der *eds1*-Mutation mit einem verlangsamten Einsetzen der Zelltodreaktion korreliert ist.





**Abbildung 12: Effekte von Mutationen im *EDS1-PAD4*-Komplex auf die Anfälligkeit gegenüber *Bgh***

**a)** Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien im Zeitverlauf (24, 48 und 72 Stunden nach Inokulation (hpi)). Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz, zellumschließende Callosedeposition (Anilinblaufärbung) und Trypanblaufärbung.

**b)** relative Häufigkeit des sekundären Hyphenwachstums und des mehrfach (>2) verzweigten sekundären Hyphenwachstums 72 Stunden nach Inokulation mit *Bgh*-Sporen.

Ausgewertet wurden jeweils mindestens 400 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie und Zeitpunkt. Zur Erzeugung der Doppelmutante *pen2-1 eds1-2* wurden Elternlinien unterschiedlicher Ökotypen (Col-0 bzw La-er) verwendet. Zur Relativierung möglicher ökotypspezifischer Effekte wurden in diesem Fall 3 unabhängige Linien isoliert und analysiert. Die gezeigten Daten repräsentieren jeweils die zusammengefaßten Werte aller getesteten Linien. \* zeigt einen statistisch signifikanten ( $p = 0.05$ ) Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

### **3.6 Die Nichtwirtsresistenz gegenüber dem Erbsenmehltau ist in den Doppelmutanten *pen2 eds1* und *pen2 pad4* vollständig gebrochen**

Da sich in einigen der untersuchten Mutantenkombinationen bereits erste Effekte der Mutationen auf den *Bgh*-Infektionsphänotyp zeigten, wurden die entsprechenden Linien zusätzlich auf ihren Phänotyp nach Inokulation mit *E. pisi* hin untersucht. Dieser Mehлтаupilz ist im Vergleich zu *Bgh* deutlich näher verwandt mit *Arabidopsis*-virulenten Mehлтаupilzen (Saenz und Taylor, 1999, und V. Lipka, unveröffentlicht), und zeigt zudem auch bereits auf Wildtyppflanzen an einzelnen Interaktionsstellen bereits ein mehrfach verzweigtes sekundäres Hyphenwachstum (siehe Abbildung 13, Seite 81). Die Ausbildung eines dichten Myzels oder gar Sporulation von *E. pisi* konnte auf Wildtyppflanzen jedoch nicht beobachtet werden.

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 13 zeigen zunächst, daß die Ausbreitung der Pilzhypen auf der Blattoberfläche 7 Tage nach Inokulation (*days post inoculation, dpi*) auf *pen2-1* im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht ist. Ein noch massiveres Ausmaß erreicht das sekundäre Hyphenwachstum auf den Mutantenlinien *pad4-1* und *eds1-2*. Auf den Doppelmutantenkombinationen *pen2-1 pad4-1* und *pen2-1 eds1-2* kumulieren diese Effekte, was zur Ausbildung eines dichten Myzels sowie gelegentlicher Sporulation von *E. pisi* führt. Dies ist jeweils auf der Doppelmutante *pen2-1 eds1-2* in stärkerem Maße zu beobachten, wohingegen Sporulation auf *pen2-1 pad4-1* ein eher seltenes Ereignis bleibt.

In beiden Fällen ist die Sporulation makroskopisch nicht, und das dichte Myzel nur schwach zu erkennen. Die Identität des Erbsenmehltaus konnte zudem durch Reinfektionsversuche bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Dies schließt also aus, daß es sich bei den beobachteten Phänotypen um Kontaminationen mit *Arabidopsis*mehltau handelt.

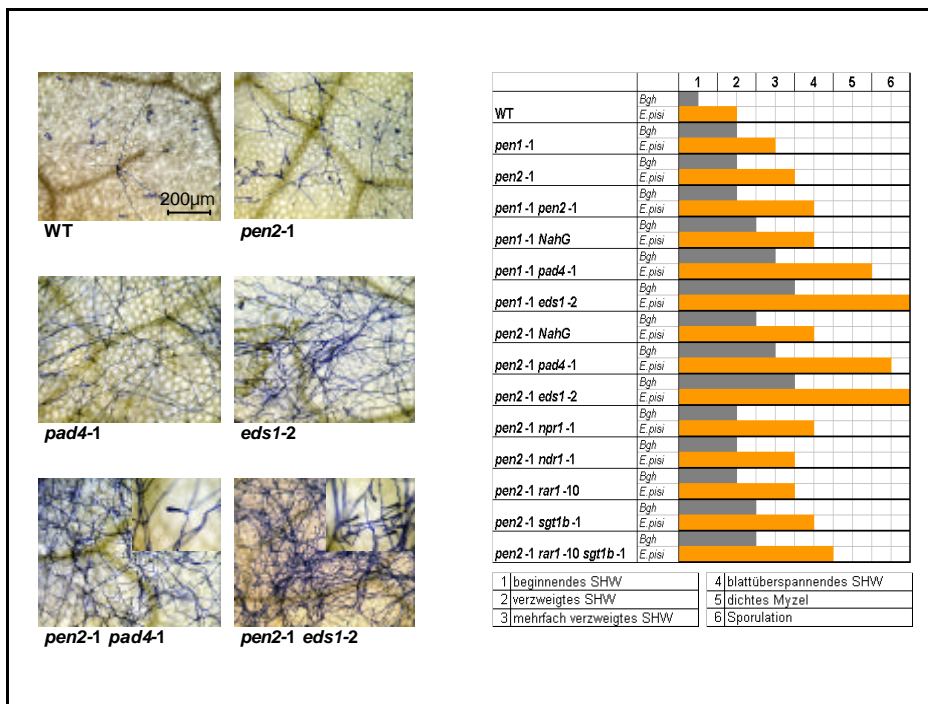
In biochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das *PAD4*-Protein in *eds1*-Mutanten nicht mehr nachweisbar ist, wohingegen die *EDS1*-Proteinmenge in *pad4*-Mutanten nur vergleichsweise geringfügig reduziert ist (Feys et al., 2005). Entsprechend läßt sich auch in der Doppelmutante *pad4-5 eds1-2* kein kumulativer Effekt beider Mutationen beobachten; der Phänotyp dieser Linie gleicht dem bei *eds1-2* beobachteten (vgl. Abbildung 16, Seite 86).

Insgesamt deuten die hier dargestellten Ergebnisse also darauf hin, daß die Eliminierung von *PEN2* und *PAD4* ausreichend ist, um die Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi* vollständig zu brechen.

Der Vergleich der Anfälligkeiten gegenüber *Bgh* und *E. pisi* (Abbildung 13, rechts) zeigt zum einen, daß die Intensität des *Bgh*-Infektionsphänotyps in allen getesteten Linien deutlich hinter der des *E. pisi*-Infektionsphänotyps zurückbleibt. Zum anderen wird auch deutlich, daß die bei *pen2-1 pad4-1* und *pen2-1 eds1-2* beobachtete vollständige Brechung der Nichtwirtsresistenz bei keiner der übrigen hier dargestellten *pen2*-Doppelmutantenlinien beobachtet werden konnte. Selbst diejenigen Linien, die ebenfalls einen leicht veränderten *Bgh*-Infektionsphänotyp aufwiesen, bleiben in ihrer Anfälligkeit gegenüber *E. pisi* deutlich hinter *pen2-1 pad4-1* und *pen2-1 eds1-2* zurück. Dies unterstreicht die möglicherweise zentrale Bedeutung des *EDS1-PAD4*-Proteinkomplexes bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi*.

Lediglich die analogen Linien *pen1-1 pad4-1* und *pen1-1 eds1-2* zeigen ebenfalls eine derart erhöhte Anfälligkeit. Hier ist jedoch darauf hinzuweisen, daß bei *pen1-1 pad4-1* trotz vergleichbarer Intensität des sekundären Hyphenwachstums keine Sporulation von *E. pisi* beobachtet werden konnte. Gleiches gilt auch für die entsprechenden Doppelmutantenkombinationen mit *pen3-1* (Daten nicht gezeigt).

In den übrigen in Tabelle 8 (Seite 67) aufgelisteten Phytoalexin-defizienten, Jasmonat- und Ethylensignalweg-Mutantenlinien, sowie in den ebenfalls getesteten Einzelmutanten *jar1*, *eds5* und *eds16* konnten ebenfalls nur vergleichbar schwache bis keine Veränderungen der Infektionsphänotypen nach *Bgh*- oder *E. pisi*-Inokulation beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 13: Effekte von Mutationen im EDS1-PAD4-Komplex auf die Anfälligkeit gegenüber *E. pisi* / Vergleich der Infektionsphänotypen nach Inokulation mit *Bgh* und *E. pisi***

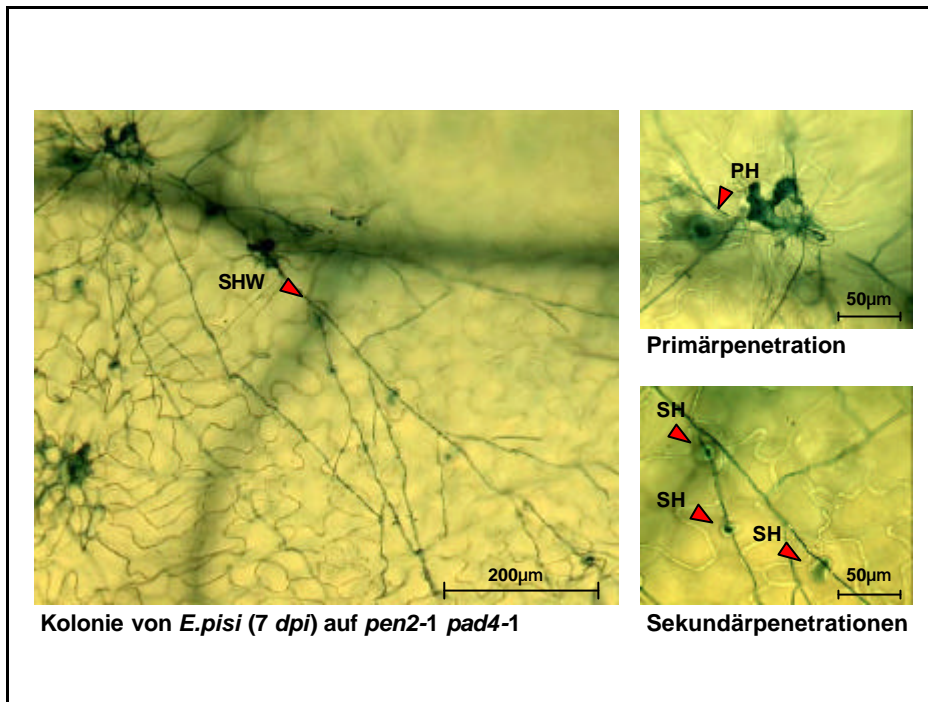
**linke Hälfte:** Mikroskopische Aufnahmen von Blattpräparaten 7 Tage nach Inokulation mit *E. pisi*. Färbung der Pilzstrukturen durch Coomassie-Blau. Vergrößerte Bildausschnitte: Sporangienträger von *E. pisi*.

**rechte Hälfte:** Vergleich der Infektionsphänotypen verschiedener Mutantenlinien jeweils 7 Tage nach Inokulation mit *Bgh* bzw. *E. pisi*.

Eine nähere Betrachtung von *E. pisi*-Kolonien auf *pen2-1 eds1-2* bzw. *pen2-1 pad4-1* (siehe Abbildung 14, Seite 83) liefert eine mögliche Erklärung für die massive Ausbreitung der Pilzhyphen auf diesen Linien. Die Abbildung zeigt, daß die posthaustorielle Zelltodreaktion (sichtbar gemacht durch Anilinblau-Färbung, vgl. 2.2.14) zwar noch stattfindet, Zelltodsymptome sind 7 dpi jedoch nur an der Stelle der Primärpenetration und der ersten Sekundärpenetrationen zu erkennen. Entlang der weiteren Ausbreitung der Pilzhyphen sind hingegen bereits zahlreiche Sekundärpenetrationsstellen sichtbar, an denen noch keine Zelltodsymptome zu erkennen sind. Ob die Zelltodreaktion dort stark verzögert einsetzt, oder gar ganz ausbleibt, wurde jedoch nicht erfaßt.

Das massive sekundäre Hyphenwachstum und die Sporulation von *E. pisi* auf diesen Linien sind also möglicherweise auf die Kombination aus verzögertem Einsetzen der Zelltodreaktion und erleichterter Sekundärpenetration aufgrund der *pen2*-Mutation zurückzuführen.

Diese Ergebnisse werden auch teilweise von den Befunden nach *Bgh*-Inokulation gestützt (vgl. 3.5); jedoch konnte ein verzögertes Einsetzen der Zelltodreaktion dort nur für die *eds1*-, nicht jedoch für die *pad4*-Mutantenkombinationen nachgewiesen werden.



**Abbildung 14: Ausbreitung einer Kolonie von *E. pisi* auf der Doppelmutante *pen2-1 pad4-1***

Mikroskopische Aufnahme von Blattpräparaten 7 Tage nach Inokulation mit *E. pisi*. Färbung der Pilzstrukturen und toter Zellen durch Trypanblau. Vergrößerte Bildausschnitte: Penetration der Primärhyphs und Sekundärpenetrationen entlang der Sekundärhyphen. SHW: Sekundärhyphen; PH: Primärhaustorium, SH: Sekundärhaustorium.

**3.7 Die Nichtwirtsresistenz gegenüber Erbsen- und Gerstemehltau ist in *pad4 sag101*-Doppelmutanten vollständig gebrochen**

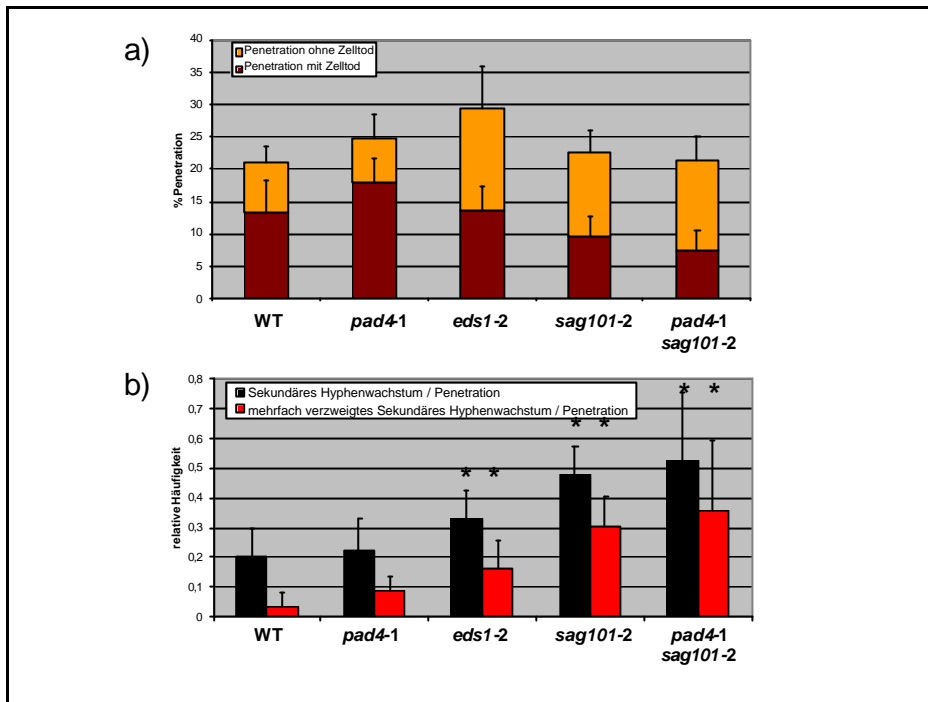
Die vorangegangenen Experimente legen bereits eine zentrale Rolle von *EDS1* und *PAD4* bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi* nahe. Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob auch *SAG101*, einem Homolog und *in vivo* Interaktor von *PAD4* und *EDS1* (He and Gan, 2002; Feys et al., 2005) eine Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz zukommt.

Dazu wurden zunächst die zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Mutantenkombinationen mit *Bgh* inokuliert und 72 hpi auf ihren Infektionsphänotyp hin untersucht.

Dabei zeigte sich zunächst, daß sich die Penetrationsraten der einzelnen Mutanten nicht signifikant unterscheiden (siehe Abbildung 15 a, Seite 85). Die Anteile der Interaktionsstellen mit Zelltodsymptomen ist jedoch bei *sag101-2* und *pad4-1 sag101-2* selbst 72 hpi noch leicht verringert gegenüber dem Wildtyp.

Erneut geht hier die reduzierte Zelltodrate einher mit einem signifikant erhöhten Anteil sowohl des gesamten sekundären Hyphenwachstums als auch des mehrfach verzweigten sekundären Hyphenwachstums (siehe Abbildung 15 b). In *sag101-2* sowie *pad4-1 sag101-2* werden dabei selbst die Werte der *eds1-2*-Linie noch übertroffen.

Zudem kommt es auf der Doppelmutante *pad4-1 sag101-2* auch zu stellenweise massiven Verzweigungen einzelner Kolonien an Interaktionsstellen, welche 72 hpi noch keinerlei Zelltodsymptome aufweisen (Daten nicht gezeigt), und daher also noch über diesen Zeitpunkt hinaus sekundäres Hyphenwachstum zulassen können.



**Abbildung 15: Effekte von Mutationen in den *EDS1*-Komplexen auf die Anfälligkeit gegenüber *Bgh***

**a)** Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien 72 Stunden nach Inokulation. Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz, zellumschließende Calloseedeposition (Anilinblau-Färbung) und Trypanblaufärbung

**b)** relative Häufigkeit des sekundären Hyphenwachstums und des mehrfach (>2) verzweigten sekundären Hyphenwachstums 72 Stunden nach Inokulation mit *Bgh*-Sporen.

Ausgewertet wurden jeweils mindestens 400 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie. \* zeigt einen statistisch signifikanten ( $p = 0.05$ ) Unterschied zur jeweiligen Kontrolle an.

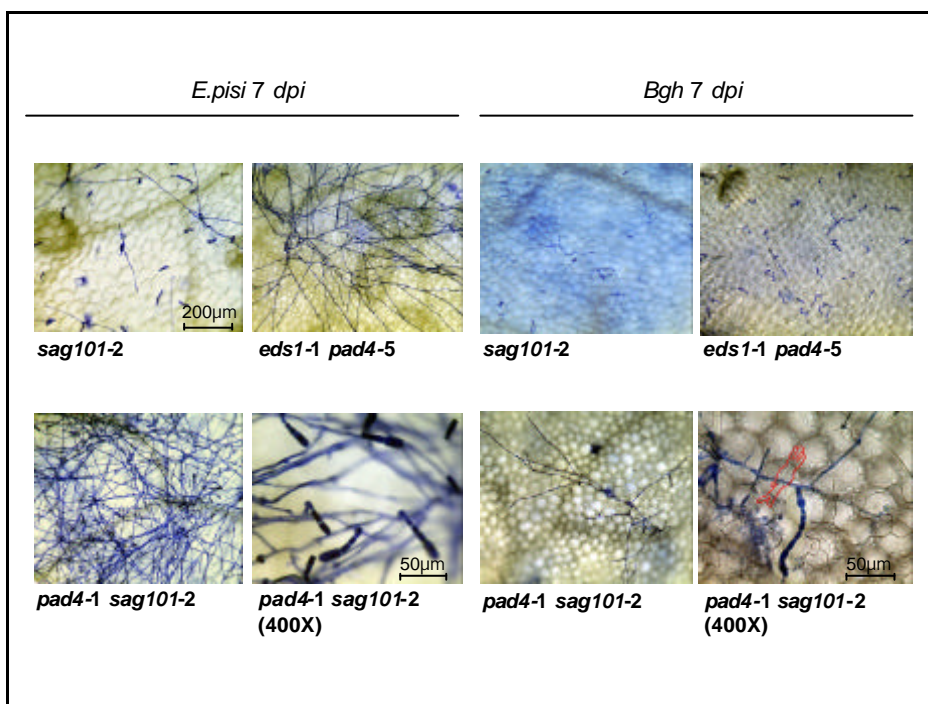
Um ein mögliches weiteres Fortschreiten der *Bgh*-Infektion erfassen zu können, wurde der Infektionsphänotyp der entsprechenden Linien sowohl nach *E. pisi* als auch nach *Bgh*-Inokulation 7 dpi untersucht (s.ff.).

Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 16 (Seite 86) zeigen zunächst, daß sowohl *E. pisi* als auch *Bgh* 7 dpi auf der *pad4 sag101*-Doppelmutante zur Sporulation gelangen. Die Nichtwirtsresistenz gegenüber beiden Pathogenen ist



in diesem Fall also selbst unabhängig von einer Mutation in *PEN2* vollständig gebrochen.

Die Häufigkeit der Sporulation von *E. pisi* auf *pad4-1 sag101-2* entspricht ungefähr der bereits bei *pen2-1 eds1-2* beobachteten. Die Sporulation von *Bgh* auf *pad4-1 sag101-2* bleibt hingegen mit 0 – 3 Sporulationsstellen pro Blatt ein seltenes Ereignis. Reinfektionsexperimente konnten daher bisher nur im Falle von *E. pisi* erfolgreich durchgeführt werden. Aufgrund morphologischer Charakteristika und Vergleiche ist jedoch auch im Falle der *Bgh*-Infektionen eine Kontamination mit *Arabidopsis*mehltau unwahrscheinlich.



**Abbildung 16: Vergleich der Effekte von Mutationen in den EDS1-Komplexen auf die Anfälligkeit gegen-über *E. pisi* und *Bgh***

Mikroskopische Aufnahmen von Blattpräparaten 7 Tage nach Inokulation mit *E. pisi* (**linke Hälfte**) und *Bgh* (**rechte Hälfte**). Färbung der Pilzstrukturen durch Coomassie-Blau. 400X: Sporangienträger von *E. pisi* bzw. *Bgh*. Die rote Umrandung markiert die Struktur eines reifen *Bgh*-Haustoriums.

Derzeit wird überprüft, ob die Anfälligkeit gegenüber *Bgh* und *E. pisi* in einer *pen2 pad4 sag101*-Tripelmutante weiter erhöht ist. Vorläufige Ergebnisse weisen auf eine deutliche Erhöhung der *Bgh*-Interaktionsstellen mit stark verzweigtem sekundären Hyphenwachstum in dieser Linie hin. Die Ausbildung eines dichten Myzels sowie eine signifikant verstärkte Sporulation von *Bgh* konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt sprechen die beobachteten kombinatorischen Effekte der Mutationen in *pen1/pen2/pen3* und *eds1/pad4/sag101* für ein weitgehend unabhängiges Zusammenwirken zweier Abwehrschichten, der *PEN*-vermittelten Penetrationsresistenz und der *EDS1*-Komplex-vermittelten, zelltodassoziierten posthaustoriellen Resistenz, bei der Etablierung der Nichtwirtsresistenz gegenüber Mehлтаupilzen.

## **4. ERGEBNISSE – TEIL 2:**

### **REMUTAGENESE DER *pen2*-MUTANTE UND MUSTERUNG NACH INDIVIDUEN MIT VERÄNDERTEM INFEKTIONS-PHÄNOTYP**

Im vorangegangenen Teil wurde die Funktion bereits bekannter genetischer Komponenten innerhalb der Nichtwirtsresistenz evaluiert. Der im Folgenden beschriebene parallele Ansatz diente dazu, nach bisher noch nicht beschriebenen Mediatoren der Nichtwirtsresistenz zu suchen und diese gegebenenfalls charakterisieren zu können. Dazu wurde zunächst eine Remutagenese von *pen2-1* durchgeführt. Die daraus resultierende M2-Population wurde sodann nach Individuen mit verändertem Infektionsphänotyp gemustert.

#### **4.1 Überprüfung der Mutagenese-Effizienz**

Zur Überprüfung der Effizienz der durchgeführten EMS-Remutagenese der *pen2-1*-Linie wurde in Stichproben von fünf M2-Familien der Anteil der Pflanzen bestimmt, die 2 Wochen nach Keiminduktion durch ausbleibende Pigmentsynthese (Albino-Phänotyp) auffällig waren. Innerhalb einer erfaßten Gesamtzahl von 1061 Pflanzen lag die Albinorate bei 2.0 ( $\pm 0.9$ ) %. Werte zwischen 1 und 5 % werden hierbei erfahrungsgemäß als Indikator für eine ausreichend gesättigte Remutagenese angesehen (Feldmann, 1992).

#### **4.2 Musterung nach Mutanten mit veränderter Zelltod-Autofluoreszenz nach Gerstemehltau-Inokulation**

Da bereits die *pen2-1*-Mutante aufgrund ihrer vermehrten Zelltodautofluoreszenz nach *Bgh*-Inokulation isoliert werden konnte (vgl. Abbildung 6, Seite 32) wurde dieser Parameter auch zur Musterung der remutagenisierten

*pen2* M2-Population verwendet. Dadurch sollte die Isolierung von Linien mit veränderter Penetrationshäufigkeit und/oder veränderter posthaustorieller Zelltodreaktion ermöglicht werden.

In der ersten Runde der Musterung nach Mutanten mit veränderter Zelltodautofluoreszenz wurden je 81 Individuen aus 148 verschiedenen Saatgutchargen (insgesamt also ca. 12000 Pflanzen) auf ihren Infektionsphänotyp hin untersucht. Dabei wurden 86 Linien als auffällig bewertet; 53 zeigten eine reduzierte, 33 eine erhöhte Zelltodautofluoreszenz nach Bgh-Inokulation. An zwei Linien konnten sogar makroskopisch sichtbare Symptome (chlorotische Bereiche) beobachtet werden (vgl. Abbildung 17, Seite 92).

Der Großteil dieser Phänotypen konnte jedoch entweder nicht in der Folgegeneration bestätigt werden, oder es handelte sich um eine nur sehr subtile phänotypische Veränderung in der jeweiligen Mutante, die somit für eine Phänotyp-basierte Kartierung der Mutation nicht in Frage kam.

Zudem konnte bei zahlreichen Linien mit reduzierter Zelltodautofluoreszenz durch kombinierte Trypanblau-Anilinblau-Färbung (vgl. 2.2.15) gezeigt werden, daß die verminderte Zelltodautofluoreszenz lediglich auf eine verringerte Callosedeposition an Infektionsstellen, nicht jedoch auf verringerte Zelltodraten zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt). Bei den Linien mit erhöhter Zelltodautofluoreszenz konnte zudem oftmals eine unkontrollierte Ausbreitung der Zelltodreaktion ins Mesophyll, gelegentlich auch ohne direkten Zusammenhang mit einer pilzlichen Penetration, beobachtet werden. Beide Kategorien kamen für eine weitere Untersuchung daher ebenfalls nicht in Frage.

Die verbleibenden Linien (*126a*, *127b* und *166b*) wurden molekular und biologisch weiter untersucht (vgl. 4.4 ff.) Die Phänotypen dieser Linien sind in Abbildung 17 zusammengefaßt.

### **4.3 Musterung nach Mutanten mit erhöhter Rate an sekundärem Hyphenwachstum des Gerstemehltaus**

Parallel zur Musterung nach Mutanten mit veränderter Zelltodautofluoreszenz wurden im Zufallsverfahren auch insgesamt 1000 Individuen der Musterungspopulation auf vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum des Gerstemehltaus *72 hpi* hin untersucht. Dabei konnte jedoch keine Linie identifiziert werden, die signifikant und reproduzierbar mehr sekundäres Hyphenwachstum von *Bgh* zuläßt.

Eine genaue Erfassung der Raten an sekundärem Hyphenwachstum bedarf in diesem Fall auch jeweils der mikroskopischen Analyse und ggf. auch der statistischen Auswertung, sodaß einerseits nur wenige Linien gemustert werden konnten, zum anderen eine Kartierung von Mutanten aufgrund eines nur leicht veränderten Phänotyps kaum praktikabel ist.

Zusätzlich wurden jedoch auch die 86 putativen Mutanten (s.o.) untersucht, die bereits durch veränderte Zelltodautofluoreszenz auffällig waren. Dabei konnte eine Linie (*157a*), welche zuvor durch eine leichte Reduktion der Zelltodautofluoreszenz auffällig war, mit qualitativ und quantitativ deutlich erhöhten Raten an sekundärem Hyphenwachstum von *Bgh 72 hpi* identifiziert werden. Auch diese wurde im Folgenden molekular und biologisch weiter charakterisiert (siehe 4.4 ff.).

### **4.4 Mikroskopische und molekulare Charakterisierung der isolierten putativen Mutanten**

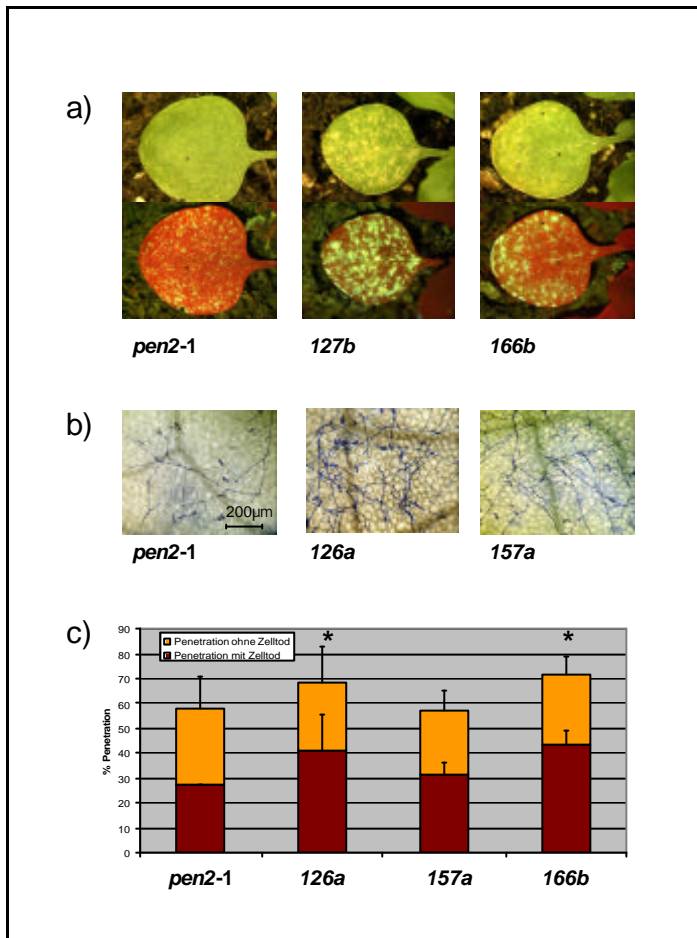
Zusätzlich zu der bereits im Laufe der Mutantensichtung erfolgten Charakterisierung hinsichtlich makroskopisch erkennbarer Infektionsphänotypen, Zelltodautofluoreszenz und vermehrtem sekundärem

Hyphenwachstum von *Bgh 72 hpi* wurden die 4 isolierten Mutantenlinien auch mikroskopisch auf die Rate des Invasionserfolges von *Bgh 72 hpi* untersucht.

Die Ergebnisse der mikroskopischen Analysen sind in Abbildung 17 zusammenfassend dargestellt. Die Mutantenlinien *127b* und *166b* konnten dabei eindeutig als makroskopisch auffällig nach *Bgh*-Inokulation charakterisiert werden. Bereits *72 hpi* lassen sich chlorotisch-nekrotische Flecken auf der gesamten Blattoberfläche (*127b*) bzw. bevorzugt am Blattrand (*166b*) feststellen (Abbildung 17a, oben). Die Kontrastierung der makroskopischen Symptome zum Wildtyp wird im weiteren Zeitverlauf noch deutlicher (Daten nicht gezeigt). Die makroskopisch erkennbaren Chlorosen / Nekrosen spiegeln eine massive Zunahme bzw. Ausbreitung der Zelltodautofluoreszenz wider, die bei Betrachtung unter UV-Licht erkennbar wird (Abbildung 17a, unten).

Bei der Analyse der Intensität des sekundären Hyphenwachstums von *E. pisi 7 dpi* waren zwei der vier Mutantenlinien auffällig (vgl. Abbildung 17b). Linie *157a* zeigte zuvor schon nach Inokulation mit *Bgh* eine deutliche qualitative und quantitative Erhöhung des sekundären Hyphenwachstums (vgl. 4.3). Bei Linie *126a* hingegen konnte dies nach *Bgh*-Inokulation jedoch nur in Tendenzen sowie mit hoher Variabilität beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Penetrationsraten von *Bgh 72 hpi* sind in Linie *126a* sowie in Linie *166b* durchgehend leicht, jedoch nicht signifikant erhöht (vgl. Abbildung 17c). Der Anteil der Interaktionsstellen mit Zelltodsymptomen erhöht sich proportional dazu. Linie *157a* weist diesbezüglich keine Veränderung gegenüber *pen2-1* auf. Eine entsprechende phänotypische Analyse von Linie *127b* konnte nicht durchgeführt werden, da hier eine Auswertung einzelner Interaktionsstellen durch die in allen Blattbereichen massive Ausbreitung der Zelltodsymptome nicht möglich ist.



### Abbildung 17: Phänotypen der isolierten *pen2*-Suppressormutanten

**a)** Aufnahme von *Bgh*-inokulierten Blättern 72 hpi unter UV-Licht zur Detektion der Zelltodautofluoreszenz.

**b)** Mikroskopische Aufnahmen von Blattpräparaten 7 Tage nach Inokulation mit *E. pisi*. Färbung der Pilzstrukturen durch Coomassie-Blau.

**c)** Penetrationserfolg des Gerstemehltaus auf den jeweiligen Mutantenlinien 72 Stunden nach Inokulation. Der Penetrationserfolg auf Linie *127b* konnte aufgrund der starken Ausbreitung der Zelltodreaktion in benachbartes Gewebe nicht eindeutig quantifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Ausgewertet wurden jeweils mindestens 400 unabhängige Interaktionsstellen pro Linie. Die Höhe der Balken repräsentiert die Höhe des Penetrationserfolges. Der Anteil an penetrierten Zellen mit Zelltodsymptomen ist dunkelrot unterlegt. Als Zelltodindikator dienten Autofluoreszenz und zellumschließende Callosedeposition (Anilinblau-Färbung).

Mittels semiquantitativer RT-PCR (vgl. 2.2.7 b) wurde zudem die Expression von *PR1*, einem Markergen des Salicylsäure-Signalwegs, 24 Stunden nach *Bgh*-Inokulation untersucht. Dies sollte darüber Aufschluß geben, ob einige der beobachteten Phänotypen mit konstitutiver Aktivierung oder verminderter Induzierbarkeit des SA-Signalwegs einhergehen.

Dabei konnte in keiner der untersuchten<sup>1</sup> Mutantenlinien eine Veränderung der Signalstärke im Vergleich zu *pen2-1* detektiert werden. Linie *127b* weist jedoch auch vor Inokulation mit *Bgh* eine erhöhte Akkumulation des *PR1*-Transkripts auf (Daten nicht gezeigt), was auf eine konstitutive Aktivierung der basalen und / oder systemischen Resistenz in dieser Linie schließen läßt.

Zusätzlich wurde auch die Akkumulation des Phytoalexins Camalexin nach Inokulation mit *Alternaria brassicicola* untersucht<sup>2</sup>. Dadurch sollte ausgeschlossen werden, daß es sich bei den isolierten Linien um Allele bereits bekannter Phytoalexin-defizienter Mutanten handelt.

Dabei ließ sich in alle analysierten Linien<sup>3</sup> eine deutliche Camalexinakkumulation nachweisen. In den Linien *157a* und *166b* waren die nachgewiesenen Camalexinmengen zu allen erfaßten Zeitpunkten (24, 48 und 72 *hpi*) sogar höher als in der *pen2-1*-Mutante. In Linie *126a* hingegen war die nachgewiesene Camalexinmenge nur 24 *hpi* erhöht im Vergleich zu *pen2-1*; im weiteren Verlauf sank sie deutlich ab (Daten nicht gezeigt). Dies läßt darauf schließen, daß in dieser Linie die Camalexinbiosynthese zwar induziert werden kann, eine

---

<sup>1</sup> Linie *126a* wurde nicht auf *PR1*-Transkriptakkumulation hin untersucht, da der aberrante Infektionsphänotyp dieser Linie zum Zeitpunkt der Durchführung dieses Experiments noch nicht bestätigt war.

<sup>2</sup> in Zusammenarbeit mit Dr. Markus Frank, Tanja Kempf, BASF Plant Science GmbH, Limburgerhof (*Alternaria*-Inokulationen) sowie Dr. Pawel Bednarek, MPIZ Köln (Camalexin-Analyse).

<sup>3</sup> Linie *127b* wurde nicht auf Fähigkeit zur Camalexinbiosynthese hin untersucht, da diese Linie aufgrund ihrer konstitutiven *PR1*-Transkriptakkumulation zunächst von weiteren Analysen ausgeschlossen wurde.



dauerhafte Aufrechterhaltung der Biosynthese bzw. Akkumulation des Phytoalexins jedoch nicht erfolgt.

Die Daten der mikroskopischen und molekularen Charakterisierung der Mutantenlinien sind nochmals in Tabelle 9 (Seite 96) zusammengefaßt.

#### **4.5 Phänotypische Charakterisierung der isolierten putativen Mutanten mit verschiedenen Pathogenen**

Zusätzlich zu den bisher bereits erfaßten Parametern wurde auch der Phänotyp der isolierten Putantenlinien nach Inokulation mit diversen anderen Pathogenen untersucht. Dabei wurden Pathogene gewählt, die sich zum einen durch unterschiedliche Lebensweisen (biotroph, hemibiotroph, nekrotroph), zum anderen durch unterschiedliche Virulenz auf *Arabidopsis* (Wirts- oder Nichtwirtsinteraktion) charakterisieren lassen. Die Ergebnisse dieser Analysen sind ebenfalls in Tabelle 9 zusammengefaßt.

In den Nichtwirtsinteraktionen ist zunächst vor allem Linie *127a* auffällig, die analog zu den Beobachtungen mit *Bgh* und *E. pisi* auch auf Inokulationen mit *Phytophthora infestans* und *Colletotrichum lagenarium* mit massiver Nekrosenbildung reagiert. Bei der beobachteten Reaktion könnte es sich also um eine allgemeine Hypersensitivitätsreaktion der Mutante gegenüber Penetrationsversuchen (hemi-)biotropher Pathogene handeln. Diese wurde auch in der kompatiblen Interaktion mit *Golovinomyces orontii* beobachtet, und korreliert dort mit einer leicht verringerten Anfälligkeit.

In Linie *166b* konnte die bereits bei *Bgh*- und *E. pisi*-Inokulation beobachtete verstärkte Nekrosenbildung jedoch nur in der Interaktion mit *P. infestans* nicht jedoch nach Inokulationen mit *C. lagenarium* und *G. orontii* beobachtet werden.

Linie *157a* zeigt lediglich in der Interaktion mit *Colletotrichum higginsianum* verstärkte Nekrosenbildung; in Linie *126a* lassen sich nach keiner der durchgeführten Pathogeninokulationen deutliche Abweichungen vom *pen2*-Phänotyp erkennen. Die Effekte der entsprechenden Mutationen scheinen also auf Interaktionen mit einer limitierten Gruppe von Pathogenen begrenzt zu sein.

Aufgrund der im Vergleich unterschiedlichen Phänotypen – sowohl nach Inokulation mit verschiedenen Pathogenen, als auch hinsichtlich der getesteten molekularen Charakteristika – kann jedoch angenommen werden, daß es sich bei den einzelnen Mutationen nicht um verschiedene mutante Allele eines gleichen Gens handelt. Eine Komplementationsanalyse wurde daher bisher noch nicht durchgeführt.

Zur weiteren Analyse wurde zunächst Linie *157a* ausgewählt, da diese als einzige ein signifikant vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum von *Bgh* und *E. pisi* zuläßt.

**Tabelle 9: Charakterisierung der isolierten Putantenlinien**

Pathogen	Interaktionstyp	Parameter	126a	127b	157a	166b
<i>Bgh</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>Makroskopische Symptome 7 dpi</b>	=	++	=	+
<i>Bgh</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>Zellto autofluoreszenz 72 hpi</b>	++	++	=	++
<i>Bgh</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>Penetrationsrate 72 hpi</b>	+	n.t.	=	+
<i>Bgh</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>Sekundäres Hyphenwachstum 72 hpi</b>	(+)	=	++	=
<i>E. pisi</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>Sekundäres Hyphenwachstum 7 dpi</b>	+	=	++	=
<i>Bgh</i>	biotroph, Nichtwirt-	<b>PR1-Expression 24 hpi</b>	n.t.	konstitutiv	=	=
<i>Alternaria brassicicola</i> <sup>1)</sup>	nekrotroph, Nichtwirt-	<b>Camalexin-Akkumulation 24 - 72 hpi</b>	+/-	n.t.	+	+
<b><i>Phytophthora infestans</i></b> <sup>2)</sup>	hemibiotroph, Nichtwirt-	Nekrosenbildung 72hpi	n.t.	++	=	++
<b><i>Colletotrichum lagenarium</i></b> <sup>3)</sup>	hemibiotroph, Nichtwirt-	Nekrosenbildung 72hpi	=	++	=	=
<b><i>Alternaria brassicicola</i></b> <sup>1)</sup>	nekrotroph, Nichtwirt-	Mazeration 4dpi	=	=	=	=
<b><i>Colletotrichum higginsianum</i></b> <sup>3)</sup>	hemibiotroph, Wirt-	Nekrosenbildung 72 hpi	=	+	+	=
<b><i>Golovinomyces orontii</i></b> <sup>4)</sup>	biotroph, Wirt-	Sporulation 7 dpi	=	-	=	=

<sup>1)</sup> durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Markus Frank, Tanja Kempf; BASF Plant Science, Limburgerhof

<sup>2)</sup> durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Lore Westphal, Jörn Landtag; IPB Halle

<sup>3)</sup> durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Volker Lipka, ZMBP Tübingen

<sup>4)</sup> durchgeführt in Kollaboration mit Dr. Christina Neu, Heidrun Häweker; MPIZ Köln

n.t. nicht getestet

- reduziert im Vergleich zu pen2-1

= unverändert im Vergleich zu pen2-1

+ erhöht im Vergleich zu pen2-1

++ stark erhöht im Vergleich zu pen2-1

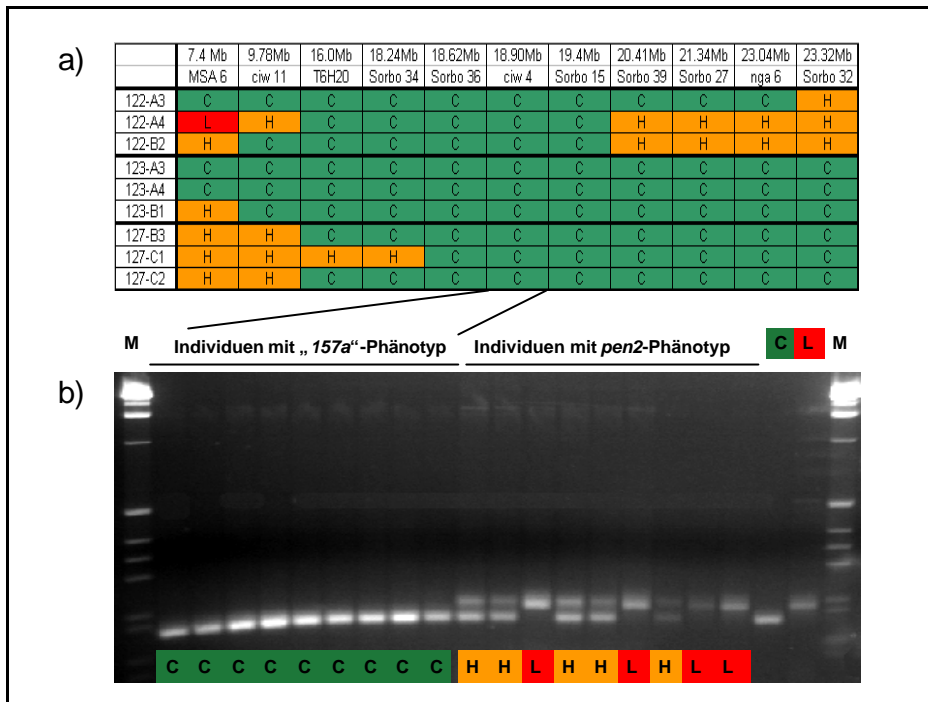
#### **4.6. Grobkartierung der Mutation in Linie 157a und Ausschluß von Kandidatengenem durch DNA-Sequenzierung**

Zur Grobkartierung der Mutation in Linie 157a (im genetischen Hintergrund Columbia) wurde diese zunächst mit einer zuvor generierten *pen2-1*-Mutante im genetischen Hintergrund Landsberg erecta gekreuzt. Die daraus resultierende F<sub>2</sub>-Generation wurde auf Cosegregation des mutanten bzw. nicht-mutanten Phänotyps mit ökotypspezifischen Markern für Columbia bzw. Landsberg erecta untersucht (vgl. 2.2.9; Lukowitz et al., 2000).

Dabei konnte ein 2.17 Mb großes Intervall auf dem unteren Arm von Chromosom III identifiziert werden, welches in Linien mit mutantern Phänotyp durchweg Columbia-Markernsignale liefert, wohingegen Linien mit nicht-mutantern Phänotyp heterozygot oder homozygot Landsberg-Markernsignale aufweisen (siehe Abbildung 18a, Seite 98). Die Mutation liegt also in der Nähe des genetischen Markers *ciw4* (vgl. Tabelle 7, Seite 58; siehe Abbildung 18b).

Das oben beschriebene Chromosomintervall umfaßt noch 516 annotierte Gene, welche somit als Kandidaten für die Lage der Mutation in Frage kommen; bei einem dieser Gene handelt es sich um *PAD4*. Aufgrund der Ähnlichkeit des 157a-Phänotyps mit dem bereits in 3.5 ff. beschriebenen Phänotyp der Doppelmutante *pen2-1 pad4-1* lag zunächst die Vermutung nahe, daß es sich bei der Mutation in Linie 157a um ein schwaches Allel von *pad4* handeln könnte.

Dies konnte jedoch zum einen durch Sequenzierung des *PAD4*-Gens in Linie 157a, zum anderen auch durch Vergleiche der Phänotypen von 157a und *pen2-1 pad4-1* in der Interaktion mit anderen Pathogenen ausgeschlossen werden. Die Phänotypen der beiden Linien unterscheiden sich deutlich in den Interaktionen mit *P. infestans* und *Colletotrichum higginsianum* (Lore Westphal, Jörn Landtag, Volker Lipka, persönliche Mitteilungen).



### Abbildung 18: Kartierung der Mutation in Linie 157a

**a)** Tabellarische Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse zur Kartierung der Mutation in Linie 157a. Gezeigt ist der obere Abschnitt von Chromosom III.

**b)** Segregation von *SSLP*-marker *ciw 4* in einer Population zur Kartierung der Mutation in Linie 157a. Links: PCR-ergebnis von Individuen, welche das für Linie 157a typische verstärkte sekundäre Hyphenwachstum von *E. pisi* zeigen („157a-Phänotyp“); rechts: PCR-Ergebnis von Individuen, die kein verstärktes sekundäres Hyphenwachstum von *E. pisi* zeigen („*pen2*-Phänotyp“). C: Col-0, L: La-er, H: heterozygot.

Zusätzliche Informationen über mögliche Kandidatengene konnten außerdem aus Daten zur Koexpression von *PEN2* und anderen Genen<sup>1</sup> gewonnen werden. Hierbei zeichneten sich 5 Gene im Zielintervall durch eine deutliche Koexpression mit *PEN2* aus:

<sup>1</sup> freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Shauna Somerville, Stanford

At3g51920	Calmodulin-9
At3g51660	Protein mit Homologien zu Makrophagen-Migrationsinhibitoren
At3g50740	Protein der UDP-glucuronosyl / UDP-glucosyltransferase-Familie
At3g50950	putatives R-Protein der CC-NB-LRR-Klasse (vgl. 1.1.2)
At3g52400	<i>SYP122</i>

#### **4.7 Untersuchung der Abhängigkeit des beobachteten Phänotyps vom Vorhandensein der *pen2*-Mutation**

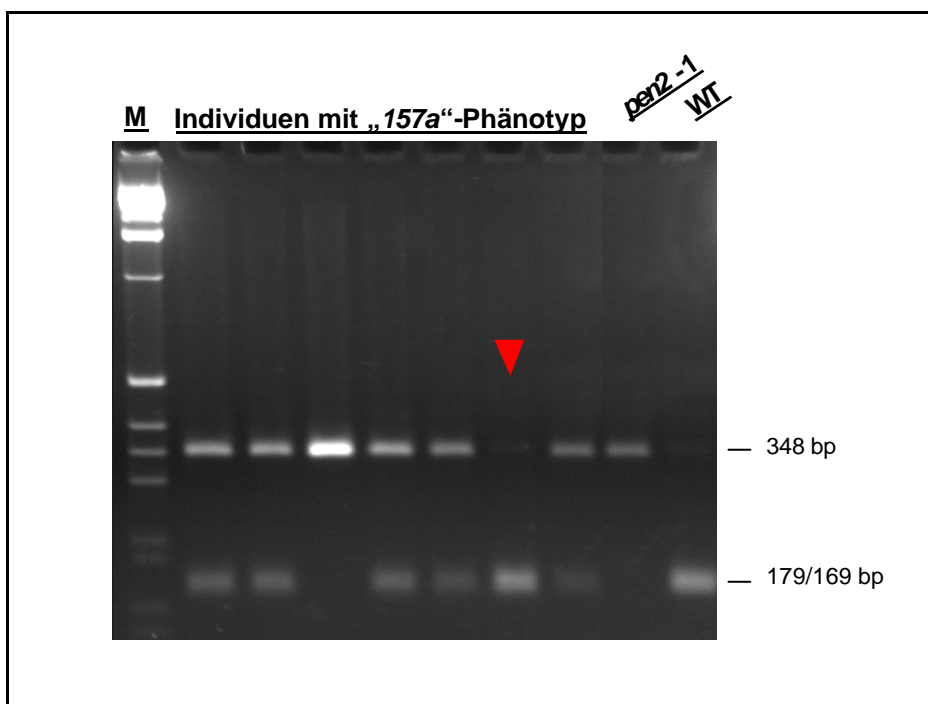
Zur Analyse der Abhängigkeit der beobachteten Phänotypen vom Vorhandensein der *pen2*-Mutation wurden die isolierten Mutantenlinien zunächst mit Wildtyppflanzen (hier: Ökotyp Landsberg erecta) gekreuzt. In der F<sub>2</sub>-Generation einer solchen Kreuzung treten Linien auf, die über zwei intakte Kopien des *PEN2*-Gens verfügen, bei denen die sekundäre Mutation aber immer noch homozygot vorhanden ist.

Zur statistisch fundierten Analyse der *pen2*-Abhängigkeit der beobachteten Phänotypen müßte in einer solchen F<sub>2</sub>-Generation das Aufspaltungsverhältnis zwischen Individuen mit mutantern und Wildtyp-Phänotyp untersucht und statistisch analysiert werden. Ein Aufspaltungsverhältnis von 1 (mutant) : 3 (Wildtyp) würde dabei eine *pen2*-Unabhängigkeit des Phänotyps anzeigen, wohingegen ein Verhältnis von 1 : 16 auf eine *pen2*-Abhängigkeit des Phänotyps schließen lassen könnte. Eine derartige statistische Analyse wurde bisher für keine der isolierten Mutantenlinien durchgeführt.

In umgekehrter Verfahrensweise wurden jedoch Individuen der F<sub>2</sub>-Generation der Kreuzung *157a* X La-er zunächst auf ihren Phänotyp nach *E. pisi*-Inokulation untersucht; die Linien mit vermehrtem sekundärem Hyphenwachstum wurden im Anschluß auf Vorhandensein der *pen2-1*-Mutation getestet. In einer kleinen Stichprobe konnte dabei zumindest eine Linie identifiziert werden, die vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum von *E. pisi* 7 dpi aufwies („*157a*

Phänotyp“), jedoch beide *PEN2* Wildtypallele enthielt (siehe Abbildung 19). Der Phänotyp dieser Linie konnte zudem in der Folgegeneration bestätigt werden. Allerdings war die Ausprägung des sekundären Hyphenwachstums von *E. pisi* 7 dpi in dieser Linie zwar deutlich erhöht, blieb aber noch hinter den üblicherweise in Linie 157a beobachteten Intensitäten zurück. Insgesamt deutet dies auf einen kombinatorischen Effekt der *pen2*-Mutation und der sekundären Mutation in Linie 157a.

Diese Mutation wurde aufgrund der vermehrten Ausbreitung der *Bgh*- und *E. pisi*-Hyphen auf der Blattoberfläche mit *dit1* (*diatasis*; altgriech.: Ausdehnung, Ausbreitung) bezeichnet.



**Abbildung 19: Detektion der *pen2-1*-Mutation zum Test auf Unabhängigkeit der Segregation von *pen2-1* und 157a**

Aus der F<sub>2</sub>-Population einer Kreuzung von Linie 157a mit La-er wurden Individuen selektiert, die verstärktes sekundäres Hyphenwachstum des Erbsenmehltaus („157a-Phänotyp“) zeigen. Diese wurden mittels CAPS-marker-Analyse auf das Vorhandensein der *pen2-1* Mutation hin untersucht. Der Pfeil markiert eine Linie, die den „157a-Phänotyp“ zeigt und homozygot für *PEN2* ist.

## 5. DISKUSSION

### 5.1 Mehrere teilweise unabhängige Signalwege sind an der Ausprägung der Penetrationsresistenz beteiligt

Die Ergebnisse der *Bgh*-Inokulationsexperimente zeigen einen additiven Effekt von *pen1* und *pen2* auf die Penetrationsanfälligkeit. Nach formalgenetischer Interpretation sind *PEN1* und *PEN2* daher in unterschiedlichen Mechanismen an der Vermittlung der Penetrationsresistenz beteiligt. Dies wird durch den ebenfalls akkumulativen Effekt beider Mutationen auf die Anfälligkeit gegenüber *E. pisi* unterstützt.

Allerdings konnte in weiteren Versuchen auch gezeigt werden, daß sich die Kombinationen von *pen1* und *pen3* bzw. *pen2* und *pen3* nicht additiv auf die Anfälligkeit gegenüber *Bgh* und *E. pisi* auswirken (M. Stein, persönliche Mitteilung, und eigene Beobachtungen). Dies erschwert eine formale Interpretation, da demnach zwar *PEN1* und *PEN2* in unterschiedlichen, *PEN1* und *PEN3* sowie *PEN2* und *PEN3* jedoch im jeweils gleichen Mechanismus agieren würden.

Die Ergebnisse der genetischen Interaktionsanalysen ließen sich jedoch mit einer dualen Funktion von *PEN3* erklären. Für das Syntaxin *PEN1* und den ABC-Transporter *PEN3* konnte eine Plasmamembranlokalisation nachgewiesen werden (Collins et al., 2003; Assaad et al., 2004, Bhat et al., 2005; M. Stein und S. Somerville, unveröffentlicht). Demgegenüber liegt die  $\beta$ -Glykosylhydrolase *PEN2* neuesten Ergebnissen zufolge möglicherweise in zwei distinkten Proteinfractionen vor. Dabei scheint der größte Teil des *PEN2*-Gesamtproteins in einer prozessierten löslichen Form vorzuliegen, während ein weitaus geringerer, möglicherweise jedoch zur Vermittlung der Penetrationsresistenz entscheidender Anteil membran-assoziiert ist (V. Lipka, persönliche Mitteilung). Es kann beispielsweise angenommen werden, daß *PEN3* sowohl ein Substrat oder



Produkt von *PEN2* transportiert, als auch eine (davon verschiedene) Komponente, die am *PEN1*-vermittelten Vesikeltransport beteiligt ist. Eine genauere biochemisch-funktionale Charakterisierung von *PEN2* und *PEN3* steht allerdings bisher noch aus.

Insgesamt deuten die Ergebnisse auf eine zentrale Rolle der *PEN*-Gene bei der Vermittlung der Penetrationsresistenz hin. Es ist jedoch wahrscheinlich, daß noch eine Vielzahl anderer Komponenten an der Vermittlung oder Modulation der Penetrationsresistenz beteiligt sind, die aufgrund genetischer Redundanz bzw. lethaler Wirkungen nicht durch die bisherigen Mutantensichtungen erfaßt werden konnten.

Mehrere pharmakologische Studien in unterschiedlichen Wirt-Pathogen-Systemen belegen beispielsweise eine Rolle des Cytoskeletts innerhalb der Penetrationsresistenz. Nach Behandlung mit dem Actin-Inhibitor Cytochalasin A konnte in einer Vielzahl verschiedener Interaktionen ein erhöhter Penetrationserfolg der jeweils getesteten Pathogene beobachtet werden (Kobayashi et al., 1997a; Kobayashi et al., 1997b; Kobayashi and Hakuno, 2003; Yun et al., 2003). In Gerstepflanzen, die durch Präsenz des Transmembranproteins *MLO* anfällig gegenüber *Bgh* sind (Jorgensen and Mortensen, 1977), geht die erhöhte Penetrationsanfälligkeit zudem mit einer verlangsamten Reorganisation des Cytoskeletts und Fokussierung zur Interaktionsstelle nach *Bgh*-Inokulation einher. Nach Färbung des Aktin-Cytoskeletts mit Fluoreszenz-markiertem Phalloidin korreliert die durch *mlo*-Mutation vermittelte Resistenz mit einer raschen und polaren Ausrichtung der Aktinfilamente in Richtung der pilzlichen Penetrationsversuche. In den anfälligen *MLO*-Linien läuft der Umbau der Aktinfilamente hingegen langsamer und mit schwächer ausgeprägter Fokussierung ab (Opalski et al., 2005).

Eine fokale Akkumulation unterhalb des pilzlichen Penetrationsversuches konnte zudem auch für *PEN1* in *Arabidopsis* sowie für *MLO* und das *PEN1*-homologe *ROR2* in Gerste nachgewiesen werden (Bhat et al., 2005). Diese

Membranproteine werden in einer Mikrodomäne in der Plasmamembran konzentriert. Interessanterweise erfolgt dies auch unter Bedingungen, in denen das Aktin-Cytoskelett durch Überexpression des Aktin-depolymerisierenden Faktors ADF3 inaktiviert wurde (Assaad et al., 2004; Bhat et al., 2005). Ein funktionaler Beitrag des polar ausgerichteten Aktin-Cytoskeletts zu Resistenzreaktionen an der Zelloberfläche scheint daher erst nach der Ausbildung der Mikrodomäne zu erfolgen.

Zudem konnte auch für  $H_2O_2$ , welches unterhalb des pilzlichen Penetrationsversuchs akkumuliert, sowohl in Wirts- als auch in Nichtwirtsinteraktionen eine Beteiligung an der Penetrationsresistenz nachgewiesen werden. Durch Vorbehandlung mit dem  $H_2O_2$ -degenerierenden Enzym Katalase wurde in mehreren getesteten Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen ein erhöhter Penetrationserfolg pilzlicher Pathogene beobachtet (Mellersh et al., 2002).

Die Zusammensetzung der Zellwand bzw. der nach Pathogenangriff gebildeten Zellwandappositionen kann ebenfalls die Penetrationsresistenz beeinflussen. Durch Mutation einer Callosesynthase (*PMR4* bzw. *GSL5*) wird beispielsweise die Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh* um ca. 10% erhöht. Paradoxerweise sind die *pmr4/gsl5*-mutanten Linien jedoch resistent gegenüber *Golovinomyces orontii* und *Erysiphe cichoracearum*. Während es auf Wildtyppflanzen 10 dpi zu deutlich makroskopisch erkennbarem Hyphenwachstum und Sporulation dieser Pathogene kommt, ist in *pmr4/gsl5*-mutanten Linien makroskopisch keine Ausbreitung dieser Pathogene zu erkennen. Der Callosesynthase *PMR4/GSL5* können also möglicherweise gegensätzliche Funktionen bei der Vermittlung der Penetrationsresistenz und der posthaustoriellen Resistenz zugeschrieben werden (Jacobs et al., 2003; Nishimura et al., 2003).

Neben den *PEN*-Proteinen sind somit die Zusammensetzung der Zellwandappositionen sowie gerichtete lokale, möglicherweise mikrodomänen-assoziierte Abwehrreaktionen entscheidend für die Penetrationsresistenz

gegenüber Nichtwirtspathogenen. Das genaue Zusammenspiel all dieser Faktoren und die Rolle der *PEN*-Proteine darin bedarf jedoch noch der weiteren Analyse.

## **5.2 Salicylsäure (SA) und Komponenten des SA-Signalwegs sind nur geringfügig an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz beteiligt**

Transgene *NahG*-Linien weisen eine erhöhte Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh* und vermehrtes sekundäres Hphenwachstum von *E. pisi* auf. Entsprechende Beobachtungen konnten auch bei der Interaktion von *NahG*- und *npr1*-mutanten Linien mit dem Weizenmehltau (*Bgt*) gemacht werden. Die Invasionshäufigkeit ist in diesen Linien im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht, bleibt allerdings mit 3-5% immer noch vergleichsweise gering (Yun et al., 2003). In eigenen Versuchen mit *Bgh* konnten entsprechende Effekte der *npr1*-Mutation jedoch nicht eindeutig festgestellt werden.

Die erhöhte Penetrationsanfälligkeit von *NahG* muß allerdings nicht ursächlich mit der Abwesenheit der Signalsubstanz SA zusammenhängen. Durch das *NahG*-Transgen wird Salicylsäure zu Catechol umgesetzt (You et al., 1991). Die Anwesenheit von Catechol konnte in Untersuchungen mit *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* mit dem Verlust der Nichtwirtsresistenz gegenüber diesem Pathogen in Verbindung gebracht werden. Durch simultane Infiltration von Wildtyp-*Arabidopsis*-Blättern mit dem Pathogen und Catechol wird die Anfälligkeit gegenüber *P. syringae* pv. *phaseolicola* deutlich gesteigert (van Wees and Glazebrook, 2003). Die auf den *NahG*-Linien beobachteten Effekte könnten also möglicherweise ebenfalls nicht auf die Abwesenheit des SA-Signals, sondern auf die Anwesenheit des Degradationsproduktes Catechol zurückzuführen sein.

In einigen Nichtwirtsinteraktionen von *Arabidopsis* und *Uromyces spec.* konnte jedoch neben der stark erhöhten Anfälligkeit von *NahG*-Linien auch eine (jedoch weniger stark) erhöhte Anfälligkeit von *sid2*-Mutantenlinien beobachtet werden, die defizient in der Synthese von SA sind. Auf *sid2*-Mutanten kommt es demnach bereits zu einer deutlich erhöhten Invasions- und Sporulationsrate als auf dem Wildtyp; dieser Effekt ist jedoch auf *NahG*-Linien noch weiter verstärkt (Mellersh and Heath, 2003). Dies läßt darauf schließen, daß in diesem Fall SA-Abwesenheit und Catechol-Anwesenheit einen kombinatorischen Effekt auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz haben.

Für eine Rolle des SA-Signals bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz spricht zudem auch der Befund, daß in der Interaktion mit *E. pisi* sowohl die *nahG*- als auch die *npr1*-mutanten Linien in gleichem Maße verstärktes sekundäres Hyphenwachstum zulassen. Dies könnte also in beiden Fällen auf die ausbleibende SA-Signaltransduktion zurückzuführen sein.

Die beiden SA-defizienten Mutantenlinien *eds5-1* (= *sid1-1*; Nawrath et al., 2002) und *eds16-1* (= *sid2-2*; Wildermuth et al., 2001) zeigten jedoch im Gegensatz zu den Beobachtungen mit *Uromyces spec.* keine deutlich erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Bgh* und *E. pisi* (Zimmerli et al., 2004, und eigene Beobachtungen). Eine Analyse der entsprechenden *pen2*-Doppelmutantenkombinationen wurde bisher jedoch nicht durchgeführt. Eine genauere Untersuchung der genetischen Interaktionen SA-defizienter Mutantenlinien mit *pen2* ist also erforderlich, um die Rolle von SA in der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz zu erörtern.

### **5.3 Der *RAR1-SGT1*-Komplex hat ebenfalls nur eine geringfügige Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz**

Die Analyse des *Bgh*-Infektionsphänotyps im Zeitverlauf zeigt zunächst eine erhöhte Penetrationsanfälligkeit aller *rar1*- und *sgt1b*-mutanten Linien. Diese ist

im Vergleich zum Effekt der *pen*-Mutationen jedoch marginal. Eine Funktion von *RAR1* und *SGT1* bei der Vermittlung der Penetrationsresistenz ist daher zu vernachlässigen.

Allerdings läßt sich in den *pen2 sgt1b*-mutanten Linien ein verlangsamtes Einsetzen der Zelltodreaktion erkennen, was mit leicht erhöhtem sekundären Hyphenwachstum korreliert ist. Eine Funktion von *SGT1* bei der Vermittlung der Zelltodreaktion konnte auch bereits in vorangegangenen Untersuchungen an *Nicotiana benthamiana* nachgewiesen werden. Virus-induziertes *silencing* von *SGT1* führt in zahlreichen getesteten inkompatiblen und Nichtwirts-Interaktionen zum Ausbleiben der hypersensitiven Zelltodreaktion (Bouarab et al., 2002; Peart et al., 2002).

Bei der Interaktion mit *E. pisi* wurde sowohl in *rar1*- als auch in *sgt1b*-mutanten Linien ein vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum beobachtet, das jedoch in *sgt1b*-Mutanten jeweils etwas stärker ausgeprägt ist. Auch hier bleibt das Ausmaß des sekundären Hyphenwachstums allerdings hinter der in einigen anderen Linien beobachteten Intensität zurück.

Für *RAR1* wurde hingegen bisher nur in Gerste eine Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (*Bgt*) und *Golovinomyces orontii* dokumentiert. Dabei wurde zudem auch nur die Ausbreitung der pathogen-induzierten Zelltodreaktion semiquantitativ erfaßt (Freialdenhoven et al., 2005). Ob es in diesem Fall auch zu einem erhöhten Invasionserfolg bzw. vermehrtem sekundären Hyphenwachstum kommt, bleibt jedoch unklar.

Die vorliegenden Daten sprechen also für eine geringfügige Beteiligung von *SGT1* an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion sowie einer zu vernachlässigenden Rolle von *RAR1* innerhalb der Nichtwirtsresistenz gegenüber Gerste- und Erbsenmehltau.

## 5.4 Die *EDS1*-Komplexe bilden zentrale Elemente der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz

Sowohl in der Interaktion mit *Bgh* als auch mit *E. pisi* gehen die Mutationen in *eds1*, *pad4* und *sag101* mit den insgesamt deutlichsten Steigerungen der Anfälligkeit einher. Die Mutation in *eds1* führt bereits zu signifikant erhöhtem sekundärem Hyphenwachstum von *Bgh*. Mutationen in *eds1* und *pad4* erlauben zudem deutlich vermehrtes sekundäres Hyphenwachstum von *E. pisi*. In Kombination mit *pen2* reichen Mutationen in *eds1* oder *pad4* aus, um die Nichtwirtsresistenz gegen *E. pisi* vollständig zu brechen. In der *pad4 sag101*-Doppelmutante ist die Nichtwirtsresistenz gegenüber *Bgh* und *E. pisi* sogar unabhängig von einer Mutation in einem der *PEN*-Gene gebrochen. *EDS1* und seinen Interaktionspartnern *PAD4* (Feys et al., 2001) und *SAG101* (Feys et al., 2005) kommt also eine zentrale Rolle bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz zu.

Da es in diesen Linien oftmals zu starkem Überwachsen einzelner Pilzkolonien kommt, steigt auch die Wahrscheinlichkeit des mehrfachen Penetrationsversuchs an einzelnen Epidermiszellen. Das massive sekundäre Hyphenwachstum könnte also durch die erhöhte Anfälligkeit bereits penetrierter Zellen für Folgepenetrationen (eigene Beobachtungen, und Olesen et al., 2003) nochmals verstärkt worden sein.

Für *eds1* wurde auch in anderen Studien bereits eine Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen, u.a. *Bgh*, nachgewiesen. Dabei wurde jeweils eine geringfügig erhöhte Penetrationsanfälligkeit von *eds1*-mutanten Linien festgestellt, was für eine Rolle von *EDS1* bei der Vermittlung der Penetrationsresistenz sprechen würde (Mellersh and Heath, 2003; Yun et al., 2003; Zimmerli et al., 2004). In der Interaktion mit *Bgh* konnte dies im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Für die Interaktion mit *E. pisi* wurden entsprechende Daten

aufgrund der vergleichsweise raschen Kolonieausbreitung und der damit verbundenen schweren Auswertbarkeit einzelner Interaktionsstellen im Zeitverlauf nicht erhoben.

Durch Kombination der *eds1*-Mutation mit pharmakologischer Inhibierung des Aktincytoskeletts durch Cytochalasin E konnte zudem die Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegenüber *Bgt* gebrochen werden, nicht jedoch in Kombinationen von Cytochalasin E und *NahG* oder *pad4* (Yun et al., 2003). Neben der bereits diskutierten Rolle des Cytoskeletts innerhalb der Penetrationsresistenz deutet dies ebenfalls auf eine zentrale Rolle von *EDS1* bei Vermittlung der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz hin.

Die biochemische Analyse der Interaktion von *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* liefert weitere Ansatzpunkte zur Erklärung der Funktion dieser Proteine. *EDS1* liegt im Cytosol als Dimer oder in Komplex mit *PAD4* vor, im Nucleus auch in Komplexen mit *SAG101*. Beide Interaktionspartner stabilisieren *EDS1* und werden auch durch *EDS1* stabilisiert. Eine mutationsbedingte Abwesenheit der Interaktionspartner führt somit zur Reduktion der Gesamtmenge an *EDS1*. In *sag101*-Mutanten konnten beispielsweise noch 60% der Wildtypmenge an *EDS1* nachgewiesen werden; in *pad4*-Mutanten noch 25%, und in *pad4 sag101*-Doppelmutanten schließlich nur noch ca. 10% (Feys et al., 2005).

Gleichzeitig nimmt die Anfälligkeit sowohl gegenüber *Bgh* als auch *E. pisi* in dieser Reihe zu, kann also zum Teil mit einer Reduktion der Menge an vorhandenem *EDS1*-Protein korreliert werden. Ein komplementäres Beispiel liefert die Mutante *mpk4*: hier geht eine erhöhte Menge an *EDS1* mit verringerter Anfälligkeit gegenüber dem virulenten *Pseudomonas syringae*-Stamm DC3000 einher (Brodersen et al, 2005). Dies deutet insgesamt auf einen Zusammenhang zwischen der Menge des resistenzvermittelnden Proteins *EDS1* und der Anfälligkeit der attackierten Pflanze hin. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Gerste gemacht werden. Die Akkumulation der R-Proteine MLA1 und MLA6 wird dort durch RAR1 kontrolliert. In *rar1*-Mutanten kommt es zu einer

deutlichen Reduktion der Mengen beider Proteine. Im Falle von *MLA6* könnte dies dazu führen, daß die akkumulierte Proteinmenge unter einen hypothetischen Schwellenwert fällt, der zur effizienten Resistenzvermittlung gegenüber *Bgh* mit Avirulenzgen *avrMLA6* notwendig ist (Bieri et al., 2004).

Im vorliegenden Fall nimmt die Anfälligkeit der jeweiligen Mutantenlinien gegenüber *Bgh* und *E. pisi* nimmt jedoch offenbar nicht sprunghaft, sondern graduell mit sinkender *EDS1*-Menge zu. Von einem kritischen Schwellenwert kann daher in diesem Fall nicht ausgegangen werden. Zudem kann die Anfälligkeit auch nicht allein auf die Reduktion der *EDS1*-Proteinmenge zurückgeführt werden, da die getesteten *eds1*-Mutantenkombinationen trotz absoluter Eliminierung des *EDS1*-Proteins gerade in der Interaktion mit *Bgh* deutlich weniger anfällig sind als die entsprechenden *pad4 sag101*-Mutantenlinien, in denen ja noch eine basale Menge an *EDS1*-Protein nachweisbar ist (Feys et al, 2005).

Daher muß eine zusätzliche Funktion von *SAG101* und *PAD4* neben der Stabilisierung von *EDS1* postuliert werden. Für *PAD4* konnte bereits eine Funktion innerhalb eines SA-Signalverstärkungszyklus gezeigt werden. Zum einen ist die SA-Akkumulation nach Pathogeninfektion *PAD4*-abhängig. Im Gegensatz zu Wildtyppflanzen bleibt in *pad4*-Mutanten die Induktion des SA-Signals nach Infektion mit dem *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*-Stamm ES4326 aus (Zhou et al., 1998). Gleichzeitig ist die Transkriptakkumulation von *PAD4* nach SA-Behandlung erhöht (Jirage et al., 1999). Insgesamt spricht dies also für eine gegenseitige positive Rückkoppelung zwischen *PAD4*-Expression und SA-Akkumulation. Posttranskriptionelles *silencing* von *PAD4* in einer *pen2 NahG*-Linie mittels eines zuvor auf seine Effizienz getesteten Vektorkonstruktes<sup>1</sup> führt jedoch zu keiner deutlichen Steigerung der Anfälligkeit gegenüber *E. pisi* (Daten nicht gezeigt). Die

---

<sup>1</sup> getestet und zur Verfügung gestellt von Dr. Christina Neu



kombinierte Eliminierung von *PAD4* und dem SA-Signal hat also in diesem Fall keinen signifikanten Einfluß auf den Infektionsphänotyp.

### **5.5 *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* sind an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion beteiligt**

Nach *Bgh*-Inokulation konnte in *eds1*-mutanten Linien ein verlangsamtes Einsetzen der Zelltodreaktion beobachtet werden, was mit vermehrtem sekundärem Hyphenwachstum einhergeht. Dieser Effekt ist in *sag101*-mutanten Linien weiter verstärkt. In den *pad4 sag101*-Doppelmutanten ist sogar noch 72 *hpi* eine signifikant reduzierte Rate an toten Wirtszellen zu beobachten. Da dieser Effekt jeweils nur teilweise mit der bereits beschriebenen Reduktion der *EDS1*-Proteinmenge korreliert, kann sowohl *EDS1* als auch *PAD4* und *SAG101* eine jeweils individuelle Funktion bei der Vermittlung der Zelltodreaktion zugeschrieben werden. Die jeweiligen Anteile lassen sich jedoch aufgrund der gegenseitigen Stabilisierungen innerhalb der *EDS1*-Komplexe genetisch nur schwer auflösen.

Ob die Vermittlung der Zelltodreaktion direkt oder über nachgeschaltete Faktoren erfolgt, und welche Faktoren möglicherweise daran beteiligt sind, ist jedoch unklar. Die noch ausstehende Auflösung der biochemischen Funktion von *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* könnte hierzu weitere Hinweise liefern.

### **5.6 Komponenten der Pathogenerkennung und Mechanismen der Zelltodvermittlung**

Obwohl die *EDS1*-Komplexe als zentrale Mediatoren der Zelltodreaktion innerhalb der posthaustoriellen Resistenz identifiziert werden konnten, sind sowohl die Mechanismen, über die das Pathogen intrazellulär erkannt wird, als

auch die Mechanismen, über welche die *EDS1*-Komplexe die Zelltodexekution vermitteln, bisher unbekannt.

*EDS1* und *PAD4* wurden ursprünglich durch ihre Rolle innerhalb der Rassenspezifischen Resistenz charakterisiert (Parker et al., 1996; Glazebrook et al., 1997; Falk et al., 1999). R-Gen vermittelte bzw rassenspezifische Erkennungsmechanismen gehen mit einem hohen Selektionsdruck zu permanenter Veränderung (in der Pathogenpopulation) bzw permanenter Anpassung (in der Wirtspopulation) einher, was die Ausprägung von Polymorphismen innerhalb beider Populationen fördert. Auf molekularer Ebene konnte dies beispielhaft für das Avirulenzgen *ATR13* aus *Peronospora parasitica* gezeigt werden. *ATR13* löst in resistenten *Arabidopsis*-Linien *RPP13*-vermittelte Resistenzreaktionen aus. Vergleichende Analysen in verschiedenen Pathogenstämmen weisen darauf hin, daß sich die Vielzahl bekannter Polymorphismen in der Sequenz des Resistenzgens auch in einer hohen Zahl von Polymorphismen in der Aminosäuresequenz des Avirulenzgens widerspiegeln (Allen et al., 2004). Evolutionär distante Pathogene wie *Bgh* und *E. pisi* (vgl. Abbildung 4, Seite 29) dürften somit also auch über stark verschiedene spezifische Merkmale verfügen. Die posthaustorielle Nichtwirtsresistenz gegenüber beiden Pathogenen wird jedoch im wesentlichen über die gleichen Komponenten vermittelt. Daher ist eine Beteiligung rassenspezifischer Mechanismen an der intrazellulären Pathogenerkennung eher unwahrscheinlich.

Naheliegender ist eine Erkennung der Pathogene anhand pathogen-assoziiertes molekularer Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), also molekulare Eigenschaften, die jeweils einer ganzen Gruppe von Pathogenen zueigen sind. Bisher wurden derartige Erkennungsmuster mehrfach für Bakterien sowie Oomyceten beschrieben. Es handelt sich dabei beispielsweise um bestimmte Bereiche des Bakteriengeißel-Proteins Flagellin (*flg-22*), den hochgradig abundanten bakteriellen Elongationsfaktor *EF-Tu*, oder ein extrazelluläres Fragment (*Pep-13*) einer Transglutaminase aus *Phytophthora spec.* (Asai et al., 2002; Brunner et al., 2002; Kunze et al., 2004). In Mehlsaupilzen

wurden bisher keine Abwehr-elicitierten PAMPs identifiziert; aufgrund der allgemein weiten Verbreitung entsprechender Muster und Erkennungsmechanismen (Nurnberger and Brunner, 2002; Nurnberger et al., 2004) ist ihre Existenz jedoch anzunehmen.

Interessanterweise konnte in Expressionsstudien auch eine deutliche Transkriptionsinduktion von *EDS1*, *PAD4* und *SAG101* nach Behandlung mit *flg-22* nachgewiesen werden, die zudem in der *flg22*-rezeptormutanten Linie *fls2-17* ausblieb (Zipfel et al., 2004). Es handelt sich hier also um eine spezifische, PAMP-Rezeptor-vermittelte Reaktion.

Insgesamt kann also angenommen werden, daß PAMPs bzw. PAMP-Rezeptoren an der intrazellulären Erkennung der Nichtwirtspathogene beteiligt sind. Untersuchungen zur Responsivität der isolierten Doppel- und Tripelmutanten gegenüber verschiedenen bekannten PAMP-Elicitoren könnten darüber näheren Aufschluß geben.

Weiterhin unklar ist hingegen, über welche den *EDS1*-Komplexen nachgeschaltete Mechanismen die posthaustorielle Zelltodreaktion vermittelt wird. In vorläufigen Untersuchungen entsprechender transgener und mutanter Linien (vgl. Tabelle 8, Seite 67) konnte bisher keine Beteiligung des in einigen Wirtsinteraktionen nachgewiesenen *BAX*-induzierten Zelltods (Kawai-Yamada et al., 2001; Huckelhoven et al., 2003; Kawai-Yamada et al., 2004) sowie des *PARP*-vermittelten traumatischen Zelltods (Babychuk et al., 1998; Chiarugi and Moskowitz, 2002; Yu et al., 2002) an der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion nachgewiesen werden (V. Lipka, persönliche Mitteilung, und Daten nicht gezeigt).

Alternativ könnte die Zelltodexekution auch über einen *LSD1*-abhängigen Weg erfolgen. *LSD1* wurde bereits detailliert als Regulator u.a. pathogeninduzierter Zelltodreaktionen beschrieben (Dietrich et al., 1997), welche wiederum teilweise durch *EDS1* und *PAD4* reguliert werden (Rusterucci et al., 2001).

Eine phänotypische Analyse von *lsd1*-Mutanten nach Mehltauinokulation wurde jedoch nicht durchgeführt, zumal es sich bei *lsd1* um eine Mutante mit vermehrter Zelltodreaktion handelt. Eine weitere Ausbreitung des Mehltaupilzes ist also in diesem Fall nicht zu erwarten. Eine Mutation im *LSD1*-Antagonisten *LOL1* (Epple et al., 2003) führt jedoch nicht zu einer signifikanten Anfälligkeit gegenüber *E. pisi* (Daten nicht gezeigt). Die Isolierung und Analyse entsprechender Doppelmutantenkombinationen mit *pen2* steht jedoch ebenfalls noch aus.

Zudem könnten auch vergleichende Studien zur Genexpression nach Pathogeninokulation sowie die Analyse zusätzlicher Mutantenkombinationen näheren Aufschluß über die Beteiligung sowie mögliche redundante Funktionen weiterer bekannter pflanzlicher Zelltodregulatoren (beispielsweise Caspase-ähnlicher Proteine; zusammengefaßt in Watanabe & Lam, 2004) in der Vermittlung der posthaustoriellen Zelltodreaktion geben.

Neben den *EDS1*-Komplexen konnte auch für *SGT1* eine Funktion bei der Vermittlung der Zelltodreaktion nachgewiesen werden (vgl. 5.3). Ob diese unabhängig von den *EDS1*-Komplexen abläuft, und inwiefern *SGT1* direkt an der Zelltodexekution beteiligt ist, wurde nicht untersucht. Aufgrund der Assoziation von *SGT1* mit dem Ubiquitin-Ligase-Komplex (Kitagawa et al., 1999; Azevedo et al., 2002) und der damit zusammenhängenden, *RAR1*-unabhängigen Beteiligung an der Degradation regulatorischer Proteine (Liu et al., 2002; Gray et al., 2003), ist es jedoch denkbar, daß direkte Zelltodregulatoren *SGT1*-vermittelt degradiert werden.

Da die Zelltodreaktion allerdings in keinem der untersuchten Fälle vollständig ausgeblieben ist, liegt insgesamt die Vermutung nahe, daß mehrere, teilweise redundante Mechanismen an der Exekution der Zelltodreaktion beteiligt sind. Zudem ist nicht auszuschließen, daß die Zelltodreaktion in Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen teilweise unterschiedlich abläuft. In vergleichenden Untersuchungen mehrerer Wirts- und Nichtwirtsinteraktionen zwischen Rost-

und Mehлтаupilzen und *Vigna unguiculata* bzw. *Phaseolus vulgaris* konnten diverse kinetische und morphologische Unterschiede zwischen Wirts- und Nichtwirts-Zelltodreaktionen beobachtet werden. In *V. unguiculata* dauerte die Exekution des Zelltods vom Aussetzen der cytoplasmatischen Strömung bis zum Kollaps des Protoplasten in der Wirtsinteraktion mit *U. vignae* mehr als doppelt so lange wie in der Nichtwirtsinteraktion mit *E. cichoracearum*. Gleichzeitig wiesen die Nichtwirts-Zelltodreaktionen auch veränderte morphologische Merkmale, wie beispielsweise die durchgängige Assoziation des Zellkerns mit den intrazellulären Pilzstrukturen auf (Christopher-Kozjan & Heath, 2003).

### **5.7 Zwei weitgehend unabhängige Abwehrschichten tragen zur Nichtwirtsresistenz bei**

Die zentrale Bedeutung der *PEN*-Gene bei der Vermittlung der Penetrationsresistenz wurde bereits eingangs diskutiert (vgl. 5.1). Mutationen in einem dieser Gene führen zu deutlich erhöhtem Invasionserfolg von *Bgh*. Allerdings kommt es auch auf Wildtyppflanzen schon zu vergleichsweise seltenen Penetrationsereignissen.

Die Nichtwirtsresistenz bleibt jedoch in allen Fällen trotzdem erhalten, da die weitere pilzliche Entwicklung durch eine posthaustorielle Zelltodreaktion gestoppt wird. Die Beteiligung der *EDS1*-Komplexe an der Vermittlung dieser Zelltodreaktion wurde ebenfalls bereits erläutert (vgl. 5.5).

In keiner der getesteten Linien mit Mutationen in den *EDS1*-Komplexen konnte eine erhöhte Penetrationsanfälligkeit nachgewiesen werden. Das in einigen dieser Linien bereits deutlich ausgeprägte sekundäre Hyphenwachstum ist dementsprechend auf einzelne Interaktionsstellen zurückzuführen, in denen – vergleichbar mit der Frequenz auf Wildtyp-Pflanzen – eine Penetration stattgefunden hat.

Das massive sekundäre Hyphenwachstum von *E. pisi* auf *pen2 pad4* und *pen2 eds1* kann dementsprechend mit einem synergistischen Effekt beider Mutationen erklärt werden. Durch Mutation von *PEN2* wird zunächst die Primärpenetrationsrate erhöht. Die Mutationen in den *EDS1*-Komplexen verursachen sodann ein verlangsamtes Einsetzen der Zelltodreaktion, wodurch die Ausbreitung der Sekundärhyphen begünstigt wird. Sekundärpenetrationen in benachbarten Zellen werden dann wiederum durch die *pen2*-Mutation erleichtert. Insgesamt führt dies also dazu, daß sich die jeweilige Pilzkolonie schneller über die Blattoberfläche ausbreitet, als die Zelltodreaktion folgen kann. Die Zelltodreaktion folgt den sich ausbreitenden Sekundärhyphen verlangsamt – ein Phänomen, das im Falle der Interaktion von *eds1*- und *pad4*-mutanten Linien mit *P. parasitica* bereits als nachfolgende Nekrosenbildung („trailing necrosis“; Parker et al., 1996; Glazebrook et al., 1997) beschrieben wurde.

Bemerkenswerterweise konnte selbst für die Doppelmutante *pad4 sag101* keine signifikant erhöhte Penetrationsanfälligkeit gegenüber *Bgh* festgestellt werden. Auch hier sind somit die Interaktionsstellen, die Sporulation von *Bgh* erlauben, auf Penetrationsereignisse in Wildtyp-Frequenz zurückzuführen. Für die Tripelmutantenlinie *pen2 pad4 sag101* steht eine detaillierte phänotypische Analyse derzeit noch aus. Vorläufige Ergebnisse weisen allerdings auf eine weitere Verstärkung der Infektionsphänotypen hin. So ist beispielsweise die Anzahl mehrfach verzweigter *Bgh*-Kolonien in der Tripelmutante im Vergleich zur *pad4 sag101*-Doppelmutante ungefähr verdoppelt (Daten nicht gezeigt). Auch hier bleibt jedoch das sekundäre Hyphenwachstum von *Bgh* weiterhin hinter dem von *E. pisi* zurück. Ein limitierender Faktor könnte dabei die geringe Größe der *Arabidopsis*-Epidermiszellen sein, welche die Ausprägung der vergleichsweise großen reifen *Bgh*-Haustorien erschwert (vgl. Abbildung 16, Seite 86). Ob die Größe der *Arabidopsis*-Epidermiszellen tatsächlich einen limitierenden Faktor für die Ausbreitung von *Bgh* darstellt, könnte beispielsweise durch parallele Erfassung von Zellgröße und *Bgh*-Koloniegröße überprüft werden. Die Isolierung und Analyse einer *pen1 pad4 sag101*-Tripelmutante ist derzeit ebenfalls in Bearbeitung.

Das auf allen getesteten Mutantenkombinationen durchgehend stärkere sekundäre Hyphenwachstum von *E. pisi* könnte zudem auch in der Wirkung spezifischer Effektorproteine begründet sein. Aufgrund der nahen physiologischen Verwandtschaft von *E. pisi* zu dem *Arabidopsis*-pathogenen Mehltaupilz *Erysiphe cruciferarum* (vgl. Abbildung 4, Seite 29) wäre es denkbar, daß einige Effektorproteine aus *E. pisi* auch eine virulenzvermittelnde Wirkung in *Arabidopsis* haben. Für *Bgh* wäre dies aufgrund der großen evolutionären Distanz hingegen nicht zu erwarten. Dies ließe sich experimentell beispielsweise durch Behandlung von *Arabidopsis* mit *E. pisi*-Proteinextrakten vor Inokulation mit *Bgh* überprüfen. In diesem Fall könnten potenziell wirksame *E. pisi*-Effektorproteine auch zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Bgh* führen.

Insgesamt wiesen bisher alle getesteten Mutantenkombinationen aus *pen1/pen2/pen3* und *eds1/pad4/sag101* einen additiven bis synergistischen Effekt auf die Ausprägung der *Bgh*- und *E. pisi*-Infektionsphänotypen auf. Dies spricht für die Existenz von zwei weitgehend genetisch unabhängigen und räumlich getrennten Resistenzschichten, der Penetrationsresistenz und der posthaustoriellen Resistenz, die an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz beteiligt sind. In diesem Modell wirken *PEN1*, *PEN2* und *PEN3* an der Zelloberfläche als Hauptelemente der Penetrationsresistenz, wohingegen in der posthaustoriellen Resistenz den cytoplasmatisch und nuklear lokalisierten *EDS1*-Komplexen eine zentrale Bedeutung zukommt. Die Existenz zweier unabhängiger Resistenzschichten sowie die Tatsache, daß in allen getesteten Fällen zur Überwindung der Nichtwirtsresistenz immer mindestens zwei Resistenzkomponenten eliminiert werden mußten, liefert eine mögliche Erklärung für die Stabilität der Nichtwirtsresistenz in der Natur.

Die Beteiligung weiterer Faktoren ist jedoch anzunehmen; die Analyse der im Rahmen von Kooperationen innerhalb dieser Arbeit analysierten Doppelmutantenlinien (vgl. Tabelle 8, Seite 67) liefert dazu erste Hinweise. Durch kombinierte Mutation von *PEN2* und *PAD3*, einer zur Camalexinbiosynthese notwendigen Cytochrom P450-Monooxygenase (Zhou et

al., 1999), kommt es beispielsweise zu erhöhtem sekundärem Hyphenwachstum von *E. pisi*. Die Ausprägung bleibt jedoch hinter der beispielsweise auf *pen2 pad4*-Doppelmutanten beobachteten Intensität deutlich zurück. In *pad3*-Einzelmutanten sowie in der Interaktion der Doppelmutante mit *Bgh* konnte dieser Effekt zudem nicht bzw. nur als Tendenz beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). *PAD3* kann somit lediglich eine geringfügige Rolle in der Vermittlung der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi* zugeschrieben werden. Da nicht alle getesteten Phytoalexin-defizienten Mutantenlinien einen veränderten Infektionsphänotyp mit *Bgh* oder *E. pisi* aufweisen, ist dies vermutlich nicht unmittelbar auf den Verlust der Camalexin-Biosynthesefähigkeit, sondern –analog zu *PAD4*- eher auf eine regulatorische Funktion von *PAD3* innerhalb pflanzlicher Resistenzreaktionen zurückzuführen.

Während Mutationen in Komponenten des Ethylensignalwegs in den bisher getesteten Fällen zu keiner signifikanten Beeinträchtigung führten, konnte zudem für eine Komponente des Jasmonat-Signalwegs eine Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegenüber *E. pisi* nachgewiesen werden. In der Doppelmutante *pen3 jar1* kommt es zu signifikant verstärktem sekundärem Hyphenwachstum von *E. pisi*. Die Ausbildung eines dichten Myzels sowie Sporulation konnten jedoch auch auf dieser Linie nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Die Isolierung weiterer Kombinationen mit Mutanten des Jasmonatsignalwegs ist derzeit in Bearbeitung. Aufgrund von Genexpressionsstudien, die eine Beteiligung des Jasmonatsignalwegs an der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz gegenüber biotrophen Mehltaupilzen nahelegen (Zimmerli et al., 2004), ist anzunehmen, daß auf diesem Wege noch weitere regulatorische Komponenten der Nichtwirtsresistenz identifiziert werden können.



## 5.8 Die Mutantensichtung liefert weitere putative Mediatoren der Nichtwirtsresistenz

Die Musterung einer remutagenisierten *pen2-1* M2-Population lieferte weitere putative Mutanten mit veränderter Nichtwirtsresistenz. Es ist allerdings zunächst wahrscheinlich, daß Mutationen, die bereits im zuvor beschriebenen, parallel dazu ausgeführten Teil der Arbeit einen Effekt gezeigt haben, auch in der Musterungspopulation enthalten sind.

Zusätzlich dazu wurden auch in anderen Untersuchungen weitere Elemente der Nichtwirtsresistenz beschrieben. So sind beispielsweise Wund- und SA-induzierte Proteinkinasen an der Nichtwirtsresistenz von Tabak (*Nicotiana benthamiana*) gegenüber *Pseudomonas cichorii* beteiligt (Sharma et al., 2003). Im gleichen System konnte eine Funktion der Chaperone *HSP70* und *HSP90* innerhalb der Nichtwirtsresistenz nachgewiesen werden (Kanzaki et al., 2003). Bei einer Musterung nach Mutanten mit Beeinträchtigung in der Nichtwirtsresistenz wurde zudem *nho1* identifiziert. Das entsprechende Wildtyp-Gen codiert für eine Glycerolkinase, deren Mutation zur Anfälligkeit gegenüber verschiedenen bakteriellen und pilzlichen Erregern führt (Lu et al., 2001; Kang et al., 2003).

In anderen Systemen konnten somit also ebenfalls bereits mehrere Elemente der Nichtwirtsresistenz identifiziert werden. Daher liegt die Vermutung nahe, daß auch in der Nichtwirtsinteraktion von *Arabidopsis* und Mehлтаupilzen noch eine größere Anzahl weiterer feinregulierender Komponenten beteiligt sind.

Als erste der in der Musterungspopulation isolierten Doppelmutanten wurde *pen2 dit1* näher analysiert, welche verstärktes sekundäres Hyphenwachstum von *Bgh* und *E. pisi* zuläßt. Dies geht jedoch zumindest in der Interaktion mit *Bgh* nicht mit einer erhöhten Invasionsanfälligkeit einher, was eine Funktion von *DIT1* innerhalb der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz nahelegt. Vermehrtes

sekundäres Hyphenwachstum von *E. pisi* konnte bereits in einer *dit1*-Einzelmutante beobachtet werden, und ist in der Doppelmutante *pen2 dit1* noch weiter verstärkt. Innerhalb des bereits diskutierten Modells zweier unabhängiger Resistenzschichten kann *DIT1* somit also eine Rolle innerhalb der posthaustoriellen Nichtwirtsresistenz zugeordnet werden.

Die Klonierung von *DIT1* steht derzeit noch aus, allerdings konnte die Lage der Mutation bereits auf ein Zielintervall von 2.17 Mb (entsprechend 516 annotierter Gene) auf dem unteren Arm von Chromosom III eingeschränkt werden. Einige Kandidatengene in diesem Zielintervall werden aufgrund ihrer bekannten Relevanz in Resistenzmechanismen derzeit jedoch bereits durch Sequenzanalyse näher untersucht.

Dazu zählt beispielsweise das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Calmodulin-9. Calmodulin ist an zahlreichen regulatorischen Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt. In Pflanze-Pathogen-Interaktionen wurde es beispielsweise als Interaktor von *MLO* beschrieben (Kim et al., 2002).

Ein weiterer Kandidat ist *SYPI22*, das nächsthomologe Protein zu *PEN1*. Nach Behandlung mit Flagellin, einem PAMP-Elicitor (vgl. 5.6), wird *SYPI22* phosphoryliert (Nuhse et al., 2003). Zudem wird die Transkription von *SYPI22* nach Behandlung mit verschiedenen Wirts- und Nichtwirtspathogenen stark hochreguliert, und das Protein akkumuliert ebenso wie *PEN1* fokal unterhalb pilzlicher Penetrationsversuche (Assaad et al., 2004). Eine Funktion von *SYPI22* bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz ist also zunächst naheliegend. Phänotypische Effekte einer *syp122*-Mutation konnten bisher jedoch nur im *pen1*-mutanten Hintergrund beobachtet werden (Assaad et al., 2004; C. Neu, persönliche Mitteilung). Dies läßt wiederum auf hohe genetische Redundanz zwischen *PEN1* und *SYPI22* schließen.

Schließlich findet sich auch ein ein R-Gen der *CC-NB-LRR*-Klasse im Zielintervall. Eine Beteiligung rassenspezifischer Resistenzmechanismen ist

jedoch aus bereits erläuterten Gründen (vgl. 5.6) eher unwahrscheinlich. Zudem ist auch bekannt, daß R-Gene der *CC-NB-LRR*-Klasse in der Regel auf *NDR1* als Signalkomponente angewiesen sind (Aarts et al., 1998). Bei Mutation von *ndr1* konnte jedoch bereits in der vorangegangenen Mutantanalyse kein signifikanter Effekt auf die Ausprägung der Infektionsphänotypen beobachtet werden. Somit ist selbst eine unspezifischere Funktion des betreffenden R-Gens bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz eher unwahrscheinlich.

Zur Charakterisierung von *DIT1* sind die weitere Eingrenzung des Zielintervalls sowie die Sequenzanalyse verbleibender Kandidatengene derzeit in Bearbeitung. Anschließend können Komplementationsanalysen sowie die phänotypische Charakterisierung weiterer mutanter Allele (z.B. T-DNA-Insertionsmutanten) endgültigen Aufschluß über die Identität von *DIT1* geben.

## **5.9 Funktionelles Modell der Nichtwirtsresistenz gegenüber Mehltäupilzen in *Arabidopsis***

Abschließend sind die Komponenten, denen im Rahmen dieser Arbeit eine Funktion innerhalb der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegenüber Mehltäupilzen zugeschrieben werden konnte, in einem funktionellen Modell zusammengefaßt (siehe Abbildung 20, Seite 122). Dieses Modell weist naturgemäß Lücken auf; es sind beispielsweise nicht alle Komponenten miteinbezogen, denen in anderen Studien bereits eine Funktion bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz in anderen Pflanze-Pathogen-Systemen zugeschrieben werden konnte. Auch die Identität und Funktion der durch die Mutantensichtung charakterisierten Faktoren ist derzeit noch unbekannt. Zudem sind insbesondere intrazelluläre Erkennungsmechanismen sowie Mechanismen zur Vermittlung des Zelltodes noch unklar (vgl. 5.6).

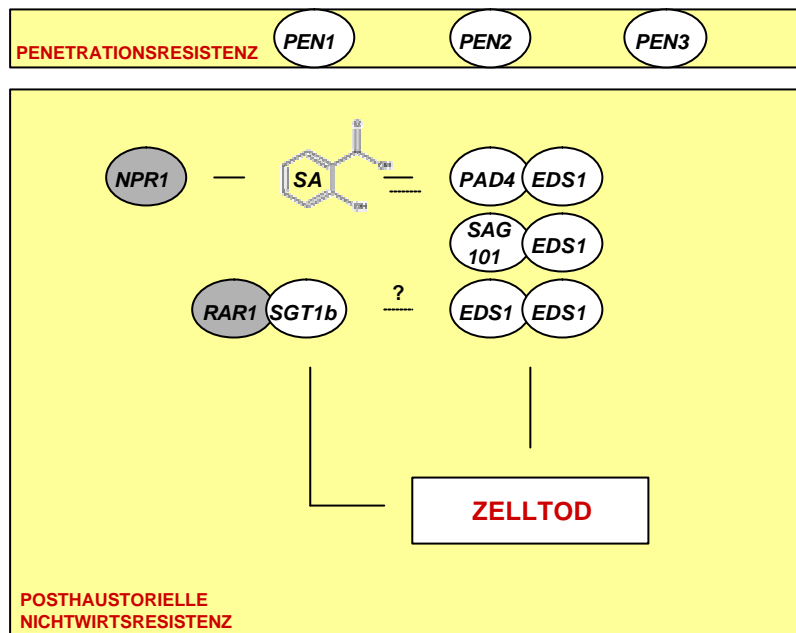
Da jedoch zentrale Komponenten beschrieben und zueinander in Bezug gesetzt sind, deren Ausschaltung bereits eine vollständige Brechung der

---

Nichtwirtsresistenz zur Folge hat, kann dieses Modell als Grundlage für die weitere Detailanalyse dienen.

Aufgrund der zahlreichen vorhandenen Schnittmengen zwischen Nichtwirts-, Basaler und Rassenspezifischer Resistenz scheint sich somit ein bereits 2001 formulierter Ausblick zu bestätigen:

„Thus, all forms of plant disease resistance may be part of a complex and seamless web of plant-pathogen interactions that defy man-made boundaries and definitions” (Heath 2001).



**Abbildung 20: Zusammenfassendes Modell der Nichtwirtsresistenz gegenüber Mehlaupilzen in *Arabidopsis thaliana***

Die Nichtwirtsresistenz wird durch mindestens zwei weitgehend unabhängige Resistenzschichten vermittelt. *PEN1*, *PEN2* und *PEN3* sind entscheidende Komponenten der Penetrationsresistenz. Diese ist jedoch nicht absolut, da selbst auf Wildtyp-Pflanzen ein geringer Anteil der Penetrationsversuche erfolgreich ist. Bei Überwindung oder Mutation der Penetrationsresistenz wird die Nichtwirtsresistenz von der "darunterliegenden" Resistenzschicht (Posthaustorielle Nichtwirtsresistenz) vermittelt. In dieser Schicht spielen *EDS1* und dessen Interaktionspartner *PAD4* und *SAG101* eine zentrale Rolle. Mutationen in mindestens zwei dieser Komponenten reichen aus, um die Nichtwirtsresistenz gegenüber *E.pisi* und *Bgh* zu brechen. Entscheidend dabei könnte die Induktion des Zelltods der attackierten Zelle sein. Ob dies direkt über die *EDS1*-Komplexe geschieht, oder ob noch weitere, nachgeschaltete Elemente an der Zelltodexekution beteiligt sind, ist derzeit noch unklar. *SGT1b* hat ebenfalls eine Funktion innerhalb der Zelltodvermittlung. Auch hier ist allerdings nicht geklärt, ob *SGT1b* individuell oder abhängig von den *EDS1*-Komplexen an der Zelltodexekution beteiligt ist. Der durch *PAD4* verstärkte Salicylsäure(SA)-abhängige Signalweg spielt offenbar nur eine untergeordnete Rolle bei der Vermittlung der Nichtwirtsresistenz.

**LITERATURVERZEICHNIS**

**Aarts, N., Metz, M., Holub, E., Staskawicz, B.J., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1998). Different requirements for EDS1 and NDR1 by disease resistance genes define at least two R gene-mediated signaling pathways in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10306-10311.

**Abramovitch, R.B., Kim, Y.J., Chen, S., Dickman, M.B., and Martin, G.B.** (2003). Pseudomonas type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death. *Embo J* **22**, 60-69.

**Adam, L., and Somerville, S.C.** (1996). Genetic characterization of five powdery mildew disease resistance loci in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **9**, 341-356.

**Alfano, J.R., and Collmer, A.** (2004). Type III secretion system effector proteins: double agents in bacterial disease and plant defense. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 385-414.

**Allen, R.L., Bittner-Eddy, P.D., Grenville-Briggs, L.J., Meitz, J.C., Rehmany, A.P., Rose, L.E., and Beynon, J.L.** (2004). Host-parasite coevolutionary conflict between Arabidopsis and downy mildew. *Science* **306**, 1957-1960.

**Altschul, S.F., Madden, T.I., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

**Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M., and Sheen, J.** (2002). MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.

**Assaad, F.F., Qu, J.L., Youngs, H., Ehrhardt, D., Zimmerli, L., Kalde, M., Wanner, G., Peck, S.C., Edwards, H., Ramonell, K., Somerville, C.R., and Thordal-Christensen, H.** (2004). The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae. *Mol Biol Cell* **15**, 5118-5129.

**Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D., and Parker, J.E.** (2002). Regulatory role of SGT1 in early R gene-mediated plant defenses. *Science* **295**, 2077-2080.

**Axtell, M.J., and Staskawicz, B.J.** (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* **112**, 369-377.

**Azevedo, C., Sadanandom, A., Kitagawa, K., Freialdenhoven, A., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2002). The RAR1 interactor SGT1, an essential component of R gene-triggered disease resistance. *Science* **295**, 2073-2076.

**Babiychuk, E., Cottrill, P.B., Storozhenko, S., Fuangthong, M., Chen, Y., O'Farrell, M.K., Van Montagu, M., Inze, D., and Kushnir, S.** (1998). Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J* **15**, 635-645.

**Bailey, N.T.** (1992) *Statistical Methods in Biology*, 2<sup>nd</sup> Edition, Cambridge Univ. Press

**Bais, H.P., Prithiviraj, B., Jha, A.K., Ausubel, F.M., and Vivanco, J.M.** (2005). Mediation of pathogen resistance by exudation of antimicrobials from roots. *Nature* **434**, 217-221.

**Benson, G.** (1999). Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **27**, 573-580.

**Bhat, R.A., Miklis, M., Schmelzer, E., Schulze-Lefert, P., and Panstruga, R.** (2005). Recruitment and interaction dynamics of plant penetration resistance components in a plasma membrane microdomain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3135-3140.

**Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbiss, H.H., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2004). RAR1 positively controls steady state levels of barley MLA resistance proteins and enables sufficient MLA6 accumulation for effective resistance. *Plant Cell* **16**, 3480-3495.

**Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H** (1988) Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **241**, 1086-1089.

**Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., and Scheller, R.H.** (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* **409**, 839-841.

**Boller, T.** (2005). Peptide signalling in plant development and self/non-self perception. *Curr Opin Cell Biol* **17**, 116-122.

**Bouarab, K., Melton, R., Peart, J., Baulcombe, D., and Osbourn, A.** (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* **418**, 889-892.

**Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J., and Shin, H.-D.** (2002). The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: *The Powdery Mildews* (Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. Eds), APS Press, St. Paul, Minnesota, 13-55.

**Brodersen, P., Petersen, M., Nielsen, H.B., Zhu, S., Newman, M.A., Shokat, K.M., Parker, J., Nemhauser, J., Chory, J., and Mundy, J.** (2005). EDS1 and PAD4 mediate salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent defense responses regulated by MAP kinase 4 activity; submitted.

**Brunner, F., Rosahl, S., Lee, J., Rudd, J.J., Geiler, C., Kauppinen, S., Rasmussen, G., Scheel, D., and Nurnberger, T.** (2002). Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases. *Embo J* **21**, 6681-6688.

**Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F., and Schulze-Lefert, P.** (1997). The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* **88**, 695-705.

**Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S., and Dong, X.** (1994). Characterization of an Arabidopsis Mutant That Is Nonresponsive to Inducers of Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **6**, 1583-1592.

**Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S., and Dong, X.** (1997). The Arabidopsis NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell* **88**, 57-63.

**Century, K.S., Holub, E.B., and Staskawicz, B.J.** (1995). NDR1, a locus of Arabidopsis thaliana that is required for disease resistance to both a bacterial and a fungal pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6597-6601.

**Century, K.S., Shapiro, A.D., Repetti, P.P., Dahlbeck, D., Holub, E., and Staskawicz, B.J.** (1997). NDR1, a pathogen-induced component required for Arabidopsis disease resistance. *Science* **278**, 1963-1965.

**Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M.** (1993). Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* **262**, 539-544.

**Chiarugi, A., and Moskowitz, M.A.** (2002). Cell biology. PARP-1--a perpetrator of apoptotic cell death? *Science* **297**, 200-201.



**Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-159.

**Christopher-Kozjan, R., and Heath, M.C.** (2003). Cytological and pharmacological evidence that biotrophic fungi trigger different cell death execution processes in host and nonhost cells during the hypersensitive response. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 265-275.

**Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735-743.

**Coaker, G., Falick, A., and Staskawicz, B.** (2005). Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eucaryotic Cyclophilin. *Science* **308**, 548-550.

**Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C., and Schulze-Lefert, P.** (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**, 973-977.

**Consonni, C.** (2004). The function of MLO, a negative regulator of defence, is conserved in monocot and dicot plants. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität zu Köln, 2004.

**Dangl, J.L., and Jones, J.D.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.

**Delaney, T.P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J.** (1994). A Central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. *Science* **266**, 1247-1250.

**Devoto, A., Muskett, P.R., and Shirasu, K.** (2003). Role of ubiquitination in the regulation of plant defence against pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 307-311.

**Dewdney, J., Reuber, T.L., Wildermuth, M.C., Devoto, A., Cui, J., Stutius, L.M., Drummond, E.P., and Ausubel, F.M.** (2000). Three unique mutants of *Arabidopsis* identify eds loci required for limiting growth of a biotrophic fungal pathogen. *Plant J* **24**, 205-218.

**Dietrich, R.A., Richberg, M.H., Schmidt, R., Dean, C., and Dangl, J.L.** (1997). A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell* **88**, 685-694.

**Dixon, R.A.** (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature* **411**, 843-847.

**Donofrio, N.M., and Delaney, T.P.** (2001). Abnormal callose response phenotype and hypersusceptibility to *Peronospora parasitica* in defence-compromised *Arabidopsis* *nim1-1* and salicylate hydroxylase-expressing plants. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 439-450.

**Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.

**Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**, 1349.

**Epple, P., Mack, A.A., Morris, V.R., and Dangl, J.L.** (2003). Antagonistic control of oxidative stress-induced cell death in *Arabidopsis* by two related, plant-specific zinc finger proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6831-6836.

**Esquerré-Tugayé, M.-T., Boudart, G., and Dumas, B.** (2000). Cell wall degrading enzymes, inhibitory proteins, and oligosaccharides participate in the molecular dialogue between plants and pathogens. *Plant Physiology and Biochemistry* **38**, 157-163.

**Eulgem, T.** (2005). Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci* **10**, 71-78.

**Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D., Daniels, M.J., and Parker, J.E.** (1999). EDS1, an essential component of R gene-mediated disease resistance in *Arabidopsis* has homology to eukaryotic lipases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3292-3297.

**Fan, W., and Dong, X.** (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 1377-1389.

**Feldmann, K.A.** (1992) T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis* seed infection / transformation. In: *Methods in Arabidopsis Research* (Koncz, C., Chua, N.-H., and Schell, J. Eds.) World Scientific publishing, Singapore, 1992.

**Feys, B.J., Moisan, L.J., Newman, M.A., and Parker, J.E.** (2001). Direct interaction between the *Arabidopsis* disease resistance signaling proteins, EDS1 and PAD4. *Embo J* **20**, 5400-5411.

**Feys, B., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.A., Medina-Escobar, N., Neu, C., da Cruz-Cabral, A., and Parker, J.E.** (2005). Arabidopsis SAG101 stabilizes and signals within an EDS1 complex in plant innate immunity; submitted.

**Flor, H.H.** (1954). The Genetics of Host-Parasite Interaction in Flax Rust. *Phytopathology* **44**, 488-488.

**Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F., and Schulze-Lefert, P.** (1996). Identification of Genes Required for the Function of Non-Race-Specific mlo Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* **8**, 5-14.

**Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H., and Schulze-Lefert, P.** (1994). Nar-1 and Nar-2, Two Loci Required for Mla12-Specified Race-Specific Resistance to Powdery Mildew in Barley. *Plant Cell* **6**, 983-994.

**Freialdenhoven A, Orme J, Lahaye T, and Schulze-Lefert, P.** (2005). Barley Rom1 reveals a potential link between race-specific and nonhost resistance responses to powdery mildew fungi. *Molecular Plant Microbe Interactions* **18**, 291-299.

**Frye, C.A., and Innes, R.W.** (1998). An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**, 947-956.

**Frye, C.A., Tang, D., and Innes, R.W.** (2001). Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 373-378.

**Gjetting, T., Carver, T.L., Skot, L., and Lyngkjaer, M.F.** (2004). Differential gene expression in individual papilla-resistant and powdery mildew-infected barley epidermal cells. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 729-738.

**Glazebrook, J.** (2001). Genes controlling expression of defense responses in Arabidopsis-2001 status. *Curr Opin Plant Biol* **4**, 301-308.

**Glazebrook, J., and Ausubel, F.M.** (1994). Isolation of phytoalexin-deficient mutants of Arabidopsis thaliana and characterization of their interactions with bacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 8955-8959.

**Glazebrook, J., Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1996). Isolation of Arabidopsis mutants with enhanced disease susceptibility by direct screening. *Genetics* **143**, 973-982.

**Glazebrook, J., Zook, M., Mert, F., Kagan, I., Rogers, E.E., Crute, I.R., Holub, E.B., Hammerschmidt, R., and Ausubel, F.M.** (1997). Phytoalexin-deficient mutants of *Arabidopsis* reveal that PAD4 encodes a regulatory factor and that four PAD genes contribute to downy mildew resistance. *Genetics* **146**, 381-392.

**Gomez-Gomez, L., and Boller, T.** (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell* **5**, 1003-1011.

**Gray, W.M., Muskett, P.R., Chuang, H.W., and Parker, J.E.** (2003). *Arabidopsis* SGT1b is required for SCF(TIR1)-mediated auxin response. *Plant Cell* **15**, 1310-1319.

**Green, J.R., Carver, T.L.W., and Gurr, S.J.** (2002). The formation and function of infection structures. In: *The Powdery Mildews* (Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. Eds), APS Press, St. Paul, Minnesota, 66-82.

**Gupta, V., Willits, M.G., and Glazebrook, J.** (2000). *Arabidopsis thaliana* EDS4 contributes to salicylic acid (SA)-dependent expression of defense responses: evidence for inhibition of jasmonic acid signaling by SA. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 503-511.

**Guzman, P., and Ecker, J.R.** (1990). Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* **2**, 513-523.

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

**Hammond-Kosack, K., and Jones, J.D.G** (2000). "Responses to Plant Pathogens". In: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (Buchanan, B., Gruissem, W., and Jones, R. Eds.), American Society of Plant Physiologists, Rockville, 1113-1156.

**Hammond-Kosack, K.E., and Parker, J.E.** (2003). Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 177-193.

**He, Y., and Gan, S.** (2002). A gene encoding an acyl hydrolase is involved in leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**, 805-815.

**Heath, M.** (2001). Non-host resistance to plant pathogens: nonspecific defense or the result of specific recognition events? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **58**, 53-54.

**Holub, E.B.** (2001). The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nat Rev Genet* **2**, 516-527.

**Hubert, D.A., Tornero, P., Belkhadir, Y., Krishna, P., Takahashi, A., Shirasu, K., and Dangl, J.L.** (2003). Cytosolic HSP90 associates with and modulates the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *Embo J* **22**, 5679-5689.

**Huckelhoven, R., Dechert, C., and Kogel, K.H.** (2003). Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 5555-5560.

**Huitema, E., Vleeshouwers, V.G.A.A, Francis, D., and Kamoun, S.** (2003). Active defence responses associated with non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to the oomycete pathogen *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 487-500.

**Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefert, P., and Fincher, G.B.** (2003). An *Arabidopsis* Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *Plant Cell* **15**, 2503-2513.

**Jirage, D., Tootle, T.L., Reuber, T.L., Frost, L.N., Feys, B.J., Parker, J.E., Ausubel, F.M., and Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis thaliana* PAD4 encodes a lipase-like gene that is important for salicylic acid signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13583-13588.

**Jones, D.A., Thomas, C.M., Hammond-Kosack, K.E., Balint-Kurti, P.J., and Jones, J.D.** (1994). Isolation of the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* **266**, 789-793.

**Jorgensen, J.H., and Mortensen, K.** (1977). Primary infection by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei* of barley mutants with resistance genes in ML-O locus. *Phytopathology* **67**, 678-685.

**Kang, L., Li, J., Zhao, T., Xiao, F., Tang, X., Thilmony, R., He, S., and Zhou, J.M.** (2003). Interplay of the *Arabidopsis* nonhost resistance gene NHO1 with bacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3519-3524.

**Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R.** (2003). Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana* *Molecular Plant Pathology* **4**, 383-391.

**Kawai-Yamada, M., Jin, L., Yoshinaga, K., Hirata, A., and Uchimiya, H.** (2001). Mammalian Bax-induced plant cell death can be down-regulated by overexpression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 (AtBI-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12295-12300.

**Kim, M.C., Panstruga, R., Elliott, C., Muller, J., Devoto, A., Yoon, H.W., Park, H.C., Cho, M.J., and Schulze-Lefert, P.** (2002). Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature* **416**, 447-451.

**Kitagawa, K., Skowrya, D., Elledge, S.J., Harper, J.W., and Hieter, P.** (1999). SGT1 encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol Cell* **4**, 21-33.

**Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., and Kunoh, H.** (1997a). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *Plant Journal* **11**, 525-537.

**Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I., and Kunoh, H.** (1997b). Actin Microfilaments are Required for the Expression of Nonhost Resistance in Higher Plants. *Plant Cell Physiol.* **38**, 725-733.

**Kobayashi, I., and Hakuno, H.** (2003). Actin-related defense mechanism to reject penetration attempt by a non-pathogen is maintained in tobacco BY-2 cells. *Planta* **217**, 340-345.

**Kumar, D., and Klessig, D.F.** (2003). High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 16101-16106.

**Kunkel, B.N., and Brooks, D.M.** (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 325-331.

**Kunze, G., Zipfel, C., Robatzek, S., Niehaus, K., Boller, T., and Felix, G.** (2004). The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants. *Plant Cell* **16**, 3496-3507.

**Lamb, C., and Dixon, R.A.** (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**, 251-275.

**Lincoln, J.E., Richael, C., Overduin, B., Smith, K., Bostock, R., and Gilchrist, D.G.** (2002). Expression of the antiapoptotic baculovirus p35 gene in tomato blocks programmed cell death and provides broad-spectrum resistance to disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15217-15221.

**Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.W., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002). Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to Tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1483-1496.

**Lu, M., Tang, X., and Zhou, J.M.** (2001). Arabidopsis NHO1 is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *Plant Cell* **13**, 437-447.

**Lukowitz, W., Gillmor, C.S., and Scheible, W.R.** (2000). Positional cloning in Arabidopsis. Why it feels good to have a genome initiative working for you. *Plant Physiol* **123**, 795-805.

**Mackey, D., Holt, B.F., Wiig, A., and Dangl, J.L.** (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-754.

**Mackey, D., Belkhadir, Y., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Dangl, J.L.** (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell* **112**, 379-389.

**Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, U., Muller-Rober, B., and Schulz, B.** (2002). Multifunctionality of plant ABC transporters--more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345-355.

**Mattson, M.P., and Chan, S.L.** (2003). Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* **5**, 1041-1043.

**McDowell, J.M., and Woffenden, B.J.** (2003). Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications. *Trends Biotechnol* **21**, 178-183.

**McDowell, J.M., Cuzick, A., Can, C., Beynon, J., Dangl, J.L., and Holub, E.B.** (2000). Downy mildew (*Peronospora parasitica*) resistance genes in Arabidopsis vary in functional requirements for NDR1, EDS1, NPR1 and salicylic acid accumulation. *Plant J* **22**, 523-529.

**Mellersh, D.G., and Heath, M.C.** (2003). An investigation into the involvement of defense signaling pathways in components of the nonhost resistance of Arabidopsis thaliana to rust fungi also reveals a model system for studying rust fungal compatibility. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 398-404.

**Mellersh, D.G., Foulds, I.V., Higgins, V.J., and Heath, M.C.** (2002). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plays different roles in determining penetration failure in three diverse plant-fungal interactions. *Plant J* **29**, 257-268.

**Mendgen, K., and Hahn, M.** (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. *Trends Plant Sci* **7**, 352-356.

**Meyers, B.C., Kaushik, S., and Nandety, R.S.** (2005). Evolving disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 129-134.

**Michaels, S.D., and Amasino, R.M.** (1998). A robust method for detecting single-nucleotide changes as polymorphic markers by PCR. *Plant J* **14**, 381-385.

**Mou, Z., Fan, W., and Dong, X.** (2003). Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* **113**, 935-944.

**Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D., and Parker, J.E.** (2002). Arabidopsis RAR1 exerts rate-limiting control of R gene-mediated defenses against multiple pathogens. *Plant Cell* **14**, 979-992.

**Mysore, K.S., and Ryu, C.M.** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* **9**, 97-104.

**Nawrath, C., and Metraux, J.P.** (1999). Salicylic acid induction-deficient mutants of Arabidopsis express PR-2 and PR-5 and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation. *Plant Cell* **11**, 1393-1404.

**Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N., and Metraux, J.P.** (2002). EDS5, an essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in Arabidopsis, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* **14**, 275-286.

**Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., and Pepper, A.E.** (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *Plant J* **14**, 387-392.

**Niki, T., Mitsuhashi, I., Seo, S., Ohtsubo, N., and Ohashi, Y.** (1998). Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. *Plant and Cell Physiology* **39**, 500-507.

**Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H., and Somerville, S.C.** (2003). Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science* **301**, 969-972.

**Nuhse, T.S., Boller, T., and Peck, S.C.** (2003). A plasma membrane syntaxin is phosphorylated in response to the bacterial elicitor flagellin. *J Biol Chem* **278**, 45248-45254.

**Nurnberger, T., and Brunner, F.** (2002). Innate immunity in plants and animals: emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 318-324.



**Nurnberger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunol Rev* **198**, 249-266.

**Olesen, K.L., Carver, T.L.W., and Lyngkjaer, M.F.** (2003). Fungal suppression of resistance against inappropriate *Blumeria graminis formae speciales* in barley, oat and wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **62**, 37-50.

**Oliver, R.P., and Ipcho, S.V.S.** (2004). Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology* **5**, 347-352.

**Opalski, K.S., Schultheiss, H., Kogel, K.H., and Huckelhoven, R.** (2005). The receptor-like MLO protein and the RAC/ROP family G-protein RACB modulate actin reorganization in barley attacked by the biotrophic powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Plant J* **41**, 291-303.

**Panstruga, R.** (2003). Establishing compatibility between plants and obligate biotrophic pathogens. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 320-326.

**Parker, J.E., Holub, E.B., Frost, L.N., Falk, A., Gunn, N.D., and Daniels, M.J.** (1996). Characterization of *eds1*, a mutation in *Arabidopsis* suppressing resistance to *Peronospora parasitica* specified by several different RPP genes. *Plant Cell* **8**, 2033-2046.

**Peart, J.R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D.C., Schausser, L., Jaggard, D.A., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D., Shirasu, K., and Baulcombe, D.C.** (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10865-10869.

**Peterhansel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R., and Schulze-Lefert, P.** (1997). Interaction Analyses of Genes Required for Resistance Responses to Powdery Mildew in Barley Reveal Distinct Pathways Leading to Leaf Cell Death. *Plant Cell* **9**, 1397-1409.

**Pratelli, R., Sutter, J.U., and Blatt, M.R.** (2004). A new catch in the SNARE. *Trends Plant Sci* **9**, 187-195.

**Pryce-Jones, E., Carver, T., and Gurr, S.J.** (1999). The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 175-182.

**Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E., Wood, W., and Ausubel, F.M.** (1998). Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants. *Plant J* **16**, 473-485.

**Rogers, E.E., and Ausubel, F.M.** (1997). Arabidopsis enhanced disease susceptibility mutants exhibit enhanced susceptibility to several bacterial pathogens and alterations in PR-1 gene expression. *Plant Cell* **9**, 305-316.

**Roman, G., Lubarsky, B., Kieber, J.J., Rothenberg, M., and Ecker, J.R.** (1995). Genetic analysis of ethylene signal transduction in Arabidopsis thaliana: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics* **139**, 1393-1409.

**Rusterucci, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., 3rd, Dangl, J.L., and Parker, J.E.** (2001). The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 2211-2224.

**Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Schlösser, E.** (1997). *Allgemeine Phytopathologie*. Thieme-Verlag, Stuttgart.

**Schulze-Lefert, P.** (2004). Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 377-383.

**Schweizer, P., Kmecl, A., Carpita, N., and Dudler, R.** (2000). A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* is recognized by a broad range of cereals. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**, 157-167.

**Shah, J.** (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 365-371.

**Sharma, P.C., Ito, A., Shimizu, T., Terauchi, R., Kamoun, S., and Saitoh, H.** (2003). Virus-induced silencing of WIPK and SIPK genes reduces resistance to a bacterial pathogen, but has no effect on the INF1-induced hypersensitive response (HR) in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Genet Genomics* **269**, 583-591.

**Shaw, C.H., Leemans, J., van Montagu, M., and Schell, J.** (1983). A general method for the transfer of cloned genes to plant cells. *Gene* **23**, 315-330.

**Shen, Q.H., Zhou, F., Bieri, S., Haizel, T., Shirasu, K., and Schulze-Lefert, P.** (2003). Recognition specificity and RAR1/SGT1 dependence in barley Mla disease resistance genes to the powdery mildew fungus. *Plant Cell* **15**, 732-744.

**Shirasu, K., Lahaye, T., Tan, M.W., Zhou, F., Azevedo, C., and Schulze-Lefert, P.** (1999). A novel class of eukaryotic zinc-binding proteins is required for disease resistance signaling in barley and development in *C. elegans*. *Cell* **99**, 355-366.

**Somerville, C., and Koornneef, M.** (2002). A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet* **3**, 883-889.

**Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C., and Ronald, P.** (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the *ice* disease resistance gene, *Xa21*. *Science* **270**, 1804-1806.

**Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X., and Pieterse, C.M.** (2003). NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* **15**, 760-770.

**Staswick, P.E., Tiryaki, I., and Rowe, M.L.** (2002). Jasmonate response locus JAR1 and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**, 1405-1415.

**Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., and Shirasu, K.** (2003). HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11777-11782.

**The Arabidopsis Genome Initiative.** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.

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

**Thomma, B.P., Nelissen, I., Eggermont, K., and Broekaert, W.F.** (1999). Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *Plant J* **19**, 163-171.

**Thordal-Christensen, H., Zhang, Z.G., Wei, Y.D., and Collinge, D.B.** (1997). Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**, 1187-1194.

**Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 351-357.

**Tor, M., Gordon, P., Cuzick, A., Eulgem, T., Sinapidou, E., Mert-Turk, F., Can, C., Dangl, J.L., and Holub, E.B.** (2002). Arabidopsis SGT1b is required for defense signaling conferred by several downy mildew resistance genes. *Plant Cell* **14**, 993-1003.

**Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (2002). RAR1 and NDR1 contribute quantitatively to disease resistance in Arabidopsis, and their relative contributions are dependent on the R gene assayed. *Plant Cell* **14**, 1005-1015.

**Tsuba, M., Katagiri, C., Takeuchi, Y., Takada, Y., and Yamaoka, N.** (2002). Chemical factors of the leaf surface involved in the morphogenesis of *Blumeria graminis*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**, 51-57.

**Tsuji, J., Jackson, E.P., Gage, D.A., Hammerschmidt, R., and Somerville, S.C.** (1992). Phytoalexin accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Plant Physiology* **98**, 1304-1309.

**van der Biezen, E.A., Freddie, C.T., Kahn, K., Parker, J.E., and Jones, J.D.** (2002). Arabidopsis RPP4 is a member of the RPP5 multigene family of TIR-NB-LRR genes and confers downy mildew resistance through multiple signalling components. *Plant J* **29**, 439-451.

**van Wees, S.C., and Glazebrook, J.** (2003). Loss of non-host resistance of Arabidopsis NahG to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* is due to degradation products of salicylic acid. *Plant J* **33**, 733-742.

**Vogel, J., and Somerville, S.** (2000). Isolation and characterization of powdery mildew-resistant Arabidopsis mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1897-1902.

**Vogel, J., and Somerville, S.** (2002). Powdery Mildew of *Arabidopsis*: A Model System for Host-Parasite Interactions. In: *The Powdery Mildews* (Bélanger, R.R., Bushnell, W.R., Dik, A.J., and Carver, T.L.W. Eds), APS Press, St. Paul, Minnesota, 161-168.

**von Arnim, A.G.** (2003). On again-off again: COP9 signalosome turns the key on protein degradation. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 520-529.

**Watanabe, N., and Lam, E.** (2004). Recent advance in the study of caspase-like proteases and Bax inhibitor-1 in plants: their possible roles as regulator of programmed cell death. *Molecular Plant Pathology* **5**, 65-70.

**Wildermuth, M.C., Dewdney, J., Wu, G., and Ausubel, F.M.** (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature* **414**, 562-565.

**Xiao, S., Ellwood, S., Calis, O., Patrick, E., Li, T., Coleman, M., and Turner, J.G.** (2001). Broad-spectrum mildew resistance in *Arabidopsis thaliana* mediated by RPW8. *Science* **291**, 118-120.

**Xue, M., and Zhang, B.** (2002). Do SNARE proteins confer specificity for vesicle fusion? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 13359-13361.

**You, I.S., Ghosal, D., and Gunsalus, I.C.** (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 3'-flanking region. *Biochemistry* **30**, 1635-1641.

**Yu, S.W., Wang, H., Poitras, M.F., Coombs, C., Bowers, W.J., Federoff, H.J., Poirier, G.G., Dawson, T.M., and Dawson, V.L.** (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* **297**, 259-263.

**Yun, B.W., Atkinson, H.A., Gaborit, C., Greenland, A., Read, N.D., Pallas, J.A., and Loake, G.J.** (2003). Loss of actin cytoskeletal function and EDS1 activity, in combination, severely compromises non-host resistance in *Arabidopsis* against wheat powdery mildew. *Plant J* **34**, 768-777.

**Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J.** (1999). *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* **11**, 2419-2428.

**Zhou, N., Tootle, T.L., Tsui, F., Klessig, D.F., and Glazebrook, J.** (1998). PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**, 1021-1030.

**Zimmerli, L., Stein, M., Lipka, V., Schulze-Lefert, P., and Somerville, S.** (2004). Host and non-host pathogens elicit different jasmonate/ethylene responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **40**, 633-646.

---

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

## DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert angefertigt. Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mir dabei geholfen und mich unterstützt haben, insbesondere bei:

- ☺ Paul für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Gruppe, für die Motivation durch Begeisterung, und für die gute Mischung aus fordern und fördern
- ☺ Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dr. U.-I. Flü gge für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes
- ☺ Volker für die „Grundlagenforschung“ und für unzählige Ratschläge, Hinweise, Pathogene, Saatgut-Eppis, powerpoint-slides, uvm.
- ☺ dem “non-host-team” für viele hilfreiche Anregungen, Diskussionen und Inokulationen
- ☺ allen Laborkollegen/-innen für den Spaß im und am Labor, sowie alle größeren und kleineren Hilfestellungen
- ☺ Anja für die Antwort auf alle Fragen
- ☺ allen Kooperationspartnern, insbesondere Lore für vielfach geteiltes Phänotypen-Leid ;-) sowie Desy und Jörn für die *Phytophora*-Experimente, Markus und Tanja für die *Alternaria*-Experimente und Marcel und Jane für ihre SAGenhaften Mutanten
- ☺ Heidrun und Petra, sowie Elke Glasmacher und Annette Glahn für unzählige DNA-Präps und PCRs
- ☺ allen Kollegen des PSL-departments und des MPIZ für die angenehme Arbeitsatmosphäre
- ☺ meine Freunde für das Abpuffern stressiger Phasen
- ☺ meiner Familie, insbesondere meinen Eltern für ihre Unterstützung
- ☺ Ε?χαριστ? για ??α, Στ?λιο

**VIELEN DANK !!!**

"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 Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert betreut worden."

Köln, 03. Mai 2005

Jan Dittgen



# **Jan Dittgen**

## *Curriculum vitae*

### ***Persönliche Informationen***

Geburtsdatum: 29.7.1975  
Geburtsort: Saarbrücken  
Nationalität: Deutsch

### ***Ausbildung***

Juni 1995 Abitur am Johannes-Kepler-Gymnasium, Lebach  
Okt. 1996 – Jan. 2002: Studium der Biologie (Diplomstudiengang),  
Universität Freiburg i.Br.  
Sep. 1998 – März 1999: Auslandsaufenthalt am Royal Holloway College,  
University of London  
Apr. 2001 – Jan. 2002: Diplomarbeit im Fachgebiet Pflanzenphysiologie,  
Universität Freiburg i.Br.  
AG Dr. K. Harter / Prof. Dr. E. Schäfer  
Thema: „Transkriptakkumulation und DNA-  
Bindungseigenschaften von Common Plant  
Regulatory Factors und LSD1 aus *Arabidopsis*  
*thaliana*.“  
Januar 2002: Abschluß der Diplomprüfung im Fach Biologie an der  
Universität Freiburg i. Br.

### ***Promotion an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, Universität zu Köln***

seit April 2002: Promotionsarbeit am Max-Planck-Institut für  
Züchtungsforschung, Köln  
AG Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert  
Thema: „Genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz  
gegenüber biotrophen Mehltaupilzen in *Arabidopsis*  
*thaliana*“