

Molekulare Mechanismen der MLA-vermittelten Resistenz

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stefan Mauch

aus Rottweil

Köln, im Oktober 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.

Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert
Prof. Dr. Martin Hülskamp
Prüfungsvorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Krämer

Prüfungstermin am 10. Januar 2006



MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT



Max-Planck-Institut für
Züchtungsforschung

Zusammenfassung

Die Erkennung von Pathogenen ist für Pflanzen Voraussetzung, um effektive Resistenzantworten auszulösen. Ein Erkennungsmechanismus wird genetisch durch Flors Gen-für-Gen Hypothese beschrieben, in der komplementäre Genpaare in Wirt und Pathogen notwendig sind, um eine Isolat-spezifische Resistenzreaktion auszulösen. Diese Gene werden als Resistenz-(*R*) Gene im Wirt und rassenspezifische Avirulenz (*Avr*)-Gene im Parasiten bezeichnet. Der *Mla*-Locus in Gerste kodiert eine allelische Reihe von intrazellulären R-Proteinen, die rassenspezifische Resistenzreaktionen gegen den parasitären Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* auslösen. Die zur Erkennung erforderlichen Pilzeffektoren werden von *AvrMla* Genen kodiert. Die ~107 kDa großen MLA Proteine sind modular aufgebaut. Diese Module sind durch eine aminoterminalen *coiled-coil* (CC)-Struktur, eine zentrale Nukleotid-bindende Domäne (NB), eine Region mit Leucin-reichen Wiederholungen (LRRs) und eine carboxyterminale nicht-LRR Region (CT) charakterisiert. MLA Proteine lösen eine Abwehrreaktion aus, die mit einem raschen programmierten Zelltod angegriffener Pflanzenzellen verbunden ist. Die Erkennungsspezifität von MLA Proteinen wird durch die polymorphe LRR-CT-Region determiniert. Obwohl *Mla*-Resistenzgene offensichtlich allelische Proteinvarianten kodieren, lassen sich diese genetisch in mindestens zwei Gruppen unterteilen, deren Funktion von der Anwesenheit der Pflanzengene *Rar1* und *Sgt1* entweder abhängig oder unabhängig ist. Die Funktion mindestens eines *Mla* Resistenzalleles ist zudem vom zytoplasmatischen Chaperon HSP90 abhängig.

Fundamentale biochemische Eigenschaften der MLA Proteine wurden in dieser Arbeit mit Hilfe transgener Gerstenlinien analysiert, in denen native 5' regulatorische Promotorsequenzen die Expression von funktionalen und mit Epitop markierten MLA Proteinen vermitteln. Diese Untersuchungen zeigen, dass der überwiegende Teil von MLA löslich ist und in allen untersuchten Organen der Pflanze nachgewiesen werden kann.

Überraschend war der Nachweis von MLA im Wurzelgewebe, da Mehлтаupilze ausschließlich epidermales Blattgewebe infizieren. Ergebnisse, nach denen die MLA-Abundanz vom Proteasom kontrolliert wird und MLA-Protein *in vitro* sumoyliert werden

kann, deuten auf eine weitere Ebene in der posttranslationalen Kontrolle hin. Am Beispiel des MLA1 Proteins wurde die Existenz eines hochmolekularen MLA Komplexes von ca. 600-750 kDa mittels Säulenchromatographie und Blau-Nativer Gelelektrophorese nachgewiesen. Dies wird als erster Hinweis auf die Anwesenheit eines homomeren oder heteromeren Erkennungskomplex in gesunden Pflanzen interpretiert, der direkt oder indirekt die Anwesenheit des Pilzeffektors AVRMLA1 registrieren könnte. Die Proteine RAR1, SGT1 und HSP90 sind keine integralen Komponenten dieses Komplexes. Es ist aber möglich, dass diese Proteine eine regulatorische Funktion bei der Faltung von monomeren MLA und/oder der Komplexbildung ausüben. Die beiden exemplarisch untersuchten Proteine MLA1 und MLA6 sind in planta bei höheren Temperaturen intrinsisch instabil. Dieses Ergebnis bietet eine mögliche Erklärung für die häufig beobachtete Temperatursensitivität der durch R-Proteine ausgelösten Resistenzreaktionen. Der mutmaßliche Transkriptionsfaktor WRKY2 in Gerste wurde als Interaktor der CC Domäne von MLA Proteinen über das Zwei-Komponenten-System in Hefe isoliert. Diese Protein-Protein Interaktion erfordert nicht die Anwesenheit weiterer Hefeproteine, da deren Assoziation auch mit in vitro synthetisierten MLA und WRKY2 Proteinen in Co-Immuno-Präzipitationsexperimenten nachgewiesen werden konnte. Da die Expression von WRKY2 durch den Mehltaupilz induziert wird und WRKY2 mRNA in gesundem Blattgewebe nicht nachweisbar ist, werden Modelle diskutiert, in denen dieser Transkriptionsfaktor als eine potentielle Signaltransduktionskomponente der von MLA aktivierten Resistenzantwort funktioniert.

Abstract

Molecular recognition of pathogens is required to mount efficient plant resistance responses. One recognition system is genetically defined by Flor's gene-for-gene hypothesis and involves corresponding gene pairs in host lines and pathogen strains. According to this hypothesis, race-specific resistance requires the presence of a race-specific resistance (*R*) gene in the host and an isolate-specific pathogen effector gene (*Avr*). The barley *Mla* locus encodes an allelic series of polymorphic intracellular plant R proteins containing an N-terminal coiled-coil (CC) structure, a central nucleotide binding (NB) domain, followed by a leucine-rich repeat (LRR) region, and a C-terminal non-LRR (CT) region. The CC-NB-LRR-CT type MLA R proteins each recognize isolate-specific fungal effectors (encoded by *AvrMla* genes) that are released upon attack by the powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Bgh*) pathogen. MLA proteins trigger immune responses upon AVRMLA detection that is tightly linked to a cell death response of attacked plant cells. MLA recognition specificity was previously shown to be conferred by the polymorphic LRR-CT region. Although *Mla R* genes appear to be alleles, individual *Mla* alleles differ in their functional requirements for additional host genes such as *Rar1* and *Sgt1*. In addition, cytosolic HSP90 was recently shown to be genetically required for the function of at least one *Mla* resistance specificity.

Using transgenic lines expressing functional epitope-tagged MLA variants, driven by native 5' regulatory sequences, biochemical fractionation experiments revealed that the majority of MLA is soluble. A minor part of the protein is membrane associated. MLA is constitutively present in all organs of barley plants including roots. Detection of MLA in roots was unexpected because the powdery mildew parasite attacks only leaf epidermal tissue. This work shows the control of MLA abundance by the proteasome and sumoylation of MLA protein *in vitro* suggesting an additional level of posttranslational control. Using blue native gel electrophoresis and size exclusion chromatography, MLA1 was found to be part of a protein complex of ~600-750 kDa that is present in healthy plants. It remains unclear whether this complex represents MLA oligomers or is a heterocomplex containing other host proteins. Co-immunoprecipitation experiments

indicate that HSP90, SGT1, and RAR1 are not MLA complex components. However, these proteins might transiently associate with monomeric MLA to promote its folding and/or association with other host proteins to form MLA-containing recognition complexes. Both tested MLA1 and MLA6 proteins were *in planta* found to be intrinsically unstable at elevated temperatures. This might be related to the known temperature sensitivity of several other R protein-triggered resistance responses. WRKY2 was recently found to interact with the MLA CC domain in yeast two-hybrid screens. This work also demonstrates an association of MLA with the putative barley WRKY2 transcription factor in *in vitro* pull-down assays, suggesting that the interaction does not require additional yeast factors. Since WRKY2 expression is known to be pathogen responsive and WRKY2 mRNA is almost undetectable in healthy leaf tissue, I have discussed models in which the presumed transcription factor acts as signaling component in MLA-triggered resistance responses.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	5
Abstract.....	7
Inhaltsverzeichnis	9
Tabelle der Abkürzungen.....	15
1. Einleitung.....	19
1.1. Angeborene Resistenzmechanismen in Pflanzen.....	19
1.2. Die Erkennung von Pathogenen.....	21
1.3. Mehltaupilze als Pflanzenpathogene.....	28
1.4. Die MLA-vermittelte Resistenz von Gerste gegen Gerstenmehltau <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> als Modellsystem für die rassenspezifisch Resistenz	29
1.5. Zielsetzung dieser Arbeit	31
2. Material und Methoden.....	33
2.1. Material	33
2.1.1. Pflanzenmaterial	33
2.1.1.1. <i>Hordeum vulgare</i> ssp. <i>vulgare</i>	33
2.1.1.2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
2.1.2. Gerstenmehltau <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	34
2.1.3 Bakterienstämme.....	34
2.1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	34
2.1.3.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	34
2.1.4. Vektoren.....	35
2.1.5 Oligonukleotide.....	35
2.1.6. Enzyme	37
2.1.6.1. Restriktionsendonukleasen	37
2.1.6.2. Sonstige kommerzielle Enzyme.....	38
2.1.7. Chemikalien	38
2.1.7.1. Antibiotika	38
2.1.7.2. Sonstige Chemikalien	39
2.1.7.3. Lösungen und Medien.....	42

2.1.8. Antikörper	42
2.1.9. Computerprogramme, Datenbanken und sonstige Internetressourcen	43
2.1.9.1. Programme zur DNA-Analyse.....	43
2.1.9.2. Programme und Internetressourcen zur Analyse von Proteindaten.....	44
2.2. Anzucht der Versuchspflanzen und Kultivierung der Pathogene	45
2.2.1. Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
2.2.2. Anzucht von Gerste.....	45
2.2.2.1. Temperaturschockbehandlung von Gerstenpflanzen.....	46
2.2.2.2. Kultivierung von Gerstenpflanzen zur Isolation von Wurzelgewebe.....	46
2.2.3. Kultivierung von Gerstenmehltau.....	46
2.2.4. Inokulationsexperimente.....	46
2.2.5. Selektion homozygoter transgener Gerstenlinien	47
2.3. Molekularbiologische Methoden	48
2.3.1. Manipulation von Nukleinsäuren.....	48
2.3.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) von Plasmid- und genomischer DNA	48
2.3.1.2. PCR von <i>E. coli</i> -Kolonien	49
2.3.1.3. Gezielte Punktmutagenese	49
2.3.1.4. Restriktionsverdau	49
2.3.1.5. Dephosphorylierung.....	49
2.3.1.6. Reinigung von DNA-Fragmenten.....	50
2.3.1.7. Ligation	50
2.3.2. DNA-Analyse	50
2.3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA zur Kontrolle von Transformationen	
(<i>Boiling Miniprep</i>)	50
2.3.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA	51
2.3.2.2. Isolierung von DNA aus Gerste.....	51
2.3.2.3. Sequenzierung.....	52
2.3.2.4. Sequenzanalyse	52
2.3.3. RNA-Analyse.....	52
2.3.3.1. RNA-Extraction (in Zusammenarbeit mit Francesca Ceron)	52
2.3.3.2. Semiquantitative RT-PCR (in Zusammenarbeit mit Francesca Ceron)...	53

2.3.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen.....	54
2.3.5. Transformation von Bakterienstämmen.....	55
2.3.5.1. Herstellung chemisch kompetenter Zelle des <i>E.coli</i> -Stammes DH5 α	55
2.3.5.2. Transformation des <i>E.coli</i> -Stammes DH5 α	56
2.3.5.2 Transformation des <i>E.coli</i> -Stammes Rosetta	56
2.3.5.3. Transformation des <i>A. tumefaciens</i> -Stammes GV3101	56
2.3.6. Transformation von <i>A. thaliana</i>	57
2.4. Proteinbiochemische Methoden.....	58
2.4.1. Extraktion nativer Pflanzenproteine aus Gerste und Probenvorbereitung	58
2.4.1.1. Extraktion.....	58
2.4.1.2. Fraktionierung der mikrosomalen Proteine	59
2.4.1.3. Acetonfällung.....	59
2.4.1.4. Trichloressigsäure-(TCA-)fällung	60
2.4.2. Expression von Proteinen <i>in vitro</i>	60
2.4.2.1. Expression in Weizenkeimextrakt	60
2.4.2.2. Expression und Aufreinigung von GST-markiertem Protein aus <i>E. coli</i> . 60	
2.4.2.3. Expression und Extraktion von Protein aus <i>S. cerevisiae</i>	61
2.4.3. Enzymatische Tests und Inhibitorstudien	62
2.4.3.1. Test der Ubiquitylierung von MLA	62
2.4.3.2. Test der Sumoylierung von MLA	62
2.4.3.3. Studie mit Proteasominhibitoren.....	63
2.4.4. Interaktionsstudien	63
2.4.4.1. Immunoaufreinigung aus pflanzlichem Proteinrohextrakt	63
2.4.4.2. <i>In vitro</i> -Interaktionsstudien.....	63
2.4.5. Gelfiltration.....	64
2.4.6. Gelelektrophoretische Trennungsvorgahren von Proteinen und Transfer auf Nitrozellulosemembranen	64
2.4.6.1. Blau-Native Gelelektrophorese und nativer Transfer	64
2.4.6.2. SDS-PAGE und <i>Western Blotting</i>	66
2.4.7. Detektion von Proteinen	68
2.4.7.1. Immunodetektion	68

2.4.7.2. Färbung mit Coomassie	69
3. Ergebnisse	71
3.1. Herstellung transgener Gerstelinien.....	71
3.1.1. Isolation homozygoter transgener <i>Mla</i> -enthaltender Linien.....	71
3.1.2. Isolation von homozygoten Kreuzungen der transgenen <i>Mla</i> -enthaltenden Linien mit <i>rar1-2</i> Mutanten	72
3.2. Generelle Charakterisierung der MLA-Proteine.....	74
3.2.1. MLA kann in allen grünen Teilen der Pflanze und der Wurzel nachgewiesen werden.....	74
3.2.2. MLA liegt in einem löslichen und einem membranassoziierten Pool vor.....	74
3.2.4. RAR1 kann MLA bei erhöhten Temperaturen nicht stabilisieren	77
3.3. Rekonstituierung der durch RAR1 vermittelten Stabilisierung und der Funktionalität von MLA in <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
3.3.1. Rekonstituierung der durch RAR1 vermittelten Stabilisierung	79
3.3.2. Rekonstituierung der Funktionalität	79
3.4. Isolation MLA1-HA enthaltender Komplexe <i>in vivo</i>	80
3.4.1. Ein MLA1-enthaltender Komplex mit einem Molekulargewicht von ~750 kDa kann <i>in planta</i> nachgewiesen werden.	81
3.4.2. Gelfiltration bestätigt einen <i>in planta</i> MLA Komplex von ~600-800 kDa	81
3.5. Test für spezifische Interaktoren <i>in planta</i>	83
3.5.1. MLA1-HA und MLA6-HA aus Proteinrohextrakt können mittels Immunopräzipitation spezifisch aufgereinigt werden.....	84
3.5.2. Eine Interaktion von RAR1 mit MLA-HA kann <i>in planta</i> nicht nachgewiesen werden.....	85
3.5.3. Weder eine Interaktion von SGT1 noch von HSP90 mit MLA-HA kann <i>in</i> <i>planta</i> nachgewiesen werden	85
3.6. Interaktion mit HvWRKY2 <i>in vitro</i>	87
3.6.1. WRKY-Antikörper gegen Protein aus <i>Arabidopsis thaliana</i> kann WRKY- Protein aus Gerste erkennen.....	88
3.6.2. Expression verschiedener HvWRKY und MLA-Konstrukte <i>in vitro</i>	88
3.6.3. Interaktion von GST-HvWRKY2-C-Terminus und MLA1-CC-HA.....	89

3.7. Kontrolle der Menge von MLA im Ruhezustand und mögliche Modifikation durch Ubiquitin und SUMO.....	90
3.7.1. Proteasomale Degradation und Neusynthese kontrollieren die Menge von MLA im Ruhezustand.....	90
3.7.2. MLA1-HA und MLA6-HA können <i>in vitro</i> sumoyliert werden	92
4. Diskussion.....	95
4.1. MLA könnte neben der Resistenz gegen Bgh auch noch andere Resistenzen vermitteln	95
4.2. Die subzelluläre Lokalisation von MLA könnte durch Interaktionspartner reguliert werden.....	96
4.3. RAR1 kann MLA-Protein unter Temperaturstress nicht stabilisieren.....	97
4.4. Ist der Mechanismus der RAR1-abhängige Stabilisierung von R-Proteinen konserviert in planta?	99
4.5. Komplexbildung von MLA und die mögliche Rolle von HSP90 und seiner Co-Chaperonen RAR1 und SGT1 in der MLA-Protein vermittelten Resistenz.....	102
4.6. WRKY2 ist ein Glied der MLA-vermittelten Resistenz direkt stromabwärts von MLA.....	104
4.7. Das Proteasom kontrolliert MLA-Abundanz.....	108
4.8. MLA kann <i>in vitro</i> sumoyliert werden	111
4.9. Ein generelles Modell der MLA-vermittelten Resistenz	113
5. Literatur.....	117
Appendix I: Abbildungsverzeichniss	141
Appendix II: Tabellenverzeichnis.....	143
Appendix III: Erklärung.....	145
Appendix IV: Lebenslauf.....	147
Appendix V: Danksagung.....	149

Tabelle der Abkürzungen

%(v/v)	Volumenprozent
%(w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
aa	Aminosäure
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Avr	Avirulenz-
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> ; Gerstemehltau
bp	Basenpaare
CARD	Caspase rekrutierende Domäne
CC	<i>coiled-coil</i> ; superspiralisierte Helix
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CHIP	Carboxyterminus von HSP70 interagierendes Protein
CHORD	Cystein- und Histidin-reiche Domäne
CS	CHORD und SGT1-Motiv
CSN	COP9-Signalosom
CT	carboxyterminale nicht-LRR Region
cv.	Kultivar
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i> , verstärkte Chemolumineszenz
<i>EDS1</i>	<i>Enhanced Disease Susceptibility 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Ethylen
f.sp.	forma specialis
F ₁	Filialgeneration 1
F ₂	Filialgeneration 2
F ₃	Filialgeneration 3
<i>g</i>	Schwerkraftskonstante (9,81 ms ⁻¹)
g	Gramm
h	Stunden
HR	Hypersensitive Reaktion
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSP70	Hitzeschockprotein 70
HSP90	Hitzeschockprotein 90
JA	Jasmonat
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LRR	<i>Leucine-rich repeats</i> , Leucinreiche repetitive Sequenzbereiche
M	molar (mol/l)
m	Milli-
MAPK, MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
<i>Mla</i>	<i>Mildew resistance locus A</i> , Mehлтаuresistenzlocus A
<i>Mlg</i>	<i>Mildew resistance locus G</i> , Mehлтаuresistenzlocus G
<i>MLk</i>	<i>Mildew resistance locus K</i> , Mehлтаuresistenzlocus K
<i>Mlo</i>	<i>Mildew resistance locus O</i> , Mehлтаuresistenzlocus O
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
N	<i>Amino-</i>
NASC	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i>

NB	Nukleotidbindestelle
nm	Nanometer
NOD	Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne
OD	Optische Dichte
<i>PAD4</i>	<i>Phytoalexin Deficient 4</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativ dezimaler Logarithmus der H ⁺ Konzentration
PR	<i>pathogenesis related</i> ; Pathogenese-assoziiert
pv.	Pathovar
R, R	Resistenz
<i>Rar1</i>	<i>required for Mla12 resistance</i>
rel. LF	relative Luftfeuchtigkeit
RIN4	<i>RPM1-interacting protein 4</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	reactive oxygen intermediates
<i>RPM</i>	<i>resistance to Pseudomonas syringae pv. Maculicola</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
<i>RPP</i>	<i>resistance to Peronospora parasitica</i>
<i>RPS</i>	<i>resistance to Pseudomonas syringae</i>
RT	Raumtemperatur
RT-	reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription- Polymerasekettenreaktion
SA	Salicylsäure
<i>SAG101</i>	<i>Senescence Associated Gene 101</i>
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SCF	Skp1/Cdc53/F-Box-Protein
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec	Sekunden
<i>Sgt1</i>	<i>suppressor of G-two allele of skp1</i>

<i>Skp1</i>	<i>suppressor of kinetochore protein 1</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
T ₁	Filialgeneration 1 nach Transformation
T ₂	Filialgeneration 2 nach Transformation
T-DNA	Transposon-DANN
TIR	Ähnlich zu <i>Drosophila</i> Toll- und menschlichem Interleukin1-Rezeptor
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor
TMV	Tabakmosaikvirus
TPR	Tetratrikopeptidwiederholungen
U	Unit (Enzymmenge)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VIGS	Virus induzierte posttranskriptionale Geninaktivierung
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Pflanzen sind während ihres Lebenszyklus einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt, die sie als Wirt benutzen, um sich zu vermehren (Allen et al., 2004; Mysore und Ryu, 2004). Als sessile Organismen sind sie somit besonders auf effiziente Erkennungs- und Abwehrmechanismen angewiesen, die im Zuge der Coevolution zwischen Pflanze und Pathogen kontinuierlich weiterentwickelt werden (Holub, 2001; Van der Hoorn et al., 2002; Allen et al., 2004). Zu diesem Zweck haben Pflanzen ein raffiniertes, mehrschichtiges System aus Resistenzmechanismen entwickelt, das in der Lage ist, Selbst und Nicht-Selbst zu unterscheiden - die Voraussetzung für aktive Abwehrmechanismen gegen Pathogene. Von großem wissenschaftlichem Interesse ist es, die Signalerkennung und -weiterleitung dieser Abwehrmechanismen zu verstehen, da dies neue Möglichkeiten zur Bekämpfung von Pathogenen eröffnen kann.

1.1. Angeborene Resistenzmechanismen in Pflanzen

Ist eine Pflanze für einen bestimmten Krankheitserreger anfällig, so spricht man bei Infektion von einer kompatiblen Interaktion, im umgekehrten Fall, wenn die Pflanze resistent ist, von einer inkompatiblen Interaktion (Hammond-Kosack und Jones, 2000). In der Regel können potentielle Pathogene die meisten Pflanzen nicht besiedeln, sondern sind auf einen beschränkten Bereich an Wirtspflanzen angewiesen. Um Pflanzen zu infizieren, müssen diese potentiellen Pathogene konstitutive Barrieren der Pflanzen durchdringen. Es wird angenommen, dass diese Barrieren physikalischer (Kutikula, Zellwand) wie auch chemischer Natur (sekundäre Metabolite) sein können, allerdings gibt es nur spärliche Belege für physikalische Barrieren (Thordal-Christensen, 2003). Ein Beispiel für einen konstitutiv in Pflanzen akkumulierten sekundären Pflanzenstoff ist Avenazin, ein Triterpenoid-Saponin, aus den Wurzeln von Hafer (Mary et al., 1986). Es macht Hafer resistent gegen den Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, während er anfällig gegen *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae* ist, der Avenin detoxifizieren kann (Mary et al., 1986). Mutanten, die keine Akkumulation von Avenin mehr zeigen, sind gegen *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* anfällig (Papadopoulou et al., 1999).

Dies zeigt eine direkte Beteiligung konstitutiv exprimierter sekundärer Pflanzenstoffe in der Resistenz und die Notwendigkeit der Anpassung des Pathogens an den Wirt (Thordal-Christensen, 2003; Nürnberger und Lipka, 2005).

Gelingt es einem Pathogen, diese erste Barriere zu überwinden, können konservierte Muster der Molekularstruktur des Pathogens, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*), erkannt werden, die zu einer induzierten Abwehrreaktion führen (siehe auch Kapitel 1.2.; Thordal-Christensen, 2003; Nürnberger et al., 2004; Nürnberger und Lipka, 2005). Diese durch aktive Erkennung vermittelte Resistenz wird auch als PAMP-vermittelte Immunität oder Nichtwirtsresistenz bezeichnet (Nürnberger und Lipka, 2005). Je nach symptomatischer Ausprägung werden 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 und Ryu, 2004).

Pathogene, die sich an eine bestimmte Wirtspflanzenspezies angepasst haben, haben Virulenzfaktoren entwickelt, um ihre primären Abwehrmechanismen, inklusive der PAMP-vermittelten Resistenz, zu überwinden und sind somit virulent. Diese Faktoren unterdrücken gezielt bestimmte Mechanismen, die für die pflanzliche Pathogenabwehr benötigt werden (Nomura et al., 2005). Da sie die Abwehrreaktion nicht vollständig unterbinden, ist immer noch einen Rest PAMP-vermittelter Resistenz feststellbar. Dieser als basale Resistenz bezeichnete Effekt genügt jedoch nicht, um die Infektion der Pflanze zu stoppen (Nürnberger und Lipka, 2005). Durch Mutation in bestimmten Stoffwechselwegen, die für diese Resistenz benötigt werden, kann die Pflanze hyperanfällig werden. So führt eine Mutation im *eds1*-Gen in *Arabidopsis thaliana*, das für die rassen-spezifische und PAMP-vermittelte Resistenz benötigt wird, zu Hyperanfälligkeit gegen das virulente Pathogen *Pseudomonas syringae* (Parker et al., 1996; Aarts et al., 1998). Um der Bedrohung durch solche virulenten Pathogene zu begegnen, haben Pflanzen Systeme entwickelt, in denen bestimmte Rezeptoren zugehörige Pathogenfaktoren erkennen und eine Resistenzantwort auslösen können (Nürnberger et al., 2004; Nürnberger und Lipka, 2005). Diese Rezeptoren werden Resistenz (R)-Proteine, die

korrespondierenden Pathogenfaktoren aus historischen Gründen Avirulenzfaktoren (Avr) genannt (vgl. 1.2.).

1.2. Die Erkennung von Pathogenen

Eine Pathogen-induzierte Aktivierung von Abwehrmechanismen setzt zunächst voraus, dass der Pathogenangriff wahrgenommen werden kann. Es gibt in Tieren und Pflanzen zwei funktionelle Gruppen von Pathogenrezeptoren, die sich strukturell sehr ähnlich sind: PAMP-Rezeptoren aus Pflanzen zeigen strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu ihren Gegenstücken in Tieren; pflanzliche R-Proteine zeigen Homologie zu tierischen NOD-Rezeptoren. PAMP-Rezeptoren erkennen bestimmte molekulare Muster potentieller Pathogene, die nicht im Wirt vorhanden sind. Diese PAMPs sind in der Regel essentiell für potentiell pathogene Mikroben und hochkonserviert (Parker, 2003; Nürnberger et al., 2004; Nürnberger und Lipka, 2005). In Tieren werden z. B. Lipopolysaccharide von Gram-negativen Bakterien, Peptidoglykane von Gram-positiven Bakterien und bakterielles Flagellin erkannt (Underhill und Ozinsky, 2002; Chamaillard et al., 2003; Smith et al., 2003). In Pflanzen können PAMPs entweder vom Pathogen selbst stammen (z. B. lösliche Bestandteile der Pathogenoberfläche oder Flagellin) oder durch mikrobielle Aktivität aus pflanzlichem Material abgeleitet sein (z. B. Zellwand-Degradationsprodukte; Esquerre-Tugaye et al., 2000; Gomez-Gomez und Boller, 2000; Schweizer et al., 2000). Wahrscheinlich existiert auch ein System zur Überwachung der Zellwandintegrität (Kobayashi et al., 1997b; Kobayashi et al., 1997a; Schmelzer, 2002; Collins et al., 2003; Schulze-Lefert, 2004b). Dieses Überwachungssystem ist möglicherweise mit bekannten Resistenzsignalwegen gekoppelt (Peart et al., 2002; Mysore und Ryu, 2004; Schulze-Lefert, 2004b).

In Tieren werden PAMPs entweder von Toll-ähnlichen Transmembran-Rezeptoren (TLRs) oder von zytoplasmatischen Rezeptoren, die eine Nukleotid-bindende Oligomerisierungsdomäne (*nucleotide-binding oligomerisation domain*, NOD) besitzen (NOD-Proteine), erkannt (Girardin et al., 2002). TLRs erkennen Pathogene mittels extrazellulärer LRRs (*Leucine-rich repeats*) und leiten das Signal über ihre intrazelluläre,

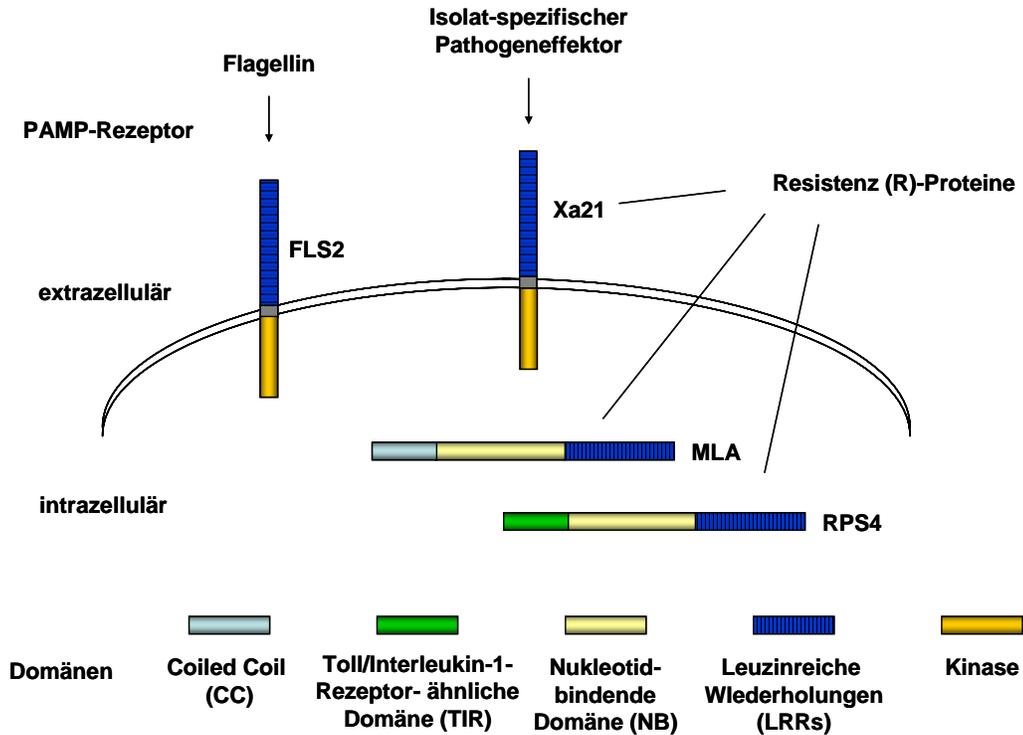


Abbildung 1: Rezeptoren für die Pathogenerkennung in Pflanzen (nach Parker, 2003).

In Pflanzen stellen PAMP-Rezeptoren und R-Proteine funktionell verschiedene Rezeptorklassen für die Pathogenerkennung da. Während PAMP-Rezeptoren in potentiellen Pathogenen konservierte molekulare Muster erkennen, erfassen R-Proteine isolatspezifische Pathogeneffektoren. Die meisten R-Proteine können in zwei strukturelle Klassen eingeteilt werden: Proteine mit extrazellulärem LRR, die Homologie zu PAMP-Rezeptoren aufweisen, und intrazelluläre NB-LRR-Proteine, die eine N-terminale TIR- oder CC-Domäne aufweisen.

zytoplasmatische TIR (Toll/Interleukin-1 Rezeptor-ähnlich)-Domäne weiter (Akira und Takeda, 2004). NOD-Proteine sind zytoplasmatisch und bestehen aus einer zentralen NOD-Domäne und in der Regel einer carboxyterminalen LRR-Domäne (Inohara und Nunez, 2003; Athman und Philpott, 2004). An der aminoterminalen Seite besitzen sie ein oder zwei CARD (*caspase recruitment domain*)-Domänen (Inohara und Nunez, 2003; Athman und Philpott, 2004). Pflanzliche Homologe dieser NOD-Proteine sind die so genannten R-Proteine.

PAMPs werden in Pflanzen von Rezeptoren erkannt, die strukturelle Ähnlichkeit zu TLR-Rezeptoren zeigen. Ein Beispiel hierfür ist der FLS2-Rezeptor. Dieser besitzt wie die TLR-Rezeptoren eine extrazelluläre LRR-Domäne und eine Transmembrandomäne, statt einer zytoplasmatischen TIR- jedoch eine Kinasedomäne (Gomez-Gomez und Boller,

2000; Gomez-Gomez et al., 2001; Navarro et al., 2004). Er erkennt flg22, ein 22 Aminosäuren langem Peptid, das die am höchsten konservierte Region im bakteriellen Motorprotein Flagellin darstellt und beinahe in allen bekannten Bakterien vorhanden ist (Gomez-Gomez und Boller, 2000). Durch diese Erkennung wird eine MAPK-(*mitogen-activated protein kinase*-)Signalkaskade ausgelöst, die zu erhöhter Resistenz gegenüber bakteriellen (*Pseudomonas syringae*) und pilzlichen (*Botrytis cinerea*) Erregern führt (Asai et al., 2002). Die hypersensitive Reaktion (HR), eine zelluläre Abwehrreaktion, die oft mit einer programmierten Zelltodreaktion gekoppelt ist, ist daran jedoch nicht beteiligt (Asai et al., 2002; Greenberg und Yao, 2004). MAPK bilden den zentralen Punkt in der Kommunikation verschiedener Stress-induzierter Signaltransduktionswege, inklusive solcher, die mit der Erkennung von Pathogenen verknüpft sind (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Zhang und Klessig, 2001). Es wurde gezeigt, dass sie sowohl in der PAMP-vermittelten, als auch in der R-Protein vermittelten rassenspezifischen Resistenz eine Rolle spielen (Asai et al., 2002; Liu et al., 2004a; Menke et al., 2004). MAPK-Kaskaden nach Behandlung mit flg22 induzieren die Expression verschiedener WRKY-Proteine (Asai et al., 2002; Navarro et al., 2004). WRKY-Proteine sind Transkriptionsfaktoren mit ein oder zwei konservierten WRKY-Domänen, die Zink-bindende Strukturen bilden (Eulgem et al., 2000; Yamasaki et al., 2005). Mit diesen WRKY-Domänen binden sie zugehörige *cis*-Elemente, die sogenannte W-Boxen in der Promoterregion, die die DNA-Sequenz (T)(T)TGAC(C/T) enthalten (Eulgem et al., 2000; Yamasaki et al., 2005). Abhängig von der Sequenz um die W-Box herum zeigen sie sowohl negative, als auch positive Regulation der Transkription (Robatzek und Somssich, 2002; Miao et al., 2004; Xie et al., 2005). Die genaue Funktion von WRKY-Proteinen in der Pathogenabwehr neben der transkriptionellen Aktivierung diverser mit Resistenzreaktionen verknüpfter Gene ist noch relativ unbekannt (Eulgem, 2005).

Neben der PAMP-vermittelten Resistenz gibt es noch einen weiteren Abwehrmechanismus, der von bestimmten Resistenz (R)-Proteinen vermittelt wird, die sich in verschiedenen Ökotypen einer ansonsten anfälligen Wirtspflanze entwickelt haben. Diese R-Proteine können bestimmte Effektormoleküle (Avr) eines spezifischen Pathogens erkennen und eine Abwehrreaktion auslösen. Diese rassenspezifisch oder R-Gen-

vermittelte Resistenz wurde in der „Gen-für-Gen-Hypothese“ beschrieben und ist durch das Vorhandensein komplementärer Paare von bestimmten *Avr*-Genen im Pathogen und *R*-Genen in der Pflanze genetisch determiniert (Flor, 1971). Das Fehlen eines dieser beiden Determinanten in einem der Interaktionspartner führt zum Verlust der Resistenz (Flor, 1971; Dangl und Jones, 2001). Die rassenspezifische Resistenz ist oft mit einer lokal begrenzte Anhäufung von Stickoxid (NO), reaktiven Sauerstoffintermediate (*reactive oxygen intermediates*, ROI), wie Superoxid (O_2^-) und Wasserstoffperoxyd (H_2O_2), und lokal begrenztem programmierten Zelltod an der Infektionsstelle (HR) assoziiert (Greenberg und Yao, 2004). Die meisten Effektormoleküle werden als Virulenzfaktoren angesehen, das heißt, sie begünstigen das Wachstum des Pathogens auf einem Wirt in der Abwesenheit von R-Proteinen indem sie Resistenzmechanismen eliminieren (Espinosa und Alfano, 2004; Hotson und Mudgett, 2004). So haben viele der bekannten Effektoren Proteaseaktivität oder hohe Homologie zu Cysteinproteasen, die die Verteidigungsmechanismen der Pflanze eliminieren (Hotson und Mudgett, 2004). *AvrRpt2* ist ein Beispiel für eine Cysteinprotease aus *Pseudomonas syringae*, die durch ein eukaryotisches Cyclophilin prozessiert werden muss um aktiviert zu werden (Jin et al., 2003; Coaker et al., 2005). Dies kann einen Schutzmechanismus des Pathogens vor seinen eigenen Effektoren darstellen und ist auch für andere Virulenzfaktoren denkbar. Es ist jedoch theoretisch auch möglich, dass Effektormoleküle teilweise keine Virulenzfunktion besitzen, sondern Produkt zufälliger Rekombinationsereignisse in Pathogenen sind, möglicherweise mit dem Ziel, die Entwicklung einer Erkennungsspezifität gegen virulenzfördernde Effektoren durch hohe Variabilität potentieller Effektoren zu verlangsamen (Skamnioti und Ridout, 2005).

Eine einfache Interpretation der Gen-für-Gen-Hypothese ist das Rezeptor-Liganden-Modell. Dabei wird davon ausgegangen, dass R-Proteine direkt mit dem korrespondierenden Effektormolekül interagieren. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass dies für manche AVR-R-Paare zumindest *in vitro* zutrifft (Scofield et al., 1996; Tang et al., 1996; Jia et al., 2000; Deslandes et al., 2003). Allerdings konnte für die meisten typischen R-Proteine keine direkte Interaktion mit dem entsprechenden Avr nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass zumindest manche R-Proteine die korrespondierenden

Effektoren indirekt erkennen. So wurde eine indirekte Erkennung postuliert (Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Es wird dabei angenommen, dass R-Proteine ein Wirtsprotein (*guard*) überwachen, das ein Virulenzziel für das korrespondierende Effektormolekül ist (*guard*-Hypothese; Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Das Effektormolekül modifiziert den Wirtsfaktor um die Virulenz des Pathogens zu erhöhen (Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Diese Modifikationen werden vom R-Protein erkannt, das dann die Abwehrmechanismen der Pflanze aktiviert.

Verschiedene Publikationen unterstützen diese Theorie. In aktuellen Studien wurde gezeigt, dass das NB-LRR-Protein RPS5 das korrespondierende Effektormolekül AvrPphB aus *Pseudomonas syringae* daran erkennt, dass es den Wirtsfaktor PBS1, eine Proteinkinase, proteolytisch degradiert (Shao et al., 2003). RIN4 (*RPM1-interacting protein 4*) ist ein weiterer Wirtsfaktor, der ein Virulenzziel von Effektoren aus *Pseudomonas syringae* ist (Mackey et al., 2002; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003). Es weist keine Homologie zu bekannten Proteinen auf (Mackey et al., 2002). AvrRpm1 und AvrB phosphorylieren RIN4, diese Modifikation wird dann durch RPM1 erkannt (Mackey et al., 2002). Die Cysteinprotease AvrRpt2 blockiert die Funktion von RPM1, indem es RIN4 degradiert; die Eliminierung von RIN4 aktiviert RPS2, das dann eine Resistenzantwort vermittelt (Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003; Kim et al., 2005a). RIN4 ist ein negativer Regulator sowohl von RPM1 und RPS2 als auch der PAMP-vermittelten Resistenz (Belkhadir et al., 2004b; Day et al., 2005; Kim et al., 2005b). Es bildet daher einen Knotenpunkt zwischen PAMP-Rezeptor vermittelter und R-Protein-vermittelter Resistenz (Kim et al., 2005b).

Die größte Klasse von *R*-Genen kodiert für Proteine, die aus einer Nukleotid-Bindedomäne (NB) und einer Region mit Leucin-reichen Wiederholungen (LRR) besteht (Dangl und Jones, 2001; Meyers et al., 2003; Belkhadir et al., 2004a). Sie zeigen strukturelle Ähnlichkeit mit NOD-Rezeptoren aus Tieren (Inohara und Nunez, 2003). Die NB-Region soll dabei als Dimerisierungsdomäne unter ATP-Verbrauch dienen (Inohara und Nunez, 2003). Obwohl bisher unbekannt ist, ob NB-LRR-Proteine dimerisieren,

wurde berichtet, dass die in allen NB-LRR-Proteinen konservierten Nukleotid-bindedomänen von I-2 und Mi-1 aus Tomate ATPase-Aktivität zeigen (Tameling et al., 2002). NB-LRR-Proteine sind laut *in silico*-Voraussagen zytoplasmatische Proteine; zumindest RPM1 und RPS2 assoziieren jedoch mit der Plasmamembran (Boyes et al., 1998; Axtell und Staskawicz, 2003). Es ist bekannt, dass die LRRs die Erkennungsspezifität von NB-LRR-Proteinen und extrazellulären TIR-Rezeptoren vermitteln (Van der Hoorn et al., 2001; Shen et al., 2003). LRR-Domänen spielen eine Rolle in diversen Protein-Protein-, Protein-Peptid- oder Protein-Kohlenhydrat-Interaktionen (Jones und Jones, 1997; Kajava, 1998). Am Aminoterminus besitzen NB-LRR-Proteine typischerweise entweder eine TIR- oder eine CC-Domäne (Dangl und Jones, 2001). Während in Dikotyledonen NB-LRR-Proteine mit aminoterminalen TIR- oder CC-Domänen vorkommen, sind in monokotyledonen Pflanzen nur CC-NB-LRR-Proteine bekannt (Pan et al., 2000; Cannon et al., 2002). Dies deutet auf eine divergente Evolution der beiden Gruppen und einen Verlust von TIR-NB-LRR-Sequenzen in der frühen Entwicklung der Monokotyledonen hin (Pan et al., 2000; Cannon et al., 2002). Andere kleinere Gruppen von R-Proteinen beinhalten Rezeptor-ähnliche Proteine mit extrazellulärem LRR und strukturell nicht verwandte Proteine (Dangl und Jones, 2001).

In verschiedenen Mutantenmusterungen wurden Faktoren gefunden, von denen die Funktion von R-Proteinen genetisch abhängig sind (Nimchuk et al., 2003). So ist die Mehrzahl von TIR-NB-LRR-Proteinen abhängig von EDS1 und PAD4, die meisten CC-NB-LRR-Proteine von NDR1 (Nimchuk et al., 2003). EDS1 und PAD4 bilden zusammen mit SAG101 eine Familie Lipase-ähnlicher Proteine unbekannter biochemischer Funktion, die sowohl in die Funktion von R-Proteinen, als auch in die PAMP-vermittelte Resistenz involviert sind (Parker et al., 1996; Glazebrook et al., 1997; Falk et al., 1999; Jirage et al., 1999; Feys et al., 2005). EDS1 interagiert mit PAD4 und SAG101 und zumindest EDS1 und SAG101 wirken stromaufwärts der Salizylsäure(SA)-Akkumulation, die für eine effiziente lokale und systemische Resistenzantwort benötigt wird (Zhou et al., 1998; Feys et al., 2001; Rusterucci et al., 2001). NDR1 ist ein Plasmamembran-lokalisiertes Protein unbekannter Funktion, das einen Glycosylphosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker besitzt und stark posttranslational modifiziert wird (Coppinger et al., 2004).

Während die Funktion dieser Proteine noch weitgehend im Dunkeln liegt, ist über andere Faktoren in der NB-LRR-Protein-vermittelten Resistenz schon deutlich mehr bekannt. Es wurde gezeigt, dass zytosolisches HSP90 für die Funktion verschiedener R-Proteine benötigt wird (Hubert et al., 2003; Lu et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Liu et al., 2004b; Zhang et al., 2004). Das deutet darauf hin, dass HSP90 eine generelle Rolle in der Funktion von R-Proteinen spielt. HSP90 ist ein Chaperone mit ATPase-Aktivität, das mit zwei anderen pflanzlichen Proteinen, RAR1 und SGT1 interagiert (Takahashi et al., 2003). RAR1 und SGT1 interagieren auch miteinander und werden genetisch für die Funktion der meisten untersuchten R-Proteine benötigt (Jorgensen, 1996; Azevedo et al., 2002; Muskett et al., 2002; Muskett und Parker, 2003; Takahashi et al., 2003). RAR1 wurde ursprünglich als Gen identifiziert, das für die *Mla12*-vermittelte Resistenz von Gerste gegen Gerstenmehltau essentiell ist (Freialdenhoven et al., 1994). Da es für die Akkumulation verschiedener R-Proteine notwendig ist und das RAR1-Homolog in Tieren, *chp*, eine Struktur mit Ähnlichkeit zu Co-Chaperonen besitzt, ist anzunehmen, dass RAR1 auch als ein Co-Chaperon wirkt (Shirasu et al., 1999; Tornero et al., 2002b; Lu et al., 2003; Shirasu und Schulze-Lefert, 2003; Bieri et al., 2004). SGT1 wurde ursprünglich in Hefe als ein Protein identifiziert, das essentiell für die Assemblierung des inneren Kinetochorkomplexes ist und mit dem Skp1/Cdc53/F-Box-Protein(SCF)-Komplex assoziiert, der eine E3-Ubiquitin-Ligase darstellt (Kitagawa et al., 1999). Weitere Arbeiten zeigen, dass es für die Funktion verschiedener LRR-enthaltender Proteine, darunter viele R-Proteine, essentiell ist und zumindest in Tieren eine Funktion als Co-Chaperone besitzt (Austin et al., 2002; Dubacq et al., 2002; Tor et al., 2002; Bansal et al., 2004; Lee et al., 2004; Lingelbach und Kaplan, 2004; Leister et al., 2005; Wu et al., 2005). Auf der Basis dieser Daten wurde postuliert, dass HSP90 und seine potentiellen Co-Chaperone RAR1 und SGT1 direkt in die Faltung von R-Proteinen und/oder R-Protein-enthaltenden Komplexen involviert sind (Schulze-Lefert, 2004a).

In die PAMP-vermittelten und in die rassenspezifischen Resistenzantworten sind ähnliche Signalkomponenten involviert. Sowohl veränderte Ca^{2+} -Konzentrationen, als auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROI) und NO konnten als induzierte Signale

festgestellt werden (Nürnberg et al., 2004). So wurde gezeigt, dass die Erkennung des PAMPs Pep13, einem konservierten Peptid aus einem Glykoprotein der Zellwand von *Phytophthora sojae*, Ca^{2+} -Kanäle aktiviert und sich durch als Antwort auf PAMP-Erkennung zytosolische Ca^{2+} -Konzentration erhöhen (Zimmermann et al., 1997; Lecourieux et al., 2002). ROI haben eine direkte antimikrobielle Wirkung, tragen aber auch zur strukturellen Verstärkung der Zellwände bei und induzieren späte Ereignisse der Resistenzreaktion wie z.B. SA-abhängige Signalwege (Scheel, 1998; Rusterucci et al., 2001; Nimchuk et al., 2003; Nürnberg et al., 2004). Neueste Ergebnisse legen nahe, dass ROIs auch in der Begrenzung der Zelltodreaktion beteiligt sein können (Torres et al., 2005). Der Einfluss von NO konnte verschiedenen Systemen nachgewiesen werden (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). Aktuelle Daten zeigen, dass AtNOS1, eine pflanzliche Stickoxidsynthase, für die PAMP-vermittelte Resistenz in *A. thaliana* benötigt wird (Zeidler et al., 2004). Ein positiver Rückkopplungsmechanismus, der sowohl die Produktion von ROI, als auch von NO und SA involviert, scheint ein zentraler Punkt für die Aktivierung der Resistenzantwort zu sein (Nimchuk et al., 2003). Das Auslösen einer lokalen Resistenzantwort führt außerdem Aktivierung der systemisch erworbenen Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR), die in der ganzen Pflanze gegen ein weites Spektrum von Pathogenen wirkt (Durrant und Dong, 2004). Es ist wahrscheinlich, dass nicht nur einige induzierte Komponenten, sondern der ganze Abwehrmechanismus sehr ähnlich verläuft. Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass sich die meisten Unterschiede in Transkriptionsprofilen in der kompatiblen und inkompatiblen Interaktion quantitativ erklären lassen (Tao et al., 2003; Navarro et al., 2004). Dies lässt darauf schließen, dass sowohl die PAMP-vermittelte, als auch die rassenspezifische Resistenz zumindest teilweise dieselben Signaltransduktionswege benutzen, dass aber in der rassenspezifischen Resistenz die Amplitude dieser Reaktion sehr viel stärker ist.

1.3. Mehltaupilze als Pflanzenpathogene

Echter Mehltau ist eine weit verbreitete Pilzkrankheit und kann in Getreide Ertragsverluste von bis zu 30% verursachen (Hückelhoven, 2005). Mehltau ist ein obligat

biotropher Askomyzete aus der Ordnung der *Erysiphales*, die aus nur einer Familie, den echten Mehltaupilzen, *Erysiphaceae* besteht (Hückelhoven, 2005). Die *Erysiphaceae* werden in 5 Stämme, *Erysipheae*, *Golovinomycetinae*, *Cystotheceae*, *Phyllactinieae* und *Blumerieae*, sowie weitere Unterstämme und mehr als zehn Genera unterteilt (Braun et al., 2002).

Mehltaupilze sind obligat biotrophe Parasiten, die nur epidermale Zellen oberirdischer Organe befallen (Hückelhoven, 2005; Zhang et al., 2005). Der Kontakt einer Konidiospore mit einer Blattoberfläche löst den Keimungsvorgang aus, bei dem sich je nach Genus ein bis zwei Keimschläuche bilden (Green et al., 2002). Der so genannte appressorielle Keimschlauch schwillt am Ende an und differenziert ein Appressorium (Green et al., 2002). Dieses ist ein essentielles Organ für die Penetration der Kutikula und der Zellwand (Green et al., 2002). Mit Hilfe mechanischer und enzymatischer Prozesse wird die Zellwand durchstoßen (Green et al., 2002). Nach dem Durchdringen der Zellwand bildet der Pilz ein Haustorium, was von der Zellmembran des Wirts umgeben ist, so dass die Wirtszelle intakt bleibt (Plasmamembran-Invagination) (Green et al., 2002). Das Haustorium ist ein Ernährungsorgan, das den Pilz mit Nährstoffen versorgt (Green et al., 2002). Als obligat biotropher Pilz verhindert Mehltau aktiv den Tod der Wirtszelle, was zum „Grüne-Insel-Effekt“ führt (Hückelhoven, 2005). Infizierte Zellen werden zu Mangelgeweben, die aktiv mit Nährstoffen versorgt werden müssen (Hückelhoven, 2005). So werden in *A. thaliana* in infiziertem Geweben eine Invertase und ein Zuckertransporter exprimiert, ähnlich wie in anderem Mangelgewebe (Fotopoulos et al., 2003).

1.4. Die MLA-vermittelte Resistenz von Gerste gegen Gerstenmehltau *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* als Modellsystem für die rassenspezifisch Resistenz

Gerste (*Hordeum vulgare* L.) ist ein Gras aus der Familie der *Pocaceae*. Gerste kann als diploide Modellpflanze für den hexaploiden, aber wirtschaftlich wesentlich bedeutenderen Weizen angesehen werden. Da Mehltau bei Getreide große Ernteaufälle

verursachen kann (vgl. 1.3.), ist die Erforschung des Systems Gerste-Gerstenmehltau von besonderem Interesse.

Gerstenmehltau, *Blumeria graminis* (DC Speer) f.sp. *hordei* (Marchal), kurz *Bgh*, ist ein typischer Mehltaupilz. Nach der Landung einer Conidiospore auf deinem Blatt, entwickelt sich nach ungefähr 1h ein primärer Keimschlauch für die Adhäsion und die Erkennung des Wirts und nach 8-10h ein appressorieller Keimschlauch (Zhang et al., 2005). Das sich daraus differenzierende Appressorium dient der Penetration der Kutikula und der Zellwand (Zhang et al., 2005). Nach dem erfolgreichen Eindringen in die Zelle entwickelt der Pilz nach 15-18h ein Haustorium, ein Ernährungsorgan, das von der intakten Plasmamembran des Wirts umschlossen ist (Zhang et al., 2005). Über dieses Haustorium werden Monosaccharide aufgenommen (Sutton et al., 1999). Nach ungefähr 24h entwickeln sich die ersten sekundären Haustorien, nach 3 Tagen beginnt die Mehltaukolonie mit der Entwicklung von asexuellen Konidiosporen (Zhang et al., 2005). Sexuelle Sporen werden nur in Kleistothecien auf alternden Blättern produziert und dienen als Dauerstadien (Zhang et al., 2005).

Verschiedene Resistenzloci gegen Mehltau wurden in kultivierten und wilden Gerstenrassen identifiziert (Jorgensen und Wolfe, 1994; Schönfeld et al., 1994). Der *Mla* (*mildew resistance locus a*)-Locus vermittelt rassenspezifische Resistenz gegen spezifische Isolate des Gerstenmehltaus. 28 verschiedene *Mla*-Spezifitäten wurden in diesem Locus kartiert (Jorgensen und Wolfe, 1994). Sechs davon wurden bisher molekular isoliert (*Mla1*, *Mla6*, *Mla7*, *Mla10*, *Mla12* und *Mla13*; Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001; Halterman et al., 2003; Shen et al., 2003; Halterman und Wise, 2004). Sie kodieren für typische CC-NB-LRR-Proteine mit einer einzigartigen carboxyterminalen Domäne (CT) von ungefähr 100 Aminosäuren, die keine Ähnlichkeit mit anderen publizierten Proteinsequenzen erkennen lässt. Die bekannten Sequenzen zeigen auf Proteinebene ungefähr 97% Identität in der CC- und NB-Domäne, die Identität sinkt dann bis auf 80% in der LRR-CT-Region. Trotz dieser hohen Sequenzähnlichkeit, unterscheiden sich MLA-Proteine in ihrer funktionellen Abhängigkeit von RAR1 und SGT1 (Jorgensen, 1996; Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001). So ist die MLA6-

vermittelte Resistenz abhängig von RAR1, während die MLA1-vermittelte Resistenz nicht ist (Haltermann et al., 2001; Zhou et al., 2001). Das ist überraschend, da die Abhängigkeit von RAR1 und SGT1 für verschiedene unterschiedliche R-Proteine konserviert ist. Neueste Ergebnisse zeigen, dass RAR1 die Akkumulation von MLA in der Abwesenheit des Pathogens kontrolliert (Bieri et al., 2004). Interessanterweise ist sowohl die Abundanz von MLA6, als auch von MLA1 durch RAR1 positiv beeinflusst (Bieri et al., 2004). Da die Akkumulation von MLA ungefähr viermal so hoch wie die von MLA6 und die Menge von MLA1 in der *rar1*-Mutante ungefähr so hoch wie die Menge von MLA6 im Wildtyp-Hintergrund war, kann man daraus schließen, dass ein bestimmter Schwellenwert an R-Protein erreicht werden muss, um eine effektive Resistenzantwort auslösen zu können (*threshold model*) (Bieri et al., 2004). In chimären MLA-Proteinen konnten MLA6-Spezifität von der RAR1- und SGT1-Abhängigkeit entkoppelt werden (Shen et al., 2003). Dabei akkumuliert die RAR1-unabhängige Variante deutlich höher als die RAR1-abhängige Form (Bieri et al., 2004). Dies ist mit den für MLA1 und MLA6 gefundenen Daten konsistent.

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Ein Hauptziel der Phytopathologie ist es, die molekularen Mechanismen der Pathogenerkennung und die damit verknüpften Signalwege, die zu Resistenz führen, aufzudecken. R-Proteine dienen als Rezeptoren in der Pathogenerkennung, weswegen sie von besonderem Interesse sind. Während genetische Abhängigkeiten verschiedener R-Gene relativ gut untersucht sind, sind ihre biochemischen Eigenschaften noch kaum untersucht.

Der *Mla*-Locus kodiert für eine allelische Reihe von R-Proteinen vom CC-NB-LRR-Typ in der bedeutenden Kulturpflanze Gerste. Ziel dieser Arbeit war die biochemische Charakterisierung von MLA1 und MLA6 *in planta*. Zu diesem Zweck wurden homozygote transgene Linien hergestellt, die entweder MLA1 oder MLA6 mit einer myc- oder HA-Markierung enthielten.

Eine Grundlage für das Verständnis der MLA-Funktion sollte die Untersuchung seiner Expression *in planta* und seiner subzellulären Lokalisation bilden. Die indirekte Erkennung impliziert einen präformierten Erkennungskomplex. Mittels nativer Trennungsvorgänge sollte dieser Komplex *in planta* untersucht werden. Zusätzlich sollte die Interaktion von MLA mit anderen Proteinen geprüft werden. Besonderes Interesse galt dabei RAR1, SGT1 und HSP90, da bekannt ist, dass verschiedene *Mla*-Resistenzspezifitäten genetisch davon abhängig sind (Jorgensen, 1996; Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001; Hein et al., 2005). Des Weiteren sollte die posttranslationale Regulation untersucht werden, da SGT1 eine mögliche Verbindung zum Proteasom darstellt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Pflanzenmaterial

2.1.1.1. *Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*

In dieser Arbeit wurde Gerste (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare*) des Kultivars (cv.) *Golden Promise* und der *rar1-2* Mutante M100 im Kultivars *Sultan5* verwendet (vgl. Tabelle 1). Zur Kultivierung der Gerstenmehltauisolate wurde Pallas 01 und Ingrid 10 verwendet (vgl. Tabelle 1).

Kultivar/Mutante	Mutation	<i>Mla</i> -Allel	Referenz/Bezugsquelle
<i>Golden Promise</i>	-	-	Milns Masters, Chester, England
<i>Sultan5</i>	-	<i>Mla12</i>	Torp und Jorgensen, 1986
<i>Sultan5</i> M100	<i>rar1-2</i>	<i>Mla12</i>	Torp und Jorgensen, 1986; Freialdenhoven et al., 1994
Pallas 01	-	<i>Mla1</i>	Kolster et al., 1986
Ingrid 10	-	<i>Mla12</i>	Svalöf Weibulls AB, Svalöv, Sweden

Tabelle 1: Verwendete Gerstenkultivare und Mutanten

2.1.1.2. *Arabidopsis thaliana*

An *Arabidopsis*-Pflanzen wurden der Ökotyp Col-0 aus dem *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC) sowie die Mutante *rar1-20* und die Doppelmutante *pad4 sag101* benutzt (vgl. Tabelle 2).

Ökotyp	Mutation	Referenz/Bezugsquelle
Col-0	-	<i>Nottingham Arabidopsis Stock Center</i> (NASC)
Col-0	<i>rar1-20</i>	Warren et al., 1999; Tornero et al., 2002b
Col-0	<i>pad4 sag101</i>	Dittgen, 2005

Tabelle 2: Benutzte Ökotypen und Mutanten von *A. thaliana*

2.1.2. Gerstenmehltau *Blumeria graminis f. sp. hordei*

Zwei Isolate von Gerstenmehltau wurden verwendet, A6 und K1 (vgl. Tabelle 3):

Isolat	Bekannte Effektoren	Referenz
A6	<i>AvrMla1, AvrMla3, AvrMla7, AvrMla13, AvrMla22, AvrMILa, AvrMI(Ab)</i>	Shen, 2004
K1	<i>AvrMla3, AvrMla6, AvrMla9, AvrMla10, AvrMla12, AvrMla13, AvrMlg, AvrMI(CP), AvrMIH, AvrMIK1, AvrMILa, AvrMI(Ab)</i>	Shen, 2004

Tabelle 3: Gerstenmehltauisolate, ihre Avirulenz- und Virulenzgene

2.1.3 Bakterienstämme

2.1.3.1. *Escherichia coli*

Für die Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α benutzt (vgl. Tabelle 4). Für die Expression von Protein wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta benutzt (vgl. Tabelle 4).

2.1.3.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Für die Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde der *A. tumefaciens*-Stamm GV3101 benutzt (vgl. Tabelle 4).

Bakterium	Stamm	Genotyp	Referenz/Bezugsquelle
<i>E. coli</i>	DH5 α	F- Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i>	Rosetta	pLysS, zusätzliche tRNA-Codons	Mike Böhmer, persönliche Mitteilung
<i>A. tumefaciens</i>	GV3101	pMP90:RK	Koncz und Schell, 1986

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme von *E. coli* und *A. tumefaciens*

2.1.4. Vektoren

Verschiedene Vektoren wurden in dieser Arbeit benutzt (vgl. Tabelle 5).

Vektorname	Zweck	Referenz/Bezugsquelle
pTNT	Expression von Proteinen <i>in vitro</i> in Weizenkeimextrakt	Promega, Mannheim
pJawohl2	Transformation von <i>Arabidopsis</i>	B. Ülker, nicht publizierte Daten
pGEX-6p-1	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	GE Healthcare, Freiburg

Tabelle 5: Verwendete Vektoren

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden entweder von Invitrogen, Karlsruhe, Operon, Köln, oder Sigma, Steinheim, synthetisiert.

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Zweck
Fce04	CGAGCTTTGTATGCTGAAGC GACAG	vorwärts	Mla Sequenzierprimer
GEX 3	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG	rückwärts	Amersham Pharmazia, Freiburg pGEX 3' Sequenzierprimer
GEX 5	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG	vorwärts	Amersham Pharmazia, Freiburg pGEX 5' Sequenzierprimer
Mla P1S	CTTTCAGCTATTCTAATCTA CCTTC	vorwärts	Mla Sequenzierprimer
Mla P5S	AGTTTTTGGAGGTGTTGGAT CTTG	vorwärts	Mla Sequenzierprimer
S019	CGCATGCGGCCGCTCAAGCG TAATCTGGAACATCGTATGG GTACTCTGTGCTTCAGCAT A	rückwärts	Klonierung einer HA-Markierung, eines Stopcodons und einer Notl- Schnittstelle 5' der CC-Domäne nach Aminosäure 166 von MLA

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Zweck
S020	CGCATGCGGCCGCTCAAGCG TAATCTGGAACATCGTATGG GTACCTTGAAAGAGATGGCA TGA	rückwärts	Klonierung einer HA-Markierung, eines Stopcodons und einer NotI- Schnittstelle 5' der NB-Domäne nach Aminosäure von MLA
S115	CCGATGAATTCATGGATATT GTCACCGGTGCCATTT	vorwärts	Klonierung von EcoRI 3' von <i>Mla</i>
S117	CGCATGCGGCCGCTTAATTG ATGTCCCTGGTTCG	rückwärts	Klonierung eines Stopcodons und NotI-Schnittstelle 3' von HvWRKY1
S119	CGCATGCGGCCGCTCAAGCA ACAGGGATCCGAC	rückwärts	Klonierung eines Stopcodons und NotI-Schnittstelle 3' von HvWRKY2
SM07	GGCGGCCATGAAACTATGA TCGAGGTT	vorwärts	Klonierung von AscI 5' des <i>rpm1</i> - Promoters
SM09	AGCAGTTTAAACCCGTGTTG	vorwärts	Sequenzierung im <i>rpm1</i> -Promoter
SM10	CTTCTACAAATGCCATCATT	vorwärts	Sequenzierung im 35S-Promoter
SM11	ATAGTTTAGCGGCCGCTCA AGCGTAGTCTGGGACGTCGT ATGGGTAGGCAGCGTTCATG CTCTCAA	rückwärts	Klonierung von HA-Markierung und NotI 3' des CC-Fragments (1- 46) von MLA
SM15	GAGCATGAACGCTGCCCTCA TCAGGATTGGTGAGGTGCCG AGGGAG	vorwärts	MLA1 Punktmutation K49R
SM16	CTCCCTCGGCACCTCACCAA TCCTGATGAGGGCAGCGTTC ATGCTC	rückwärts	MLA1 Punktmutation K49R
SM17	GAGCTAGTTGGCATATATGG AAGGAGGGATCAAGACCTCA TGAGGTTG	vorwärts	MLA1 Punktmutation K173R
SM18	CAACCTCATGAGGTCTTGAT CCCTCCTTCCATATATGCCA ACTAGCTC	rückwärts	MLA1 Punktmutation K173R
SM19	GAGCGGTATACGAGAAGATT AGAGGTGATTTGATTGTCG GGCTTTTG	vorwärts	MLA1 Punktmutation K219R
SM20	CAAAAGCCCGACAATCGAAA TCACCTCTAATCTTCTCGTA TACCGCTC	rückwärts	MLA1 Punktmutation K219R

Name	Sequenz 5' → 3'	Orientierung	Zweck
SM21	GTGGAGCGAGGGTTGGGGAG GCAAGGGAAGCGGAGGCTGC GGTGAGG	vorwärts	MLA1 Punktmutation K916R
SM22	CCTCACCGCAGCCTCCGCTT CCCTTGCCTCCCCAACCTC GCTCCAC	rückwärts	MLA1 Punktmutation K916R
SM23	CCGCTCGAGCGGCTTCCTCA GAGTCTCGCTTG	rückwärts	Klonierung von XhoI Schnittstelle 3' von <i>rpm1</i> -Promoter
SM24	CCCTCAAGACCCGTTTAGAG GCCCC	rückwärts	Sequenzierung von pTNT von 3' des Inserts
SM25	GGAATTCCGGATGGAGGAGC AGTGGATGATCGGGC	vorwärts	Klonierung von EcoRI 5' von HvWRKY2, im richtigen Leseraster für pGEX-6p-1
SM26	GGAATTCCGGATGGATCCAT GGATGGGCAGCCAG	vorwärts	Klonierung von EcoRI 5' von HvWRKY1, im richtigen Leseraster für pGEX-6p-1
SM27	GGAATTCCGGATGCTCAGCC TCGTGGTGAAGGATGGG	vorwärts	Klonierung von EcoRI und ATG 5' von der N-terminalen Deletion von HvWRKY2, im richtigen Leseraster für pGEX-6p-1
Spa06	GTGAAGGACGTGCAGCAGGA TG	vorwärts	Mla Sequenzierprimer
Sbi 101	GAGCGGTATACGAGAAGATT A	rückwärts	Mla Sequenzierprimer
T7m1	ATTAATACGACTCACTATAGG	vorwärts	pTNT Sequenzierprimer

Tabelle 6: Benutzte Oligonukleotide

2.1.6. Enzyme

2.1.6.1. Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen von Roche, Mannheim, oder New England Biolabs, Frankfurt, wurden zusammen mit den zugehörigen 10x-Puffern benutzt.

2.1.6.2. Sonstige kommerzielle Enzyme

Die kommerziellen Enzyme wurden zusammen mit den zugehörigen Puffern eingesetzt (vgl. Tabelle 7). Für *Taq* wurde 10x-Puffer von Roche, Mannheim, benutzt.

Name	Bezugsquelle
Lysozym	Roche, Mannheim
<i>Pfu</i> DNA polymerase	Stratagene, Heidelberg
RNase	Sigma, Steinheim
RNase H	New England Biolabs, Frankfurt
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Roche, Mannheim
SuperScript™ II, Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Eigene Herstellung
T4 DNA Ligase	Roche, Mannheim

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

2.1.7. Chemikalien

2.1.7.1. Antibiotika

Antibiotika-Stammlösungen (1000x) wurden in den angegebenen Konzentrationen hergestellt und bei -20 °C gelagert (vgl. Tabelle 8).

Name	Konzentration	Bezugsquelle
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml in H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin (Carb)	50 mg/ml in H ₂ O	Sigma, Steinheim
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml in H ₂ O	Serva, Heidelberg
Rifampicin (Rif)	100 mg/ml in DMSO	Fluka, Buchs, Schweiz

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika

2.1.7.2. Sonstige Chemikalien

Bezeichnung	Spezifikation	Bezugsquelle
1 kb DNA-Größenmarker	1 kb DNA ladder, 1 µg/µl	Invitrogen, Karlsruhe
Aceton	p. a.	Merck, Darmstadt
Acrylamid	Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose	SeaKem® LE Agarose for gel electrophoresis	Cambrex Bio Science, Rockland, USA
Aminocapronsäure	ε-Amino-n-Capronsäure >99 %	Sigma, Steinheim
Ammoniumacetat	p.a.	Merck, Darmstadt
APS	Ammoniumperoxodisulfat, reinst	Roth, Karlsruhe
Ascorbinsäure	L-Ascorbinsäure	Sigma, Steinheim
Bactoagar	Bacto™ Agar	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
BASTA	Basta	Basta, Bayer Crop Science
Benzimidazol	Zur Synthese	Merck, Darmstadt
Bistris	BIS-TRIS, >98 %	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CaCl ₂	Kalziumchlorid, Dihydrat	Merck, Darmstadt
Coomassie	Coomassie® Brilliant Blue G250	Fluka, Buchs, Schweiz
dATP	dATP (2-deoxyadenosin-5'-triphosphat)	Roth, Karlsruhe
dCTP	dCTP (2-deoxycytidin-5'-triphosphat)	Roth, Karlsruhe
dGTP	dGTP (2-deoxyguanosin-5'-triphosphat)	Roth, Karlsruhe
DMSO	Dimethylsulfoxid (DMSO), getrocknet	Merck, Darmstadt
Dodecylmaltosid	n-Dodecyl β-D-maltoside	Sigma, Steinheim
DTT	Dithiothreitol	Roth, Karlsruhe
dTTP	dTTP (2-deoxythymidin-5'-triphosphat)	Roth, Karlsruhe
EDTA	Ethylendiamintetraacetat; Titriplex® III	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Spezifikation	Bezugsquelle
Essigsäure	Essigsäure (Eisessig), 100 %, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Ethanol	Ethanol, 96 %	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Ethidiumbromid-Lösung, 1 % (10 mg/ml) Stammlösung	Roth, Karlsruhe
Fleischextrakt	Trocken, für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
Glycerin	Glycerin, wasserfrei, reinst	Merck, Darmstadt
Glycin	p. a.	Merck, Darmstadt
GSH	Gluthathion	Duchefa, Haarlem, Holland
Harnstoff	p. a.	Merck, Darmstadt
HCl	Salzsäure 32 %, p. a.	Merck, Darmstadt
Hefeextrakt	Bacto™ Yeast Extract	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
HEPES	>99,5 %	Merck, Darmstadt
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	2-Propanol, p. a.	Merck, Darmstadt
Kaliumacetat	reinst	Merck, Darmstadt
KOH	Kaliumhydroxid-Plätzchen, p. a.	Merck, Darmstadt
MG115	Z-Leu-Leu-Nva-H	Peptides International, Louisville
MG132	Z-Leu-Leu-Leu-H	Peptides International, Louisville
MgCl ₂	Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p. a.	Merck, Darmstadt
Milch	Milchpulver, Blotting grade	Roth, Karlsruhe
MnCl ₂	Manganchlorid-Tetrahydrate p. a.	Sigma, Steinheim
MOPS	3-(N-Morpholino)propane-sulfonsäure	Biomol, Hamburg
NaCl	Natriumchlorid, p. a.	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Spezifikation	Bezugsquelle
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumlaurylsarkosinat	Natriumlaurylsarkosinat	Sigma, Steinheim
NaOH	Natriumhydroxid-Plätzchen, p. a.	Merck, Darmstadt
Pepton	Bacto™ Peptone No. 3	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Phenol-Chloroform 1:1	Roti®-Phenol/C/I	Roth, Karlsruhe
Ponceau Rot	Ponceau S	Serva, Heidelberg
Proteinaseinhibitor Cocktail	Proteinaseinhibitor Cocktail Complete, EDTA-frei	Roche, Mannheim
RbCl	Rubidiumchlorid	Sigma, Steinheim
Saccharose	Saccharose, für die Mikrobiologie	Merck, Darmstadt
SDS	SDS / Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe
Silwet L-77	VAC-IN-STUFF (Silwet L-77)	Lehle Seeds, Round Rock, USA
TCA	Trichloressigsäure	Sigma, Steinheim
TEMED	N, N, N', N'-Tetra-methylethylendiamid	BIO-RAD, Hercules, USA
TRI-Reagenz	TRI® Reagent	Sigma, Steinheim
Tricin	TRICIN >99 %	Roth, Karlsruhe
TRIS	UltraPure™ Tris Hydrochloride	Invitrogen, Karlsruhe
Triton X-100	Rein	Serva, Heidelberg
Trypton	Bacto™ Tryptone	Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA
Tween 20	Tween® 20	Sigma, Steinheim
Xylenzyanol	Xylene Cyanole FF	Sigma, Steinheim

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien

2.1.7.3. Lösungen und Medien

Der pH-Wert sämtlicher Lösungen und Medien wurde mit HCl oder NaOH eingestellt, sofern nichts anderes angegeben ist.

Luria Bertani (LB)-Medium (pro Liter)

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
(Bactoagar	1,5 % (w/v) für Platten)

YEB-Medium

Fleischextrakt	0,5 % (w/v)
Hefeextrakt	0,1 % (w/v)
Pepton	0,5 % (w/v)
Saccharose	0,5 % (w/v)
pH 7,2	
(Bactoagar	1,5% (w/v) für Platten)

2.1.8. Antikörper

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Referenz/Bezugsquelle
α -HA	Ratte, monoklonal	1:5.000	Roche, Mannheim
α -HA-Matrix	Ratte, monoklonal	-	Roche, Mannheim
α -RAR1	Ratte, polyklonal	1:2.500	Azevedo et al., 2002
α -SGT1	Kaninchen, polyklonal	1:10.000	Azevedo et al., 2002
α -HSP90	Ratte, polyklonal	1:10.000	Takahashi et al., 2003

Antikörper	Herkunft	Konzentration	Referenz/Bezugsquelle
α -WRKY all	Kaninchen, polyklonal	1:5.000	Türck et al., 2004
α -GST	Ziege, polyklonal	1:3.000	GE Healthcare, Freiburg

Tabelle 10: Primäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Konzentration	Bezugsquelle
α -Ratte	Meerrettichperoxidase	1:5.000- 1:10.000	Sigma, Steinheim
α -Kaninchen	Meerrettichperoxidase	1:5.000- 1:10.000	Sigma, Steinheim
α -Ziege	Meerrettichperoxidase	1:10.000	Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper

2.1.9. Computerprogramme, Datenbanken und sonstige Internetressourcen

2.1.9.1. Programme zur DNA-Analyse

Entwurf und Verarbeitung von Plasmiden

Clone Manager 6, Version 6.00 (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA)

Alignment von DNA-Sequenzen

Align (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>)

Analyse der Sequenzierchromatogramme

Chromas Pro (Version 1.22) (Technelysium Pty Ltd, Tewantin Qld, Australia)

2.1.9.2. Programme und Internetressourcen zur Analyse von Proteindaten

Generelle Charakterisierung

Expasy Proteomics Server (<http://www.expasy.org/>)

Alignment von Proteinen

ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)

Bestimmung von Sumoylierungsstellen (Gramatikoff, 2004)

SUMOplot (<http://www.abgent.com/doc/sumoplot>)

Datenbank für Protein- und Gensequenzen

National Center for Biotechnology Information (NCBI)

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

2.2. Anzucht der Versuchspflanzen und Kultivierung der Pathogene

2.2.1. Anzucht von *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis-Pflanzen wurden in einem Torfsubstratmix (Stender Substrate, Wesel-Scharmbeck) mit Zusatz von 0,001 % Confidor WG70 (Bayer, Leverkusen) zum Schutz vor Fliegenlarven angezogen. Um eine möglichst gleichmäßige Keimung zu erreichen, wurden die Pflanzen nach der Aussaat zunächst mit einer durchsichtigen Abdeckung drei Tage im Dunkeln bei 4 °C gelagert (Stratifikation). Die Keimung wurde anschließend durch Licht und Lagerung bei 20-23 °C induziert (vgl. Tabelle 12). Der Deckel wurde nach der Keimung weggenommen. Nach zwei bis drei Wochen wurden die Pflanzen pikiert, sodass fünf bis neun Pflanzen pro Topf wuchsen.

2.2.2. Anzucht von Gerste

Die Pflanzen wurden für Experimente in einer Percivalkammer unter Standardbedingungen in Erde angezogen (vgl. Tabelle 12). Für die Vermehrung wurden die Pflanzen im Gewächshaus angezogen bzw. dahin überführt (vgl. Tabelle 12).

Pflanze	Stadium	Photoperiode	T _{Tag} [°C]	T _{Nacht} [°C]	Rel. LF. [%]
<i>Arabidopsis</i>	Stratifikation	0 h Licht, 24 h Dunkel	4	4	Variabel
<i>Arabidopsis</i>	Keimung/ 1 Woche	12h Licht, 12 h Dunkel	23	20	60
<i>Arabidopsis</i>	Wachstum/3 Wochen	12 h Licht, 12 h Dunkel	22	22	70
<i>Arabidopsis</i>	Blühinduktion und Blüte	~16h Licht, ~8 h Dunkel	Variabel	Variabel	Variabel
Gerste	Keimung/ 1 Woche	16 h Licht, 8 h Dunkel	20	18	70
Gerste	Inokulation/ 1 Woche	16 h Licht, 8 h Dunkel	21	21	70
Gerste	Vermehrung	Variabel	Variabel	Variabel	Variabel

Pflanze	Stadium	Photoperiode	T_{Tag} [°C]	T_{Nacht} [°C]	Rel. LF. [%]
Gerste	Temperaturschock	16h Licht, 8h Dunkel	vgl. 2.2.1.3.	vgl. 2.2.1.3.	Variabel
Gerste	Isolation von Wurzeln	12h Licht, 12h Dunkel	18	18	Variabel

Tabelle 12: Anzuchtbedingungen der verwendeten Pflanzen

2.2.2.1. Temperaturschockbehandlung von Gerstenpflanzen

Junge Gerstenpflanzen wurden nach einer Woche in identische Kammern mit unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 18 °C, 37 °C) überführt (vgl. Tabelle 12). Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen.

2.2.2.2. Kultivierung von Gerstenpflanzen zur Isolation von Wurzelgewebe

In Einmachgläsern wurde 0,5 % (w/v) Bactoagar in Wasser autoklaviert. Die Spelzen wurden von den Gerstensamen entfernt und diese dann fünf Minuten lang in 70% Äthanol inkubiert und anschließend getrocknet. Die sterilisierten Samen wurden gleichmäßig auf dem Agar verteilt und in einer Klimakammer zum Keimen inkubiert (vgl. Tabelle 12). Nach sieben Tagen wurden die Wurzeln geerntet.

2.2.3. Kultivierung von Gerstenmehltau

Gerstenmehltau wurde auf anfälligen Gerstenkultivaren in einer Klimakammer angezogen. Für das Pilzisolat A6 wurde Pallas 01 benutzt, für das Pilzisolat K1 Ingrid 10 (vgl. Tabelle 1, Tabelle 3). Gerstenkeimlinge wurden nach einer Woche mit dem Pilz inokuliert, nach einer weiteren Woche ist das Blattmaterial der Wirtspflanzen mit den Konidien sporulierender Mehлтаukolonien überzogen. Diese wurden dann zur Inokulation verwendet (vgl. 2.2.2.).

2.2.4. Inokulationsexperimente

Sämtliche Inokulationsexperimente wurden mit dem abgeschnittenen Primärblatt oder ganzen sieben Tage alten Gerstekeimlingen fünf bis zehn Tage nach Inokulation der

Wirtspflanzen durchgeführt. Um eine möglichst gleichmäßige Inokulationsdichte zu gewährleisten, wurden die Pflanzen unter einem speziell angefertigten Inokulationsturm platziert, durch dessen obere Öffnung die Sporen von den infizierten Wirtspflanzen abgeschüttelt wurden. Nach einer Minute hatten sich die Sporen auf den darunter befindlichen Blättern abgesetzt.

Für die Isolation homozygoter Linien wurde das Primärblatt abgeschnitten und auf eine Agarplatte (1 % Agar, 85 μ M Benzimidazol) gelegt. Diese Platte wurde dann wie beschrieben inokuliert und der Phänotyp nach einer Woche ausgewertet. Um den Phänotyp bestimmter Pflanzenlinien zu dokumentieren, wurden ganze Pflanzen inokuliert und diese nach einer Woche fotografiert.

2.2.5. Selektion homozygoter transgener Gerstenlinien

Um homozygote Linien der Transformanden mit nur einer Insertion zu isolieren, wurden die abgeschnittenen Primärblätter von T₁-Pflanzen auf Resistenz mit beiden Mehltausisolaten getestet. Die Primärblätter von jeweils 24 T₂-Nachkommen der resistenten T₁-Pflanzen wurden untersucht. Wenn keine Segregation mehr stattfand, sondern alle Nachkommen homozygot resistent gegen das zum Transgen korrespondierende Mehltausolat waren, wurde diese Linie als homozygot für das entsprechende *Mla*-Gen angesehen.

Für die Selektion der Kreuzungen mit *rar1-2* wurden für *rar1-2* homozygote Linien von Stéphane Bieri aus der F₁-, bzw. F₂-Generation übernommen und die F₂-, bzw. F₃-Nachkommen auf Resistenz getestet. Wenn keine Segregation mehr stattfand, sondern alle Nachkommen homozygot resistent waren, wurde diese Linie als homozygot für das entsprechende *Mla* angesehen.

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Manipulation von Nukleinsäuren

2.3.1.1. Polymerasekettenreaktion (PCR) von Plasmid- und genomischer DNA

Mit Hilfe der Taq-DNA-Polymerase 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 und Schritte mit verschiedenen Temperaturen durchlaufen (Sambrook et al., 1989). Das Volumen der PCR-Ansätze betrug 20-100 μ l. Es wurden folgende Bedingungen gewählt:

Reagenz	Menge
DNA (genomisch oder Plasmid)	20-50 ng
PCR-Puffer (10x; Roche, Mannheim)	1/10 des Reaktionsvolumens
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Je 0,2 mM
Oligoprimer, vorwärts	10 μ M
Oligoprimer, rückwärts	10 μ M
Taq-Polymerase	2,5 U
Wasser	Nach Bedarf

Tabelle 13: PCR-Reaktionsmix

Schritt	Status	Temperatur [°C]	Dauer
1	Anfängliche Denaturierung	94	30 sec
2	Denaturierung	94	30 sec
3	Anlagerung der Oligonukleotide	50-65	30 sec
4	Erweiterung	72	1-2 min
	Wiederholung Schritt 2-4	-	35x
5	Letzte Erweiterung	72	5 min

Tabelle 14: Temperaturprofil der PCR-Reaktion

2.3.1.2. PCR von *E. coli*-Kolonien

Für eine erste Selektion transformierter Bakterien wurde jeweils ein Teil der zu untersuchenden Kolonie mit einem PCR-Ansatz vermischt. Die PCR wurde wie in 2.3.1.1. für Plasmid- und genomische DNA beschrieben durchgeführt. Die anfängliche Denaturierungsphase wurde jedoch auf fünf Minuten verlängert.

2.3.1.3. Gezielte Punktmutagenese

Gezielte Punktmutagenese wurde mit dem QuikChange[®] site-directed mutagenesis Kit von Stratagene[®], Heidelberg, nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.1.4. Restriktionsverdau

Restriktionsverdaue wurden zur Vorbereitung für eine Ligation und zum Test transformierter Kulturen durchgeführt. Für alle Restriktionsverdaue wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen benutzt. Pro 10 µl wurden ~1 U Enzym eingesetzt. Die Verdaue wurden für mindestens eine Stunde bei der vom Hersteller angegebenen Temperatur inkubiert.

2.3.1.5. Dephosphorylierung

Um Ligation in den Herkunftsvektor zu verhindern, wurde das geschnittene Insert i. d. R. mit SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) am 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde die DNA mit SAP in Dephosphorylierungspuffer für mindestens zehn Minuten bei 37 °C inkubiert und danach das Enzym bei 60 °C für 30 Minuten hitzedeaktiviert.

Dephosphorylierungsansatz

DNA	1 pmol
Dephosphorylierungspuffer, 10x	2 µl
SAP	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl

2.3.1.6. Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmenten nach Verdau, Behandlung mit SAP oder ausgeschnitten aus Agarosegelen wurden mit dem Nucleo Spin Extract II (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

2.3.1.7. Ligation

Um Vektor und Insert zu ligieren, wurden sie mit T4-Ligase bei 16 °C über Nacht inkubiert.

Ligationsansatz

Insert	6 µl
Vektor	2 µl
T4-Ligase-Puffer, 10x	1 µl
T4-Ligase	1 µl

2.3.2. DNA-Analyse

2.3.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA zur Kontrolle von Transformationen (*Boiling Miniprep*)

Bakterien wurden in drei bis fünf Milliliter LB-Medium über Nacht auf einem Schüttler bei 37 °C und 200 rpm angezogen. Ein bis zwei Milliliter der Bakterienkultur wurden abgenommen und abzentrifugiert (1 min, 15.000 g, RT). Der Überstand wurde verworfen. Zum Pellet wurden 100 µl STETL-Puffer zugegeben und es darin resuspendiert. Die Lösung wurde für 30 Sekunden gekocht und dann in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (15 min, 15.000 g, RT). Das Pellet wurde mit einem Zahnstocher entfernt. Der Überstand wurde mit 100 µl Isopropanol gemischt, so die DNA gefällt und (15 min, 15.000 g, RT) abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde kurz getrocknet und dann in 25 – 50 µl Wasser mit RNase (0,1 mg/ml) aufgenommen.

STETL-Puffer

Saccharose	8 % (w/v)
Triton X-100	5 % (v/v)
EDTA	50 mM
Tris/HCl pH 8,0	50 mM
Lysozym, frisch zugegeben	0,5 g/ml

2.3.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Für verschiedene Experimente, z. B. Sequenzierung, *in vitro*-Expression mit Weizenkeimextrakt und Klonierungen, wird DNA von höherer Qualität benötigt, als man sie durch eine *Boiling Miniprep* erhalten kann. Deswegen wurde diese Experimente Plasmid mit einem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit (Peqlab, Erlangen) oder für größere Ansätze mit einem NucleoBondTM PC100 Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerinformationen aufgereinigt.

2.3.2.2. Isolierung von DNA aus Gerste

Junge Gerstenblätter wurden in Reaktionsgefäßen gesammelt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Blätter wurden unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 650 µl Harnstoffpuffer vermischt. Nach Zugabe von 500 µl Phenol-Chloroform (1:1) wurden die Gefäße für zehn Minuten waagrecht schüttelnd gemischt. Danach wurden sie abzentrifugiert (10 min, 15.000 g, RT). 500 µl des Überstandes wurden mit 50 µl Ammoniumacetatpuffer und 500 µl Isopropanol durch Invertieren gemischt und abzentrifugiert (5 min, 15.000 g, RT). Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in sterilem Wasser aufgenommen.

Harnstoffpuffer

Harnstoff	7 M
NaCl	0,35 M
Tris pH 8,0	50 mM
EDTA	20 mM
Natriumlauroylsarkosinat	1 % (w/v)

Ammoniumazetatpuffer

Eisessig (100 %)	27,5 % (v/v)
Ammoniumacetat (flüssig, Stammlösung >25%)	22,5 % (v/v) der Stammlösung

2.3.2.3. Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten zur Überprüfung auf vorhandene Mutationen wurde vom Automatischen DNA-Isolierung und Sequenzierungs-Service (ADIS) des Max-Planck-Instituts für Züchtungsforschung, Köln, (<http://adis.mpiz-koeln.mpg.de/>) durchgeführt. Dabei wurden die Sequenzierer Abi Prism 377 und 3700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) mit der *Big Dye-terminator*-Methode benutzt (Sanger et al., 1977).

2.3.2.4. Sequenzanalyse

Sequenzvergleiche und Analyse der Sequenzdaten erfolgten mit den unter 2.1.9.1. aufgeführten Programmen.

2.3.3. RNA-Analyse**2.3.3.1. RNA-Extraction (in Zusammenarbeit mit Francesca Ceron)**

Aufgrund der erhöhten Instabilität von RNA sowie der Gefahr der Degradation durch RNasen wurden 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 mit TRI-Reagenz durchgeführt. Die RNA-Extraktion aus Blattgewebe erfolgte verändert nach dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi, 1987):

Blattmaterial wurde unter flüssigem Stickstoff fein gemörsert. Ein Milliliter TRI-Reagenz wurde zugefügt und die Lösung für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugefügt, 15 Sekunden gemischt und drei Minuten bei RT inkubiert.

Das Gemisch wurde abzentrifugiert (15 min, 15.000 g, 4 °C). Die obere Phase wurde abgenommen, mit 500 µl Isopropanol gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die RNA zu fällen. Anschließend wurde es abzentrifugiert (10 min, 15.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet durch Zugabe von einem Milliliter eiskaltem 70% Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 15.000 g, RT). Das Pellet wurde an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 - 50 µl RNase-freiem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde es für zehn Minuten bei 60 °C inkubiert. Die auf diese Weise gewonnenen RNA-Proben können für einige Tage bzw. Wochen bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert werden.

2.3.3.2. Semiquantitative RT-PCR (in Zusammenarbeit mit Francesca Ceron)

Mittels RT-PCR kann die Transkriptionsaktivität von Genen über die Erfassung von deren Transkript-(mRNA-)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 auch die einer internen konstitutiv exprimierten Kontrolle untersucht.

Die reverse Transkription erfolgte nach folgendem Protokoll: Der Ansatz für die reverse Transkription wurde 10 min bei 70 °C inkubiert und dann sofort auf Eis gestellt. 4 µl Erststrangpuffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl 0,1 M dNTPs wurden zugefügt und die Mischung zwei Minuten auf 42°C inkubiert. Ein Mikroliter (200 U) Superskript II wurde zugefügt und zehn Minuten bei 25 °C, 50 Minuten bei 42 °C und 15 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurde ein Mikroliter (2 U) RNase H zugefügt und die RNA bei 37°C für 20 min verdaut. 1 µl des Ansatzes wurde dann für PCR benutzt.

Ansatz für reverse Transkription mit Invitrogen RT Superscript II

RNA	3 µg
Oligo dT-18 Nukleotid, 10 µM	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

2.3.4. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuremolekülen

Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden die PCR- bzw. RT-PCR-Produkte zunächst mit DNA-Ladepuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte in 0,7 % – 1 % Agarosegelen in DNA-Elektrophoresepuffer bei max. 200 V. Durch Interkalation des Ethidiumbromids in die Nukleinsäurefragmente werden diese auf dem UV-Transilluminator bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm sichtbar. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde ein Größenstandard (1 kb DNA-Marker) mit aufgetrennt.

6x DNA-Ladepuffer

Bromophenolblau	0.1 % (v/v)
Xylenzanol	0,1 % (v/v)
Glycerol	60 % (v/v)
EDTA, pH 8,0	60 mM

DNA-Größenmarker (50 ng/µl)

1Kb DNA-Größenmarker	50 µl
DNA-Ladepuffer (10x)	200 µl
H ₂ O	ad 1 ml

Agarosegel

Agarose	0,7 % – 1 % (w/v)
DNA-Gelelektrophoresepuffer	1x
Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)	0,02 %

DNA-Gelelektrophoresepuffer (TAE) (50x)

Tris	242 g
EDTA	18,6 g
Essigsäure	57,1 ml
H ₂ O	Ad 1 l
pH 8,5	

2.3.5. Transformation von Bakterienstämmen

2.3.5.1. Herstellung chemisch kompetenter Zelle des *E.coli*-Stammes DH5 α

100 Milliliter LB-Medium wurden mit einem Milliliter einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C für 2 Stunden und 225 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3 – 0,5 wurde die Kultur in Zentrifugenbecher überführt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, dann abzentrifugiert (10 min, 4.000 g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 0,4 Volumen TFB1 resuspendiert, für 10 Minuten auf Eis inkubiert und danach abzentrifugiert (10 min, 4.000 g, 4 °C). Die Pellets wurden in 0,04 Volumen TFB2 aufgenommen und als 50 –100 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert.

TFB1

Kaliumacetat	30 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl	100 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)
pH 5,8	

TFB2

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerol	15 % (v/v)
pH 7,0	

2.3.5.2. Transformation des *E.coli*-Stammes DH5 α

Für die Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und 5 μ l einer Ligationsreaktion bzw. 0,5 μ l Plasmid hinzugefügt. Die Reaktion wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert, 90 Sekunden bei 42°C im Wasserbad inkubiert, noch mal für zwei bis fünf Minuten auf Eis gestellt und danach auf Platten mit einem Antibiotikum zur Selektion transformierter Bakterien ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.3.5.2 Transformation des *E.coli*-Stammes Rosetta

Chemisch kompetente Bakterien wurden freundlicherweise von Chian Kwon zur Verfügung gestellt. Die Transformation wurde nach dem in Abschnitt 2.3.5.1. für DH5 α beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.3.5.3. Transformation des *A. tumefaciens*-Stammes GV3101

Der *Agrobacterium tumefaciens*-Stamm GV3101 ist resistent gegen Rifampizin und enthält das Helferplasmid pMP90:RK, das ein Gen für Kanamycinresistenz exprimiert. Nach dem Auftauen elektrokompetenter Agrobakterien (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Anja Reinstädler) auf Eis wurden 50 μ l davon zusammen mit 1 μ l zu transformierender DNA in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben und bei folgenden Parametern mit einem Apparat von Bio-Rad transformiert:

Gene Pulser	2,5 Σ V, 25 μ F
Pulse Control	125 μ F
Capacitance Extender	400 Ω

Nach der Transformation wurde sofort ein Milliliter YEB-Medium zugegeben und die Bakterien in einem neuen Gefäß für zwei Stunden bei 200 rpm und 28 °C inkubiert. Nachdem sie abzentrifugiert wurden (2 min, 15.000 g, RT), wurden sie in 100 µl YEB aufgenommen und auf YEB-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28 °C inkubiert.

2.3.6. Transformation von *A. thaliana*

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

Als Starterkultur wurden drei bis fünf Milliliter YEB-Medium mit dem jeweiligen transgenen *Agrobacterium*-Stamm inokulieren. Zur Selektion enthält das Medium bereits die Antibiotika, für welche der Vektor und das Bakterium Resistenzgene trägt (hier: Carbenicillin, Rifampicin und Kanamycin; vgl. 2.1.7.1.). Die Starterkultur wurde für zwei bis drei Tage bei 28 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. 200 ml YEB-Medium mit Antibiotikum wurden mit drei Milliliter der Starterkultur inokuliert und für zwei bis drei Tage bei 28 °C auf einem Schüttler bei 200 rpm inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde im Rotor A 6.9 abzentrifugiert (20 min, 4800 rpm RT). Die Pellets wurden in 150 ml 5 % Saccharoselösung resuspendieren und danach auf OD₆₀₀ 0,8 mit 5 % Saccharoselösung eingestellt. 300 ml der Bakteriensuspension wurden mit 180µl Silwet L-77 gemischt und die zu transformierenden *Arabidopsis*-Pflanzen für ca. 30 Sekunden mit den Blütenständen in die Suspension getaucht. Die Pflanzen wurden abgedeckt für 24 Stunden bei schwachem Licht waagrecht inkubiert.

Nach einigen Wochen konnte 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. zwei Wochen alte T_1 -Pflanzen mit dem Herbizid BASTA, das aus 18 % (w/v) Glufosinatammonium besteht, besprüht. Da der verwendete Vektor auch ein Gen für die Phosphinothricin-acetyltransferase (*PAT*), ein Resistenzgen gegen dieses Herbizid, enthält, überleben nur Pflanzen, die das gewünschte Konstrukt auch tatsächlich enthalten. Bei Bedarf kann die Behandlung ein- bis zweimal im Abstand von wenigen Tagen wiederholt werden.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Extraktion nativer Pflanzenproteine aus Gerste und Probenvorbereitung

2.4.1.1. Extraktion

Gerstenblätter wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in Proteinextraktionspuffer suspendiert. Die Lösung wurde zweimal abzentrifugiert (5 min, 15.000 g, 4 °C) und das Pellet jeweils verworfen. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit der Bradfordlösung von Bio-Rad bestimmt. Der Proteinrohextrakt wurde für andere Experimente benutzt oder mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Proteinextraktionspuffer

HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	10 mM
Ascorbinsäure	5 mM
DTT	5 mM
Proteaseinhibitorcocktail Complete	1x

Laemmli-Ladepuffer, 2x

H ₂ O	5 ml
Tris pH 6,8 (1 M)	5 ml
SDS (10% [w/v])	20 ml
Glycerol	10 ml
Bromphenolblau	0,01 %
DTT (1 M)	10 ml

2.4.1.2. Fraktionierung der mikrosomalen Proteine

Proteinrohextrakt wurde wie unter 2.4.1.1. beschrieben oder mit verschiedenen Salzkonzentrationen von 50 mM, 100 mM, 250 mM oder 500 mM NaCl hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt und die Mikrosomen pelletiert (1 h, 100.000 g, 4 °C) und die Pellets wieder in dem entsprechenden Extraktionspuffer aufgenommen.

Alternativ dazu wurde Proteinrohextrakt wie unter 2.4.1.1. beschrieben hergestellt, die Proteinlösung auf 1 µg/µl und die Salzkonzentrationen auf 50 mM, 100, mM, 150 mM, 250 mM oder 500 mM eingestellt und die Proben bei 4 °C eine Stunde lang inkubiert. Danach wurden die Mikrosomen pelletiert (1 h, 100.000 g, 4 °C) und die Pellets wieder in dem entsprechenden Extraktionspuffer aufgenommen.

In beiden Fällen wurden jeweils gleiche Volumina mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

2.4.1.3. Acetonfällung

Um Proteine mit Azeton zu fällen, wurden sie über Nacht in 80 % Aceton bei -20 °C inkubiert und dann abzentrifugiert (5 min, 15.000 g, 4 °C). Das Pellet wurde in 1x Laemmli-Ladepuffer aufgenommen, für 5 min bei 95 °C erhitzt und abzentrifugiert (vgl. 2.4.1.1.).

2.4.1.4. Trichloressigsäure-(TCA-)fällung

Die Probe wurde mit einer 100 % (w/v) TCA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 10 % versetzt, mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5 min, 15.000 g, 4°C). Das Pellet wurde mit -20 °C kaltem 100 % Ethanol gewaschen und getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 1x Laemmli-Ladepuffer aufgenommen, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt und abzentrifugiert (vgl. 2.4.1.1.).

2.4.2. Expression von Proteinen *in vitro*

2.4.2.1. Expression in Weizenkeimextrakt

Gene im pTNT-Vektor mit dem TNT[®] Coupled Wheat Germ Extract System (Promega, Mannheim) nach Herstellerangaben exprimiert. Das Weizenkeimextrakt wurde für andere Experimente benutzt oder mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.2.2. Expression und Aufreinigung von GST-markiertem Protein aus *E. coli*

Zum Test, ob transformierte *E. coli* das GST-markierte Protein exprimieren, wurden drei bis fünf Milliliter LB-Medium angeimpft und für mindestens 6 Stunden wachsen gelassen. Die Produktion des Fusionsproteins wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Kultur über Nacht wachsen gelassen. 150 µl wurden abgenommen und in 100 µl Laemmli-Ladepuffer aufgenommen. Die Probe wurde für 5 min bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und 10 µl davon mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

Für die Aufreinigung größerer Mengen wurden drei bis fünf ml LB-Medium angeimpft und die Übernachtskultur als Starterkultur für 400 ml LB-Medium genommen. Die Bakterien wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen, bevor sie mit 1 mM IPTG induziert wurden. Die Kultur wurde über Nacht bei 28 °C und 200 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die Kultur und die Zentrifugenbecher wurden vorgekühlt und in einem JA 10-Rotor abzentrifugiert (10 min, 5.500 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 30 ml Lysispuffer ohne Tween-20 resuspendiert und mit Ultraschall sonifiziert, bis die Lösung

etwas klarer wurde. Die Zellbruchstücke wurden in einem JA 25.50-Rotor abzentrifugiert (1 h, 22.000 rpm, 4°C). Alle folgenden Schritte wurden im Kühlraum durchgeführt. Der Überstand wurde durch einen Rotilabo[®]-Spritzenfilter (Roth, Karlsruhe) filtriert um restliche Schwebstoffe zu entfernen. ~300 µl -Matrix (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurden mit zehn Volumen Lysispuffer gewaschen. Die Probe wurde geladen und noch mal mit zehn Volumen Lysispuffer gewaschen. Die Matrix wurde in Lysispuffer aufgenommen und für maximal eine Woche bei 4 °C gelagert. Zum Test der Aufreinigung wurden 5 – 10 µl 1x Laemmli-Ladepuffer versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

Lysispufferr

Tris pH 7,6	50 mM
NaCl	150 mM
Glycerol	10 % (v/v)
Tween-20	0,1 % (v/v)
DTT	1 mM
Proteaseinhibitorcocktail Complete	1x

2.4.2.3. Expression und Extraktion von Protein aus *S. cerevisiae*

Hefekulturen, in denen Proteine induziert wurden, wurden freundlicherweise von Qian-Hua Shen zur Verfügung gestellt. Gleiche Mengen Hefekultur wurden aliquotiert und dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und für jeweils fünf Minuten bei 95 °C inkubiert. Die aufgeschlossene Zellen wurden mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.3. Enzymatische Tests und Inhibitorstudien

2.4.3.1. Test der Ubiquitylierung von MLA

Prozessiertes Ubiquitin wurde freundlicherweise von Hans-Peter Stuible zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um das Hexahistidin-markierte Genprodukt der ersten Wiederholung des Polyubiquitings Ubq10 (At4g05320; (Callis et al., 1995). Zum Test der Ubiquitylierung wurden jeweils 10 µl des in Weizenkeimextrakt exprimierten Proteins (vgl. 2.4.2.1.) bei Raumtemperatur für 1 h mit Ubiquitin inkubiert.

Die Proben wurden mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für 5 min bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.3.2. Test der Sumoylierung von MLA

Das *in vitro*-Sumoylierungssystem wurde freundlicherweise von Hans-Peter Stuible zur Verfügung gestellt. Das System besteht aus den drei Komponenten E1-Enzymkomplex, E2-Enzym und SUMO. Der heterodimere E1-Komplex (SUMO-aktivierendes Enzym) wird als SAE1+2-Komplex bezeichnet und besteht aus den *Arabidopsis*-Proteinen At5g50680 und At2g21470. Beide Proteine wurden als Hexahistidin-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Das E2-Enzym (SUMO-konjugierendes Enzym) wird als UBC9 bezeichnet und wird von At3g57870 kodiert. Wie alle anderen Proteine wurde es als Hexahistidinfusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Die verwendete SUMO-Variante wurde durch aminoterminaler Fussion einer StrepII- sowie einer Hexahistidin-Markierung an die prozessierte Isoform von SUMO 2 aus *Arabidopsis* At5g55160 erhalten (StrepII-HIS-AtSUMO2). Als Testpeptidase wurde die katalytische Domäne der SUMO-Isopeptidase ULP1 aus *S. cerevisiae* verwendet. Das Konstrukt wurde als carboxyterminale Hexahistidinfusion in *E. coli* exprimiert. Die Verwendung und Eigenschaften der katalytischen Domäne von ULP1 sind von Li und Hochstrasser beschrieben worden (Li und Hochstrasser, 2003). Verwendet wurde das Konstrukt C204.

Zum Test der Sumoylierung wurden jeweils 20 µl des in Weizenkeimextrakt exprimierten Proteins (vgl. 2.4.2.1.) bei Raumtemperatur für eine Stunde mit dem den

Enzymen der Sumoylierungskaskade inkubiert. Der Ansatz wurde geteilt und ein Aliquot mit ULP1 für eine weitere Stunde inkubiert. Die Aliquots wurden mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.3.3. Studie mit Proteasominhibitoren

Um den Einfluss des Proteasoms auf die Proteinakkumulation im Ruhezustand zu untersuchen, wurde von Gerstenblättern die untere Epidermis abgezogen und sie dann mit 20 mM CHX aus einer Stammlösung von 0,5 g/ml in DMSO oder 50 µM MG115 oder MG132 (Stammlösung nach Angaben des Herstellers) 15 Minuten unter Vakuum infiltriert und anschließend in einem Klimaschrank bei 18 °C inkubiert. Nach zwei, vier und sechs Stunden wurden Proben genommen und Protein extrahiert (siehe 2.4.1.1., 2.4.6.2.)

2.4.4. Interaktionsstudien

2.4.4.1. Immunoaufräumung aus pflanzlichem Proteinrohextrakt

Proteinextrakt wurde wie unter 2.4.1.1. beschrieben extrahiert. Das Extrakt wurde für eine Stunde bei 100.000 g abzentrifugiert, um Membranfragmente zu entfernen. Der geklärte Extrakt wurde mit 2–5 µl α-HA-Antikörper oder 30 – 50 µl gewaschener α-HA-Matrix (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei 4 °C auf einem Rotator inkubiert. Im Falle eines von nicht Matrix-gekoppeltem Antikörpers wurde nach einer Stunde 20 – 30 µl gewaschene Protein G-Matrix (Roche, Mannheim) zugefügt, die Lösung nochmals eine Stunde bei 4 °C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1 min, 15.000 g, 4 °C). Die Matrix wurde dreimal mit Extraktionspuffer gewaschen (vgl. 2.4.1.1.) Mit 1x Laemmli-Ladepuffer wurden die Proteine von der Matrix eluiert, für fünf Minuten bei 95°C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.4.2. *In vitro*-Interaktionsstudien

Um die Interaktion von MLA und WRKY-Proteinen zu untersuchen, wurden jeweils 5-100 µl an GSH-Matrix (Amersham Pharmacia, Freiburg) gekoppeltes GST-WRKY-Fusionsprotein (vgl. 2.4.2.2.) und 50 – 400µl Weizenkeimextrakt mit exprimiertem MLA

in Lysispuffer für zwei Stunden inkubiert (vgl. 2.4.2.2.). Danach wurden die Matrix dreimal mit Lysispuffer gewaschen und das Protein mit 50 µl 50 mM GSH in Lysispuffer eluiert (vgl. 2.4.2.2.). Das eluierte Protein und die Matrix wurden mit Laemmli-Ladepuffer bis zu einer Endkonzentration von 1x versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C erhitzt, abzentrifugiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 2.4.1.1., 2.4.6.2.).

2.4.5. Gelfiltration

Die Gelfiltration ist eine Methode zur Auftrennung nativer Proteine nach Größe. Die Gelfiltration wurde mit einem Äkta FPLC, Amersham Pharmacia, Freiburg, mit ein HiPrep26/60 Sephacryl S-300-Säule High Resolution, Amersham Pharmacia, Freiburg, bei 4 °C in Gelfiltrationspuffer durchgeführt. Das Durchlaufvolumen wurde mit Dextran Blue 2000, Amersham Pharmacia, Freiburg, bestimmt, als Marker wurde das Gelfiltration HMW Calibration Kit, Amersham Pharmacia, Freiburg, benutzt. Die Proben wurden nach dem Durchlauf in zehn Milliliter großen Fraktionen gesammelt und Aliquots mit Aceton- oder TCA-Fällung präzipitiert (vgl. 2.4.1.2. und 2.4.1.3.).

Gelfiltrationspuffer

HEPES pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	10 mM

2.4.6. Gelelektrophoretische Trennungsvorgahren von Proteinen und Transfer auf Nitrozellulosemembranen

2.4.6.1. Blau-Native Gelelektrophorese und nativer Transfer

Die Blau-Native Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur elektrophoretischen Trennung von nativen Proteinkomplexen (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Für Blau-Native Gelelektrophorese wurde Rohproteinextrakt wie bei 2.4.1.1. beschrieben isoliert. 5 % Dodecylmaltosid wurde zugefügt und die Mischung 15 Minuten auf Eis inkubiert. Coomassie wurde bis zu einer Endkonzentration von 4/1 (Coomassie/ Detergenz) zugefügt.

Die Gele wurden bei 4 °C mit einem Gradientenmixer für Minigele nach Smith und Bell gegossen (Smith und Bell, 1986). Dabei wurde die schwere Lösung in die untere Kammer eingefüllt, die leichte in die obere.

Die Gele wurden bei 50 V im Kühlraum mit BN-Puffer an der Kathode und Anodenpuffer an der Anode gestartet. Als Marker wurde HMW Native Marker Kit, Amersham Pharmacia, Freiburg, benutzt. Nach ca. einer Stunde wurde der BN-Puffer durch CN-Puffer ersetzt. Das Gel wurde gestoppt, wenn die Farbfront das Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden mit einem Maximum von 400 mA im Kühlraum über Nacht auf Nitrozellulose Hybond ECL, Amersham Pharmacia, Freiburg, geblottet.

Schwere Gellösung (4ml pro Minigel)

Acrylamid (30 %, 37,5:1)	2,13 ml
3x Gelpuffer	1,33 ml
Glycerol (50 %)	560 µl
APS (10 % [w/v])	30 µl
TEMED	3 µl

Leichte Gellösung (4ml pro Minigel)

Acrylamid (30 %, 37,5:1)	0,53 ml
3x Gelpuffer	1,33 ml
H ₂ O	2,1 ml
APS (10% [w/v])	30 µl
TEMED	3 µl

3x Gelpuffer

Bistris/HCl pH 7,0	150 mM
Aminocaproic acid	1,5 M

CN-Puffer

Tricine	50 mM
Bistris/HCl pH 7,0	15 mM

BN-Puffer

Tricine	50 mM
Bistris/HCl pH 7,0	15 mM
Coomassie G-250	0,02 % (w/v)

2.4.6.2. SDS-PAGE und Western Blotting

Die meisten Proteine binden das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) zu negativ geladenen SDS-Proteinkomplexen mit konstantem Ladungs- zu Masse-Verhältnis (1,4g SDS/g Protein in einer 1% (w/v) SDS-Lösung). SDS denaturiert Proteine und verhindert so Protein-Proteinwechselwirkungen. SDS-Komplexe von Proteinen unterscheiden sich in viele Messmethoden nur noch in ihrer Größe. Die diskontinuierliche Elektrophorese nach Laemmli ist wohl das am häufigsten benutzte System (Laemmli, 1970). Dabei wird über ein Trenngel ein Sammelgel geladen. Das Sammelgel dient zur Konzentrierung der Proteine, während sie im Trenngel nach Größe aufgetrennt werden.

Es wurden Protean 3 Minigele von BIO-RAD verwendet. Zuerst wurde das Trenngel (7 %-12 % Acrylamid) gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem es vollständig polymerisiert war, wurde das Sammelgel gegossen. Die Proben wurden geladen und bei 100 – 200 V in 1x Laufpuffer laufen gelassen, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hatte. Die Gele wurden bei 100 V für mindestens eine Stunde auf Nitrocellulosemembran in vorgekühltem Transferpuffer auf Nitrozellulose Hybond ECL, Amersham Pharmacia, Freiburg, nassgeblottet (nach (Towbin et al., 1979), verändert).

Trenngel 7 % (1 Gel)

H ₂ O	2,75 ml
Acrylamid (30 %, 37,5:1)	1,75 ml
1 M Tris pH 8,8	2,85 ml
APS (10 % [w/v])	75 µl
TEMED	5 µl

Trenngel 10 % (1 Gel)

H ₂ O	2 ml
Acrylamid (30 %, 37,5:1)	2,5 ml
1 M Tris pH 8,8	2,85 ml
APS (10% [w/v])	75 µl
TEMED	5 µl

Trenngel 12 % (1 Gel)

H ₂ O	1,5 ml
Acrylamid (30 %, 37,5:1)	3 ml
1M Tris pH 8,8	2,85 ml
APS (10% [w/v])	75 µl
TEMED	5 µl

Sammelgel (5ml)

H ₂ O	3,4 ml
Acrylamid (30 %, 37,5:1)	830 µl
1M Tris pH 6,8	630 µl
APS (10% [w/v])	50 µl
TEMED	5 µl

10x Lauffpuffer (1l)

Tris	30,2 g
Glycine	188 g
SDS	1 % (w/v)
H ₂ O	ad 1l

Transferpuffer

NaPO ₄ (1 M, pH 7)	15 ml
SDS (10 % [w/v])	5 ml
Ethanol	200 ml
H ₂ O	ad 1l

2.4.7. Detektion von Proteinen**2.4.7.1. Immunodetektion**

Nach dem Blotten wurden die Nitrozellulosemembranen für fünf Minuten in H₂O gewaschen und anschließend für fünf Minuten in Ponceau-Färbelösung inkubiert. Überschüssige Färbelösung wurde abgewaschen und der Blot dokumentiert. Das Ponceau wurde mit PBS-T entfernt und der Blot für eine Stunde mit Milch geblockt. Dabei binden die Proteine aus der Milch an die Nitrozellulose und blockieren so sämtliche freien Proteinbindungsstellen. Anschließend wurde der Blot mit primärem Antikörper in Milch in den angegebenen Konzentrationen über Nacht inkubiert (vgl. 2.1.8.). Der Blot wurde mit PBS-T gewaschen (3x 5 min) und für mindestens eine Stunde mit dem sekundären Antikörper in Milch inkubiert (vgl. 2.1.8.). Die an den sekundären Antikörper gebundene Meerrettichperoxidase katalysiert die Reaktion von Luminol, sodass Licht emittiert wird. Nach weiterem Waschen in TBS-T (3x 5 min) wurden die Blots mit Detektionslösung (ECL Western blotting detection reagent, Amersham Pharmacia, Freiburg) inkubiert und das emittierte Licht auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm, Amersham Pharmacia, Freiburg) detektiert.

PBS 10x

Na ₂ HPO ₄	115 g
NaH ₂ PO ₄	29.6 g
NaCl	58.4 g
H ₂ O	Ad 1l
pH 7,5	

PBS-T

PBS	1x
Tween-20	0,1 %

Milch

Trockenmilchpulver in PBST	5 %
-------------------------------	-----

Ponceau-Färbelösung

Ponceau	0,2 % (w/v)
Essigsäure	3 % (v/v)

2.4.7.2. Färbung mit Coomassie

Gesamtprotein in Gelen wurde mit Coomassie detektiert. Dazu wurde die Gele für mind. 1h mit Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie durch mehrmaliges Kochen in Wasser entfärbt.

Coomassie-Färbelösung

Coomassie G-250	0,2 % (w/v)
Essigsäure	3 % (v/v)

3. Ergebnisse

3.1. Herstellung transgener Gerstelinen

3.1.1. Isolation homozygoter transgener *Mla*-enthaltender Linien

Von Stéphane Bieri wurden transgene Gerstenlinien generiert, die ich für meine Arbeit nutzte (Bieri et al., 2004). Die transgenen Linien enthalten eine genomische Kopie von *Mla1* oder *Mla6* inklusive 2 kb nativer 5' Sequenz und 1 kb nativer 3' Sequenz (Abbildung 2). An den Carboxyterminus der Gensequenz wurde jeweils eine myc- oder HA-Markierung fusioniert (Abbildung 2). Die Konstrukte wurden mittels transienter Genexpression in Gerstenblättern und quantitativem Test der Resistenz auf Funktionalität getestet und waren voll funktionell (Bieri et al., 2004). Mittels *Agrobacterium*-vermittelter Transformation wurden die vier Konstrukte in das Gerstenkultivar *Golden Promise* eingebracht und Einzelkopie-Linien isoliert (Bieri et al., 2004). Die transgenen Linien zeigten rassenspezifische Resistenz gegen das Mehltausolat, das das zur Spezifität des *Mla*-Konstrukts korrespondierende *AvrMla* enthielt (Bieri et al., 2004). Gegenüber dem Mehltausolat ohne das korrespondierende *AvrMla* waren sie anfällig (Bieri et al., 2004). In allen diesen Linien ließ sich MLA-Protein nachweisen (Bieri et al., 2004). Dies zeigt, dass MLA auch in den transgenen Linien voll funktionell ist.

In Zusammenarbeit mit Stéphane Bieri isolierte ich mindestens fünf unabhängige homozygote transgene Linien, die jeweils eines der Konstrukte *Mla1-myc*, *MLA1-HA*, *MLA6-myc* oder *MLA6-HA* exprimieren. Die Linien wurden durch die Analyse von T₂ Familien, die von T₁ Individuen nach Selbstbefruchtung erhalten wurden, isoliert. Alle homozygoten Linien zeigten makroskopisch eine vollständige Resistenz gegenüber dem Mehltausolat, das das korrespondierende *Avr*-Gen exprimiert. (Abbildung 3 und Daten nicht gezeigt).

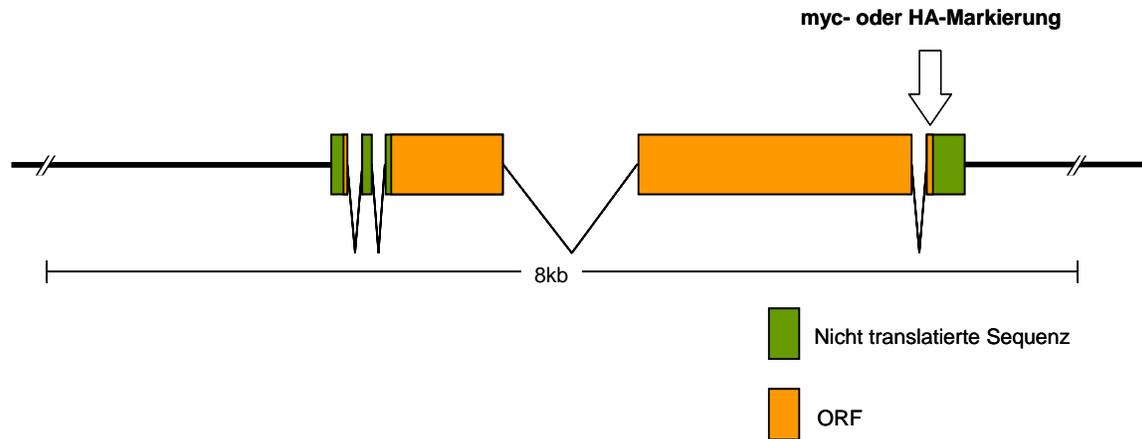


Abbildung 2: Struktur der *Mla*-Konstrukts, das zur Transformation von Gerste verwendet wurde

Eine genomische Kopie von *Mla1* und *Mla6* mit einer carboxyterminalen myc- oder HA-Markierung wurde in das Kultivar Golden Promise eingebracht. Das jeweilige Gen wird von am 5'-Ende von 2kb und am 3'-Ende von 1kb nativer regulatorischer Sequenz flankiert.

3.1.2. Isolation von homozygoten Kreuzungen der transgenen *Mla*-enthaltenden Linien mit *rar1-2* Mutanten

Mla6 ist genetisch abhängig von *Rar1*, *Mla1* jedoch nicht (Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001). Um diese Abhängigkeit auf der Proteinebene zu untersuchen, isolierte ich in Zusammenarbeit mit Stéphane Bieri homozygote Linien aus Kreuzungen von transgenen Linien, die *Mla1-HA* und *Mla6-HA* enthalten, mit der *rar1-2* Mutante M100 im Kultivar *Sultan5* (Torp und Jorgensen, 1986; Freialdenhoven et al., 1994).

Phänotypische Analyse von F₃-Familien, die von *rar1-2* homozygoten F₂-Individuen nach Selbstbefruchtung erhalten wurden, ermöglichte die Identifikation von Familien, die sowohl für *Mla* als auch für den *Rar1* Locus homozygot sind. Linien, die *Mla1-HA* enthielten, lösten eine effektive Immunantwort ohne ausgeprägte makroskopisch sichtbare HR aus, unabhängig davon, ob sie *Rar1* enthielten oder nicht (Abbildung 3a). Im Gegensatz dazu war die Resistenz von *Mla6-HA* im *rar1-2* Mutantenhintergrund beeinträchtigt; es konnten regelmäßig nekrotische Flecken mit Pilzwachstum beobachtet werden (Abbildung 3a). Dies ist mit vorhergegangenen Studien in nicht-transgener Gerste konsistent (Jörgensen 1996).

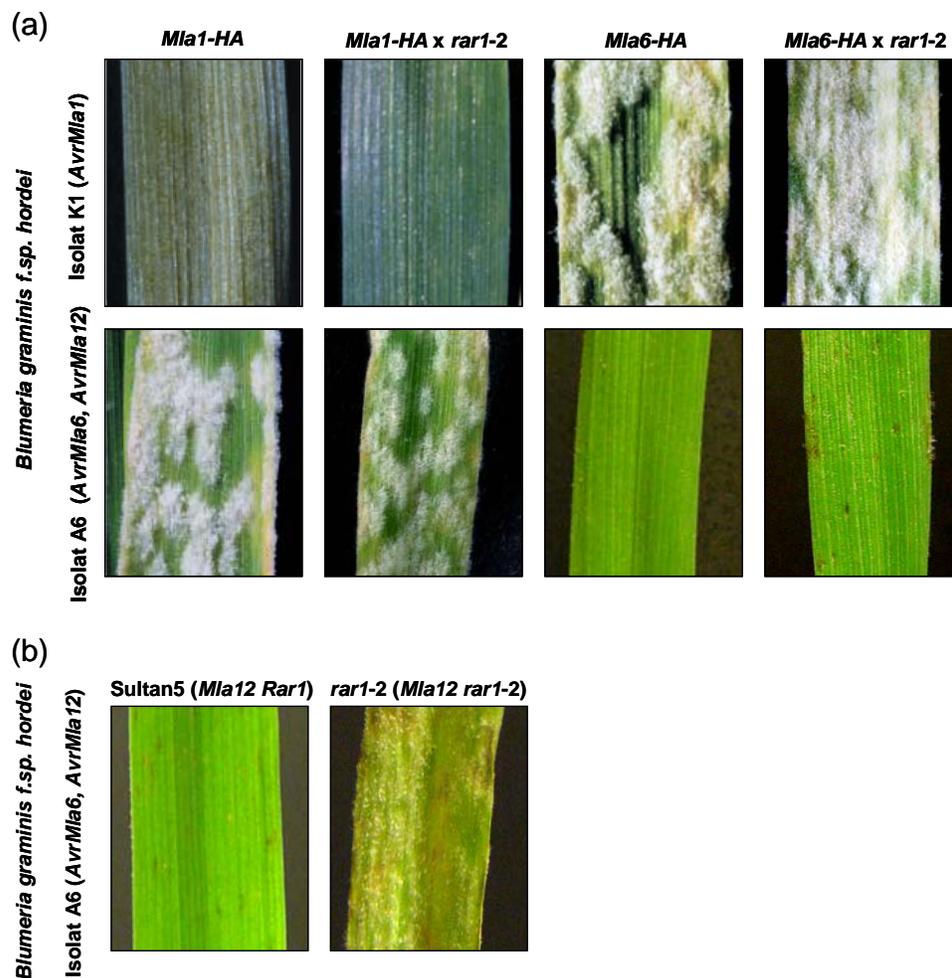


Abbildung 3: Infektionsphänotypen der homozygoten transgenen Gerstenlinien von *Mla1-HA* und *Mla6-HA* und deren Kreuzungen mit einer *rar1-2* Mutante

- (a) Keimlinge homozygoter transgener Linien von *Mla1-HA* und *Mla6-HA*, die eine einzelne Kopie des Transgens enthalten, sowie homozygote Kreuzungen mit einer *rar1-2* Mutante wurden mit den Mehltausisolaten K1 (*AvrMla1*) und A6 (*AvrMla6, AvrMla12*) infiziert und nach sieben Tagen fotografiert. Die transgenen Linien sind resistent gegen das jeweilige Isolat von *Bgh*, das das korrespondierende *Avr*-Gen enthält. Linien, die *Mla1-HA* und *Mla6-HA* in einem *rar1-2* Hintergrund enthalten, sind ebenfalls resistent gegen das korrespondierende Isolat.
- (b) Keimlinge von *Sultan5* und *rar1-2* wurden mit dem Mehltausisolat A6 inokuliert und nach sieben Tagen fotografiert. Im Gegensatz zu den Kreuzungen mit den transgenen *Mla1-HA* und *Mla6-HA* enthaltenden Linien in einem *rar1* Mutantenhintergrund, ist die *rar1-2* Mutante, die *Mla12* enthält, anfällig gegen das Mehltausisolat A6 (*AvrMla6, AvrMla12*), obwohl sie Nekrosen als Abwehrreaktionen zeigt.

3.2. Generelle Charakterisierung der MLA-Proteine

3.2.1. MLA kann in allen grünen Teilen der Pflanze und der Wurzel nachgewiesen werden

Ich untersuchte die Abundanz von Epitop-markiertem MLA1-HA und MLA6-HA Fusionsprotein in verschiedenen Teilen der Pflanze, Wurzel, Stängel, vom jungen wachsenden und vom voll entwickeltem ersten Blatt, sowie dem wachsenden vierten Blatt (Abbildung 4a). Immunoblot-Analyse gleicher Mengen Gesamtprotein detektierte ein spezifisches Signal für MLA1-HA und MLA6-HA (Abbildung 4a). Die gewebespezifische Proteinverteilung ist für beide Proteine vergleichbar (Abbildung 4a). Die Anwesenheit von MLA1-HA und MLA6-HA in Wurzeln war unerwartet, da der Gerstenmehltau in der Natur nur Epidermisgewebe von Blättern befällt.

3.2.2. MLA liegt in einem löslichen und einem membranassoziierten Pool vor

Es wird allgemein angenommen, dass NB-LRR-Proteine intrazelluläre Proteine sind. Dies wurde bislang jedoch nur in zwei Fällen durch Zellfraktionierungsexperimente mit transgenen Pflanzenmaterial unterstützt, in denen von einer physiologisch relevanten Akkumulation der mit einem Epitop markierten R-Proteine durch Verwendung nativer Promotersequenzen ausgegangen werden kann (AtRPM1 und AtRPS2; (Boyes et al., 1998; Axtell und Staskawicz, 2003). Von beiden wurde gezeigt, dass sie fast ausschließlich membranassoziiert sind (Boyes et al., 1998; Axtell und Staskawicz, 2003). Ich führte einfache Fraktionierungsexperimente durch, um Zellkompartimente zu isolieren, die MLA enthalten. Nach der Entfernung von Zelltrümmern bei 15.000 g und Ultrazentrifugation bei 100.000 g konnte MLA1-HA bei Salzkonzentration von 150 mM, die nahe der physiologischen Konzentration liegen, in der löslichen und der mikrosomalen Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 4). Die relative Menge von MLA war stark von der Salzkonzentration im Extraktionspuffer abhängig. Bei 200 und 500 mM NaCl konnten steigende Mengen MLA1-HA isoliert werden, während bei niedrigeren Salzkonzentrationen die Menge an MLA1-HA geringer wurde (Abbildung 4. 3b). Im Gegensatz dazu wurden die zytosolischen Proteine HSP90 und SGT1 nur in der

löslichen Fraktion in salzunabhängigen Mengen gefunden (Abbildung 4b). Das Syntaxin ROR2, ein intrazelluläres Protein, das eine einzelne Transmembranhelix besitzt, wurde dagegen bevorzugt in der mikrosomalen Fraktion detektiert (Abbildung 4b). Diese Daten deuten darauf hin, dass MLA in einem löslichen und einem membranassoziierten Pool vorliegt. Ich modifizierte meinen Versuchsaufbau um herauszufinden, ob MLA seine präferentielle Lokalisation zwischen den Pools verändern kann. Zu diesem Zweck extrahierte ich Gesamtprotein bei 150 mM und stellte den Salzgehalt danach auf höhere oder niedrigere Werte ein. Nach einer Äquilibration von einer Stunde bei 4 °C wurden diese wiederum in eine lösliche und eine Membranfraktion getrennt (Abbildung 4c). Je höher die Salzkonzentration war, desto mehr MLA1-HA wurde in der löslichen Fraktion gefunden. Diese Daten zeigen, dass lösliches MLA nur schwach und reversibel mit der Membranfraktion assoziiert ist, möglicherweise durch ionische Interaktionen.

3.2.3 Die Akkumulation von MLA-Protein ist temperatursensitiv

Verschiedene rassenspezifische Resistenzen, die durch R-Proteine vermittelt werden, sind bei höheren Temperaturen nicht mehr funktionell (Samuel, 1931; Loegering und Giss, 1957; Dropkin, 1969). Da dies möglicherweise mit der Menge des jeweiligen Resistenzproteins zusammenhängt, testete ich die MLA1-HA und MLA6-HA Menge nach einem moderaten Temperaturschock. Dafür wurden Keimlinge bei 18 °C für sieben Tage angezogen und die Temperatur dann auf 37 °C angehoben (Abbildung 5a). Ich beobachtete einen deutlichen Rückgang der MLA1-HA und MLA6-HA Akkumulation nach Erhöhung der Umgebungstemperatur (Abbildung 5a). Die Reduktion des MLA1-HA Akkumulationsspiegels erfolgte relativ langsam und konnte zwei Stunden nach veränderter Umgebungstemperatur nachgewiesen werden (Abbildung 5a). Im Gegensatz dazu erfolgte der Rückgang der MLA6-HA Abundanz rascher und war bereits nach 30 Minuten deutlich erkennbar (Abbildung 5a). Beide Proteine blieben bis zum Ende des geprüften Zeitraums von acht Stunden auf einem niedrigen Niveau (Abbildung 5a). Im Gegensatz dazu hatte eine Erhöhung der Temperatur keinen signifikanten Einfluss auf zytosolisches HSP90, SGT1 und RAR1 (Abbildung 5a). Semi-quantitative RT-PCR Analysen der transgenen Linien in Zusammenarbeit mit Francesca Ceron zeigten, dass der Rückgang der MLA Akkumulation nicht durch Veränderungen der Abundanz

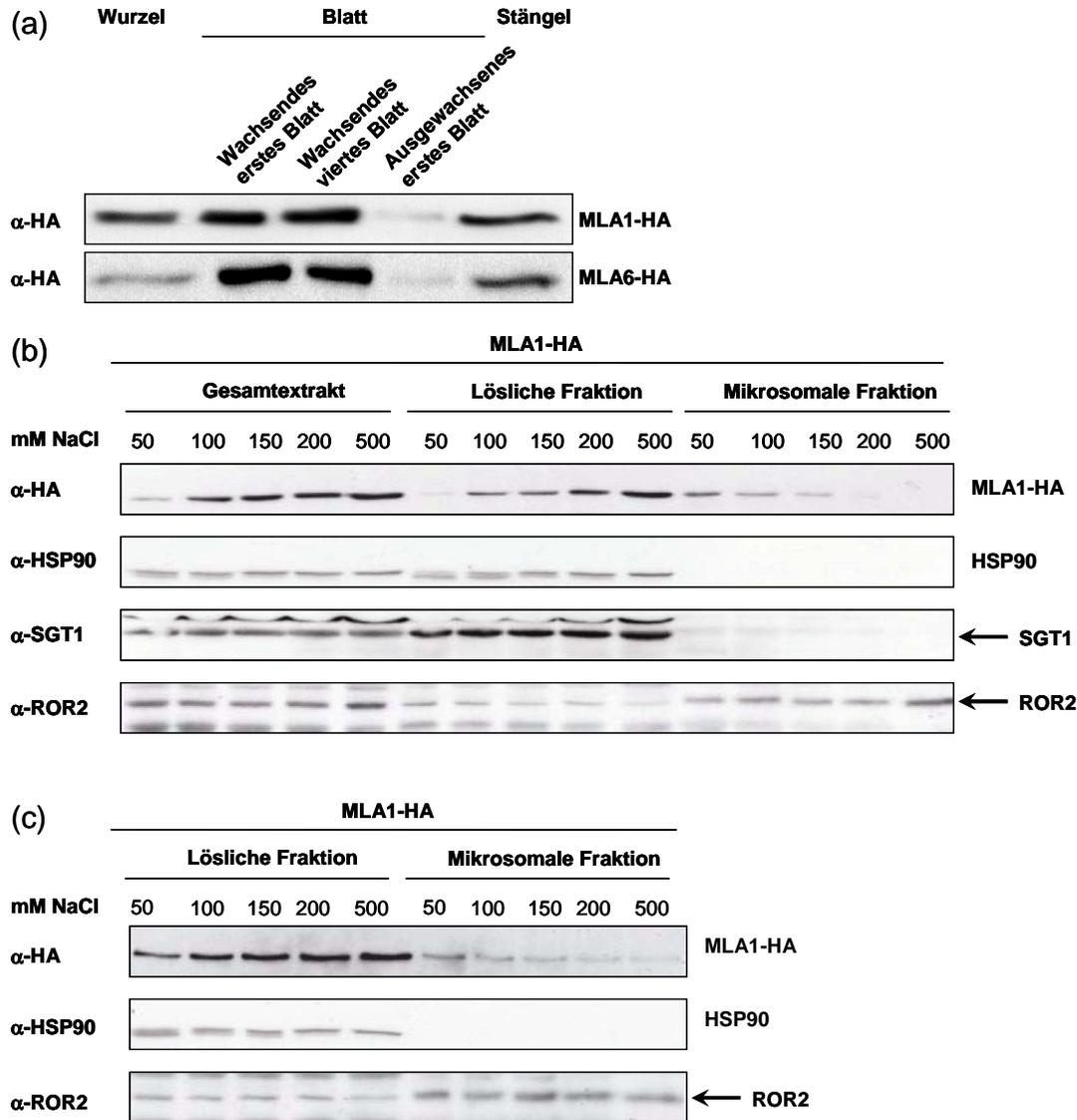


Abbildung 4: Expression von MLA1-HA und MLA6-HA in verschiedenen Organen der Pflanze und in subzellulären Fraktionen

- (a) Western Blot-Analyse von Proteinextrakt aus verschiedenen Geweben einer transgenen Pflanze, die eine einzelne Kopie *Mla1-HA* oder *Mla6-HA* exprimiert. 12 µg Protein wurden pro Probe geladen. MLA1-HA und MLA6-HA können in allen Geweben nachgewiesen werden.
- (b) Rohextrakt, lösliche und mikrosomale Fraktionen einer *Mla1-HA* enthaltenden transgenen Linie wurden mit Antisera gegen HA, HSP90, SGT1, und ROR2 mittels Immunoblotting getestet. Totalprotein wurde aus Blattmaterial mit Extraktionspuffer verschiedener Ionenstärke (angezeigt durch unterschiedliche NaCl Konzentrationen) isoliert. Rohextrakt wurde nach der Entfernung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 15.000 g erhalten. Der Rohextrakt wurde auf gleiche Proteinkonzentrationen und gleiches Volumen eingestellt und durch Zentrifugation bei 100.000 g in lösliche und mikrosomale Fraktion getrennt. Die mikrosomale Fraktion wurde im ursprünglichen Puffervolumen wieder aufgenommen. Jeweils gleiche Volumina wurden für das Immunoblotting benutzt. Im Gegensatz zur Kontrolle, lässt sich durch höhere Ionenstärken mehr MLA-Protein extrahieren und verhältnismäßig mehr in der löslichen Fraktion feststellen.

- (c) Immunoblot von löslichen und mikrosomalen Fraktionen einer *Mla1-HA* enthaltenden transgenen Linie. Es wurde ein Antiserum gegen HA, HSP90 und ROR2 benutzt. Im Gegensatz zu (b) wurde der Rohextrakt mit der physiologischen Salzkonzentration von 150 mM NaCl erstellt. Aliquots des Rohextrakts wurden auf die angegebenen Salzkonzentrationen eingestellt und für 2 h äquilibrieren lassen, bevor sie bei 100000 g in lösliche und mikrosomale Fraktion getrennt wurden. Deutlich ist zu erkennen, dass sich bei höherer Ionenstärke mehr MLA in der löslichen Fraktion befindet.
-

von *Mla* mRNA erklärt werden kann (Abbildung 5a). Daher sind die beobachteten temperaturabhängigen Reduktionen der MLA-Akkumulation wahrscheinlich das Ergebnis eines posttranslationalen Prozesses. Kontrollpflanzen bei 18 °C zeigen weiterhin, dass die MLA Abundanz nicht durch die circadiane Uhr von Pflanzen beeinflusst wird (Abbildung 5a). Diese Daten legen die Schlussfolgerung nahe, dass die Temperatursensitivität der MLA-Proteine eine intrinsische Eigenschaft ist. Leider konnte ich nicht überprüfen, ob die Reduktion der MLA Abundanz die Resistenz gegen *Blumeria graminis* beeinflusst, da das Wachstum des Mehлтаupilzes bei Temperaturen oberhalb von 30°C erheblich beeinträchtigt ist (Bieri et al., 2004).

3.2.4. RAR1 kann MLA bei erhöhten Temperaturen nicht stabilisieren

Da RAR1 das MLA-Protein in der gesunden Pflanze stabilisiert, erschien es nahe liegend zu prüfen, ob dieser Einfluss auf die Stabilisierung bei höheren Temperaturen fortbesteht (Bieri et al., 2004). Keimlinge homozygoter *Mla1-HA*- und *Mla6-HA*-Linien, die entweder jeweils das *Rar1* Wildtyp oder das *rar1-2* Defektallel enthalten, wurden dafür 7 Tage lang bei 18 °C gezogen, bevor die Temperatur auf 37 °C erhöht wurde (Abbildung 5b). Zwischen *Rar1*-Wildtyp und der *rar1-2*-Mutante lassen sich sowohl für MLA1-HA als auch für MLA6-HA keine signifikanten Unterschiede des zeitlichen Verlaufs der Abundanzreduktion erkennen (Abbildung 5a). Dies könnte darauf hindeuten, dass die stabilisierende Wirkung von RAR1 bei erhöhten Temperaturen beeinträchtigt ist. Alternativ könnte die temperaturabhängige Reduktion der MLA Abundanz mit der Aktivierung eines Proteinabbau-Mechanismus erklärt werden, der die Stabilisierung durch RAR1 verdeckt.

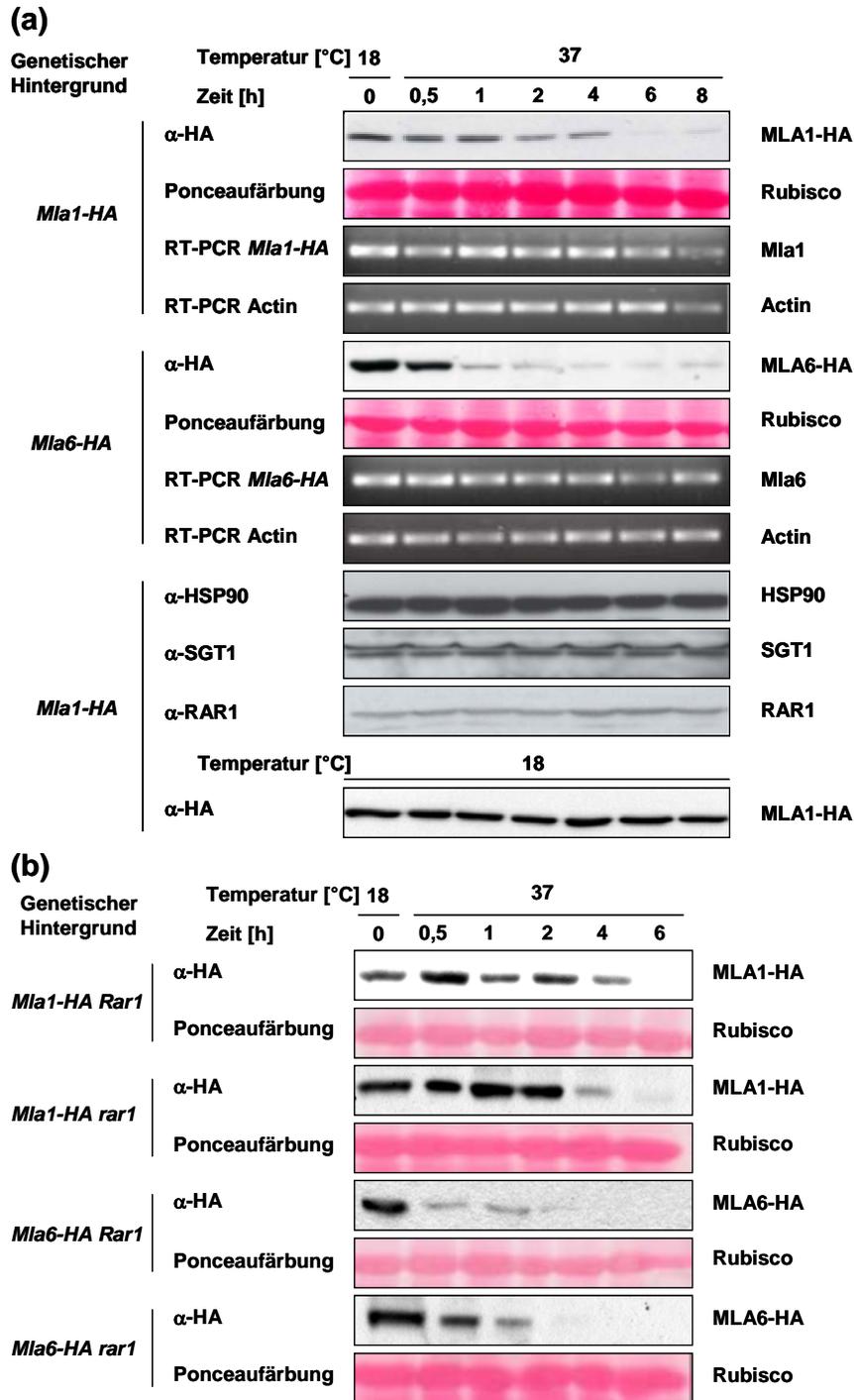


Abbildung 5: Die Akkumulation von MLA ist temperatursensitiv und nicht abhängig von RAR1

- (a) Gerstenkeimlinge, die entweder *Mla1-HA* oder *Mla6-HA* exprimieren, wurden bei 18 °C gezogen. Die Temperatur wurde auf 37 °C erhöht und Proben wurden genommen, um die Menge von MLA, HSP90, RAR1 und SGT1 mittels Immunoblotting zu untersuchen. Die Transkriptakkumulation des Transgens wurde mittels semiquantitativer PCR getestet. MLA6-HA verschwindet bei erhöhter Temperatur schneller als MLA1-HA.

- (b) Gerstenkeimlinge wurden wie oben beschrieben gezogen und bei 37 °C inkubiert. Ein Vergleich von MLA in *Rar1*-Wildtyp- und *rar1-2*-Mutantenhintergrund zeigt, dass der Einfluss von RAR1 auf die Stabilisierung von MLA bei erhöhten Temperaturen vernachlässigbar gering ist.
-

3.3. Rekonstituierung der durch RAR1 vermittelten Stabilisierung und der Funktionalität von MLA in *Arabidopsis thaliana*

3.3.1. Rekonstituierung der durch RAR1 vermittelten Stabilisierung

Verschiedene Rassenspezifische Resistenzen sind abhängig von *Rar1-2* (Freialdenhoven et al., 1994; Muskett et al., 2002; Tornero et al., 2002b). Neue Daten zeigen, dass RAR1 NB-LRR-Proteine stabilisiert (Tornero et al., 2002b; Belkhadir et al., 2004b; Bieri et al., 2004; Leister et al., 2005). Unklar ist aber weiterhin, ob RAR1 R-Proteine direkt oder indirekt stabilisiert, beispielsweise indem es ihren Einbau in einen präformierten Erkennungskomplex fördert (Shirasu und Schulze-Lefert, 2003). Um zu prüfen, ob die *Rar1*-abhängige Stabilisierung von MLA von zusätzlichen artspezifischen Faktoren abhängig ist, sollte die Abundanz von *Mla1-HA* und *Mla6-HA* in transgenen *Arabidopsis*-Linien überprüft werden, die entweder das *AtRar1* Wildtyp- oder das *rar1-20* Defektallel enthalten (Warren et al., 1999; Tornero et al., 2002b; Abbildung 6a). Mittels *Agrobacterium* vermittelter Transformation wurden die Konstrukte in den Ökotyp Col-0, sowie in eine Col-0 *rar1-20* Mutante eingebracht (Warren et al., 1999; Tornero et al., 2002b).

3.3.2. Rekonstituierung der Funktionalität

R-Gene scheinen in der Regel innerhalb einer Gruppe nahe verwandter Arten Resistenz gegen bestimmte Pathogene zu vermitteln, während sie in anderen nicht funktionell zu sein scheinen, da bestimmte Wirtsfaktoren, spezifische Interaktoren oder Regulatoren der Immunantwort, fehlen können (Tai et al., 1999; Leister et al., 2005). Ein weiteres Problem ist die natürliche Nichtwirtsresistenz, die den Test mit dem korrespondierenden Pathogen oft unmöglich macht. So zeigt *A. thaliana* eine natürliche Nichtwirtsresistenz gegenüber Gerstenmehltau. Um die Funktionalität von *Mla1-HA* und *Mla1-HA* in

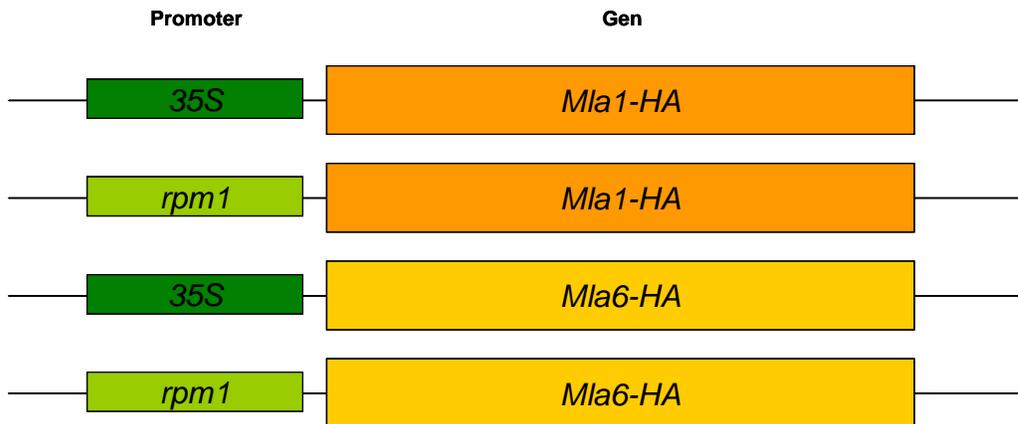


Abbildung 6: Expression von MLA1-HA und MLA6-HA in *Arabidopsis thaliana*

Die cDNA-Sequenz von *Mla1-HA* und *Mla6-HA* wurden in pJawohl2 kloniert, der den 35S-Promoter oder den *rpm1*-Promoter enthält. Alle vier Konstrukte wurden in die *Arabidopsis*-Genotypen Col-0, *rar1-20* und *pad4 sag101* transformiert.

beschrieben wurde (Shen et al., 2003). Ich konstruierte Expressionvektoren mit MLA1-Sequenzen, bei denen durch Punktmutation die Lysinreste in Arginine umgewandelt wurden. Alle wurden in Weizenkeimextrakt exprimiert und mittels Immunoblotanalyse untersucht. Keine dieser Mutanten zeigt ein Bandenmuster, das sich signifikant von der Kontrolle unterscheidet. Also scheint keiner der getesteten Lysinreste sumoyliert zu werden. Es ist allerdings theoretisch möglich, dass Modifikationen an verschiedenen Stellen zu Proteinen führen, die ähnliches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen, sodass ein Unterschied durch eine einzelne Punktmutation nicht zu erkennen sein kann. *graminis* die Zellen penetrieren und Sekundärhyphen ausbilden kann (Dittgen, 2005). Nach Inokulation mit Gerstenmehltauisolaten, die das korrespondierende Effektormolekül enthalten, kann somit getestet werden, ob MLA auch in *Arabidopsis* eine rassenspezifische Immunantwort vermitteln kann.

3.4. Isolation MLA1-HA enthaltender Komplexe *in vivo*

Wie NB-LRR-Proteine Effektormoleküle erkennen und Resistenz vermitteln, ist bisher kaum verstanden. Da das einfache Rezeptor-Liganden-Modell nur für wenige Systeme bestätigt werden konnte (Jia et al., 2000; Deslandes et al., 2003), gehen neuere Theorien

davon aus, dass R-Proteine allein oder wahrscheinlicher als R-Protein enthaltende Rezeptorkomplexe bestimmte Wirtsfaktoren überwachen, die Ziele für Modifikation durch Effektormoleküle sind (Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Dieses Modell wird auch *guard*-Hypothese genannt (Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Erste Hinweise, die dieses Modell bestätigen, sind Interaktionen von R-Proteinen mit Wirtsfaktoren *in vivo* (Scofield et al., 1996; Tang et al., 1996; Mackey et al., 2002). Ungeklärt ist bisher, ob diese Interaktionen in allen Fällen stabil sind, oder ob sie auch transient stattfinden können.

3.4.1. Ein MLA1-enthaltender Komplex mit einem Molekulargewicht von ~750 kDa kann *in planta* nachgewiesen werden.

Um die Hypothese zu testen, dass MLA einen präformierten Erkennungskomplex formt, versuchte ich herauszufinden, ob MLA in einem hochmolekularen Komplex mit anderen Proteinen vorliegt und wenn möglich andere Komponenten dieses Komplexes zu identifizieren. Da verglichen mit MLA6-HA viermal mehr MLA1-HA in Proteinrohextrakt detektierbar ist, beschloss ich, zunächst mit MLA1-HA zu arbeiten (Bieri et al., 2004). Zu diesem Zweck nutzte ich die Blau-Native Gelelektrophorese, die für die Isolierung von löslichen und Membrankomplexen geeignet ist (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Ich trennte 100–150 µg Rohprotein auf und konnte nach der Detektion mit HA-Antiserum eine spezifische Bande für MLA1-HA bei ~700–750 kDa erkennen (Abbildung 6a). Dies deutet auf einen Komplex hin, der MLA1-HA enthält.

3.4.2. Gelfiltration bestätigt einen *in planta* MLA Komplex von ~600–800 kDa

Da ich mit der Blau-Native Gelelektrophorese nur ein schwaches Signal dieses MLA1-HA-enthaltenden Komplexes erhielt, versuchte ich, ihn mittels Gelfiltration zu bestätigen und wenn möglich größere Mengen davon aufzureinigen. Ich isolierte 12 – 15 mg Totalprotein aus Blättern junger Gerstepflanzen unter verschiedenen Salzkonzentrationen, 20 mM, 150 mM und 500 mM NaCl, und entfernte Zelltrümmer und Mikrosomen mittels

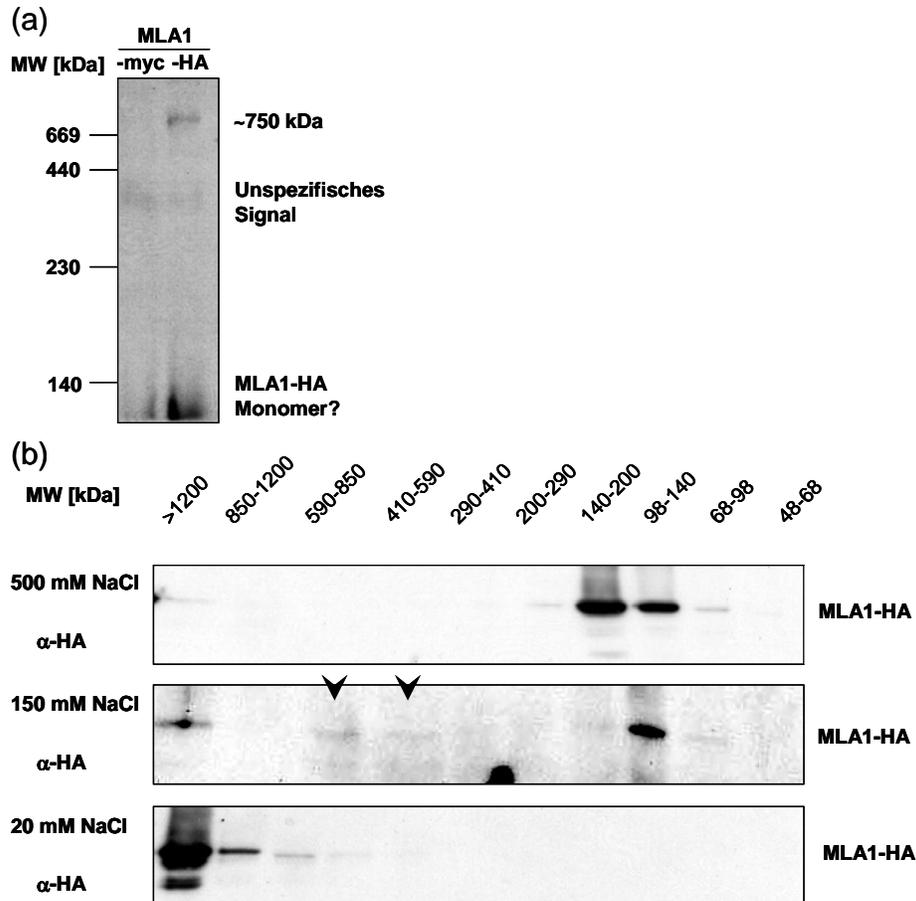


Abbildung 7: MLA1-HA kann in einem Komplex von ~750kDa nachgewiesen werden

- (a) Gleiche Mengen Rohproteinextrakt von Pflanzen, die *Mla1-myc* und *Mla1-HA* exprimieren, wurden auf einem Blau-Nativen Gel aufgetrennt und geblottet. Eine MLA1-HA-spezifische Bande von ~750 kDa konnte nachgewiesen werden.
- (b) Rohproteinextrakt aus *Mla1-HA* exprimierenden Pflanzen wurde mittels Gelchromatographie fraktioniert und analysiert. Bei physiologischer Salzkonzentration von 150 mM NaCl lässt sich ein spezifisches MLA1-HA Signal zwischen 850 und 410 kDa nachweisen. Dieses Signal verschwindet bei einer hohen Salzkonzentration von 500 mM NaCl, bei der beinahe alles MLA1-HA als Monomer vorliegt. Bei einer sehr niedrigen Salzkonzentration von 20 mM NaCl lässt sich MLA1-HA nur im Durchfluss nachweisen, was auf Aggregation oder höhermolekulare Komplexe, die labil gegenüber Salzen sind, hindeutet.

Ultrazentrifugation bei 100.000 g für 30 Minuten bei 4 °C. Der Überstand wurde über eine Sephacryl S-300-Säule aufgetrennt. Ein 400 µl großes Aliquot jeder 10 ml großen Fraktion wurde mit Aceton gefällt, auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Anti-HA-Serum detektiert (Abbildung 7b). Ich konnte in der Fraktion, die bei 500 mM isoliert wurde, den Großteil des MLA1-HA zwischen 68 und 290 kDa detektieren, eine Größe, die mit dem für die monomere Form erwarteten Molekulargewicht übereinstimmt

(Abbildung 7b). Dieser Befund ist konsistent mit der Annahme, dass hohe Salzkonzentrationen ionische Wechselwirkungen stören. Umgekehrt war bei 20 mM der Großteil des Proteins im Durchfluss der Säule detektierbar, was konsistent mit der Annahme ist, dass Proteine bei niedrigen Salzkonzentrationen zur Aggregation tendieren (Abbildung 7b). Bei physiologischen Salzkonzentrationen von 150 mM konnte ein starkes Signal in Fraktionen entdeckt werden, die mit der Größe des monomeren MLA korrespondieren (Abbildung 7b). Außerdem war aber auch ein schwaches Signal mit einer Größe von 410 bis 850 kD sichtbar (Abbildung 7b). Die Größe der mutmaßlichen Komplexe, die mit Blau-Nativer Gelelektrophorese und Gelfiltration erhalten wurden, liegt im gleichen Bereich. Es ist jedoch unklar, ob es sich dabei um homomere oder heteromere Komplexe handelt. Trotzdem kann ich die Möglichkeit nicht komplett ausschließen, dass es sich um eine unspezifische Assoziation von MLA handelt, die sich bei physiologischen Salzkonzentrationen als Präparationsartefakt bildet. Es ist auch möglich, dass dieser Komplex *in planta* vorkommt, allerdings keine physiologische Relevanz in der MLA-vermittelten Resistenz besitzt.

3.5. Test für spezifische Interaktoren *in planta*

Da keine Aufreinigung von MLA-HA enthaltenden Komplexen gelungen war, testete ich die Interaktion der Proteine RAR1 und SGT1, von denen bekannt ist, dass sie die MLA-vermittelte Resistenz beeinflussen (Freialdenhoven et al., 1994; Azevedo et al., 2002; Shen et al., 2003; Bieri et al., 2004). Des Weiteren testete ich HSP90, das für eine effektive Vermittlung der Resistenz von anderen R-Proteinen und MLA13 benötigt wird (Hubert et al., 2003; Lu et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Liu et al., 2004b; Hein et al., 2005). Ziel war es zu untersuchen, ob diese Proteine mit MLA interagieren. Dazu musste mittels Immunpräzipitation genügend Protein aufgereinigt werden, um es mit Hilfe spezifischer Antikörper identifizieren zu können.

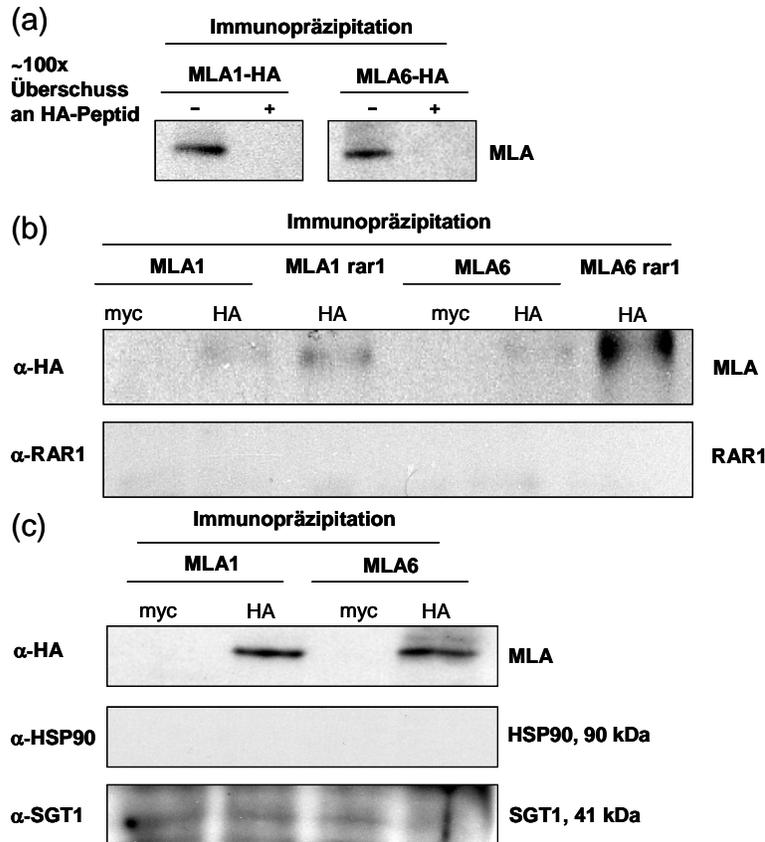


Abbildung 8: Eine direkte Interaktion von MLA-HA und den potentiellen Interaktoren HSP90, SGT1 und RAR1 kann nicht nachgewiesen werden.

- Immunpräzipitationsexperimente mit Rohproteinextrakt wurden durchgeführt und durch Zugabe von HA-Peptid die Bindung an MLA-HA verhindert. Das Experiment zeigt, dass die HA-Markierung in MLA-HA für Antikörper zugänglich ist und MLA-HA spezifisch durch den HA-Antikörper präzipitiert werden kann.
- Mittels Coimmunpräzipitation wurde die Interaktion von MLA-HA mit RAR1 untersucht. 10 % des Präzipitats wurde für die Detektion von MLA-HA aufgetragen, 90 % für die Detektion von RAR1. Eine signifikante Interaktion konnte nicht nachgewiesen werden.
- Mittels Coimmunpräzipitation wurde die Interaktion von MLA-HA mit HSP90 und SGT1 untersucht. Eine signifikante Interaktion mit MLA-HA konnte nicht nachgewiesen werden.

3.5.1. MLA1-HA und MLA6-HA aus Proteinrohextrakt können mittels Immunopräzipitation spezifisch aufgereinigt werden

In nativen Extrakten können Antigene von Proteinen durch intra- und intermolekulare Interaktionen sowie posttranslationale Modifikationen maskiert sein. Um ein Protokoll für die Immunopräzipitation von MLA zu entwickeln, testete ich, ob die HA-Markierung im nativen Protein für den Antikörper zugänglich ist (Abbildung 8a) Ich zeigte, dass die

Markierung in beiden Proteinen, MLA1-HA und MLA6-HA, zugänglich ist und sich durch die Zugabe von HA-Peptid auskonkurrieren lässt (Abbildung 8a).

3.5.2. Eine Interaktion von RAR1 mit MLA-HA kann *in planta* nicht nachgewiesen werden

Verschiedene MLA-Spezifitäten zeigen unterschiedliche Abhängigkeit für RAR1 in der Vermittlung einer effektiven rassenspezifischen Resistenzreaktion (Freialdenhoven et al., 1994; Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001; Halterman et al., 2003; Shen et al., 2003; Halterman und Wise, 2004). RAR1 erhöht die Proteinmenge sowohl vom RAR1-unabhängigen MLA1-HA als auch von RAR1-abhängigen MLA6-HA (Bieri et al., 2004). Es wirkt somit genetisch auf der gleichen Ebene wie MLA (Bieri et al., 2004). Obwohl RAR1 die Proteinmenge beeinflusst, interagiert es nicht direkt mit MLA im Zwei-Komponentensystem in Hefe, weder mit einzelnen Domänen noch mit Vollängenprotein (Bieri et al., 2004). Auch mittels Immunpräzipitation konnte ich keinerlei Interaktion von MLA mit RAR1 feststellen (Abbildung 8b). Deswegen ist es möglich, dass RAR1 nur transient mit MLA interagiert.

3.5.3. Weder eine Interaktion von SGT1 noch von HSP90 mit MLA-HA kann *in planta* nachgewiesen werden

SGT1 interagiert direkt mit RAR1 *in planta* (Azevedo et al., 2002). Zusätzlich dazu ist die Abhängigkeit von SGT1 in verschiedenen Spezifitäten der MLA vermittelten Resistenz mit einer Abhängigkeit von RAR1 assoziiert (Azevedo et al., 2002; Shen et al., 2003). Im Zwei-Komponentensystem in Hefe interagiert SGT1 isoformspezifisch mit dem RAR1/SGT1 unabhängigen MLA1-LRR-CT, während keine Interaktion mit dem RAR1/SGT1 abhängigen MLA6-LRR-CT oder mit den Vollängenproteinen festgestellt werden konnte (Bieri et al., 2004). Neueste Daten belegen, dass SGT1 auch *in planta* direkt mit R-Proteinen interagieren kann (Leister et al., 2005).

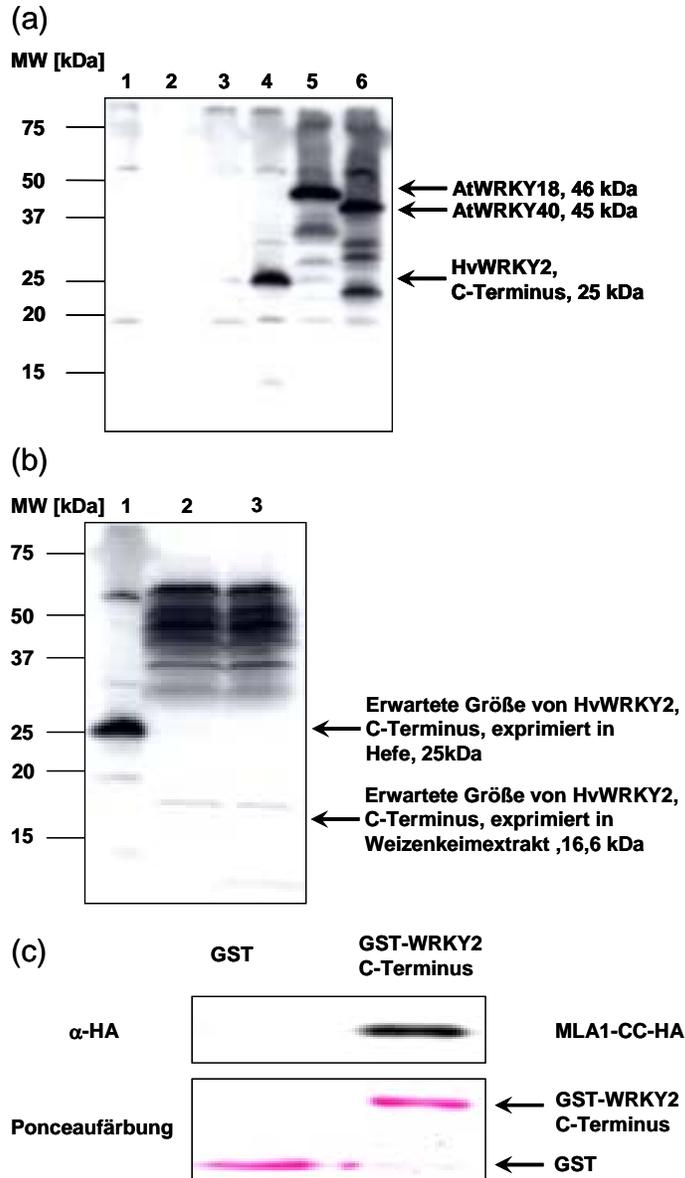


Abbildung 9: Die CC-Region von MLA1 interagiert spezifisch mit dem C-Terminus von HvWRKY2 *in vitro*

- (a) Rohproteinextrakt aus Hefezellen, in denen verschiedene WRKY-Proteine transient exprimiert wurden, wurde mittels Immunoblotting mit einem Antikörper untersucht, der spezifisch für ein konserviertes Peptid ist, das die WRKY-Domäne aus *A. thaliana* enthält. Protein der jeweils erwarteten Größe konnte in Proben nachgewiesen werden, die den C-Terminus von HvWRKY2, sowie AtWRKY18 und AtWRKY40 exprimierten. Volllängenprotein von HvWRKY1 und HvWRKY2 konnte nicht nachgewiesen werden
HvWRKY1 (1), HvWRKY2 (2), C-Terminus von HvWRKY2, Expression nicht induziert (3) und induziert (4), AtWRKY18 (5) und AtWRKY40 (6)
- (b) Der C-Terminus von HvWRKY2 wurde in Weizenkeimextrakt exprimiert (Kontrolle ohne Plasmid(2), mit HvWRKY2, C-Terminus enthaltendem Plasmid (3)). Im Gegensatz zur Expression des Proteins in Hefe (1) kann kein spezifisches Protein detektiert werden, was der erwarteten Größe entspricht.

- (c) Gleiche Mengen Weizenkeimextrakt, die MLA1-CC-HA enthalten, wurden mit GSH-Harz inkubiert, an das GST oder GST-WRKY2 C-Terminus gebunden war. In der Ponceaufärbung sind gleiche Mengen an aufgereinigtem GST und GST-WRKY2 C-Terminus zu erkennen. Mittels Immunoblot kann eine spezifische Interaktion von MLA1-CC-HA mit GST-WRKY2 C-Terminus detektiert werden.
-

Es wurde gezeigt, dass HSP90 mit SGT1 und RAR1 interagiert und für einige R-Protein-vermittelte Resistenzreaktionen in der Pflanze notwendig ist (Hubert et al., 2003; Lu et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Liu et al., 2004b). HSP90 interagiert *in planta* mit einer Anzahl von R-Proteinen (Hubert et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Liu et al., 2004b). Im Zwei-Komponentensystem in Hefe interagiert es mit dem LRR-CT sowohl von MLA1 als auch von MLA6, aber nicht mit dem Volllängenprotein (Bieri et al., 2004). Zumindest für die *Mla13*-vermittelte Resistenz ist HSP90 notwendig (Hein et al., 2005). Ich testete die Interaktion von MLA1 und MLA6 mit HSP90 und SGT1, konnte allerdings weder für SGT1 noch für HSP90 ein spezifisches Signal erkennen (Abbildung 8c). Da HSP90 und SGT1 in Hefe nicht mit Volllängenprotein interagiert und ich auch *in planta* keine Interaktion nachweisen konnte, ist es wahrscheinlich, dass auch HSP90 und SGT1 nur transient mit dem ungefalteten LRR-CT interagieren. Diese Interaktion könnte während dem Faltungs- und Reifungsprozess des Proteins oder während der Aktivierung nach Erkennung des Pathogeneffektors auftreten.

3.6. Interaktion mit HvWRKY2 *in vitro*

Aus einer Analyse im Zwei-Komponenten-System in Hefe ergaben sich Daten, nach denen der carboxyterminale Teil des Transkriptionsfaktors HvWRKY2 mit der hochkonservierten CC-Domäne von MLA interagiert (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich wurde auch noch eine Interaktion von beiden Proteinen, HvWRKY2 und der *coiled-coil*-Region von MLA1 und MLA6 mit HvWRKY1 nachgewiesen (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten).

3.6.1. WRKY-Antikörper gegen Protein aus *Arabidopsis thaliana* kann WRKY-Protein aus Gerste erkennen

Um die Interaktion zwischen WRKY-Protein und MLA zu bestätigen, testete ich einen spezifischen Antikörper, der gegen die WRKY-Domäne von Protein aus *Arabidopsis* entwickelt wurde (Turck et al., 2004). In Kooperation mit Qian-Hua Shen extrahierte ich Gesamtprotein aus Hefekulturen, die die verschiedene WRKY-Proteine als Konstrukte für das Hefe-Zwei-Komponenten-System exprimieren und detektierte WRKY-Protein mithilfe des spezifischen Antikörpers (Abbildung 9a). Ich konnte zeigen, dass der Antikörper auch mit dem Carboxyterminus von WRKY2 aus Gerste kreuzreagiert (Abbildung 9a). Keine Kreuzreaktion konnte mit Vollängenprotein von HvWRKY1 und HvWRKY2 festgestellt werden (Abbildung 9a). Da auch keine oder nur sehr schwache Interaktion mit den Vollängenproteinen im Zwei-Komponenten-System in Hefe festgestellt werden konnten, deutet dies darauf hin, dass beide Vollängenproteine in Hefe nur sehr begrenzt stabil sind.

3.6.2. Expression verschiedener HvWRKY und MLA-Konstrukte in vitro

Da CC-NB-LRR-Proteine toxisch für *E. coli* sein sollen (Tameling et al., 2002), konstruierte ich Expressionsvektoren für verschiedene MLA-Konstrukte und das C-terminale Ende von WRKY2 für das Transkriptions-Translationssystem in Weizenkeimextrakt (Tabelle 1). Während alle getesteten MLA-Konstrukte detektiert werden konnten (Daten nicht gezeigt), konnte der Carboxyterminus von WRKY2 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 9b). Dies deutet darauf hin, dass das carboxyterminale Fragment nicht in Weizenkeimextrakt exprimiert werden kann.

Ich konstruierte Expressionsvektoren für *E. coli*, um GST-Fusionsprotein von HvWRKY1 und HvWRKY2, sowie den C-Terminus von HvWRKY2 zu exprimieren. (Tabelle 2). Während der C-Terminus die erwartete Größe hatte (Daten nicht gezeigt), konnte bisher kein Vollängenprotein der erwarteten Größe detektiert werden.

Konstrukt	Größe [bp]	Größe [aa]	Erwartetes Molekulargewicht [kDa]
MLA1-HA	2901	967	109,7
MLA6-HA	2895	965	108,9
MLA1-CC(1-46)-HA	165	55	6,1
MILA1-CC-HA	513	171	20
MLA1-CC-NB-HA	1749	583	66,5
HvWRKY2 C-Terminus	456	152	16,6

Tabelle 15: Konstrukte für die Expression im Weizenkeimextrakt

Konstrukt	Größe [bp]	Größe [aa]	Erwartetes Molekulargewicht [kDa]
GST-HvWRKY2 C-Terminus	1134	378	42,9
GST-HvWRKY2	1662	554	61,6
GST-HvWRKY1	1734	578	65,8

Tabelle 16: Konstrukte für die Expression als GST-Fusionsprotein in *E. coli*

3.6.3. Interaktion von GST-HvWRKY2-C-Terminus und MLA1-CC-HA

Ich reinigte GST-HvWRKY2-C-Terminus und GST als Kontrolle an einer Glutathion-Matrix auf und inkubierte Aliquots der Matrix mit Weizenkeimextrakt, in dem MLA1-CC-HA exprimiert wurde (Abbildung 9c). Ich konnte eine spezifische Interaktion von CC und HvWRKY2-C-Terminus nachweisen (Abbildung 9c). Zusammen mit den Daten aus dem Zwei-Komponenten-System in Hefe zeigt dies, dass MLA zumindest *in vitro* mit WRKY2 interagieren kann.

3.7. Kontrolle der Menge von MLA im Ruhezustand und mögliche Modifikation durch Ubiquitin und SUMO

SGT1 spielt eine wichtige Rolle in der durch R-Proteine vermittelten Resistenz, obwohl die genauen Mechanismen noch unklar sind (Muskett und Parker, 2003). Verschiedene Arbeiten zeigen, dass das Hefehomolog von SGT1 eine Schlüsselkomponente im Aufbau des E3-Ligasekomplexes und essentiell für die proteasomalen Degradation ist (Kitagawa et al., 1999; Dubacq et al., 2002; Garcia-Ranea et al., 2002; Bansal et al., 2004; Lee et al., 2004; Lingelbach und Kaplan, 2004; Yamamoto et al., 2004). Eine aktuelle Studie zeigt, dass zumindest für bestimmte R-Proteine SGT1 antagonistisch zu RAR1 wirken kann und die Degradation fördern soll (Holt et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass SGT1 über proteasomale Degradation entweder an der Kontrolle der Menge im Ruhezustand und/oder an der Degradation und Signalweiterleitung nach Aktivierung beteiligt ist.

3.7.1. Proteasomale Degradation und Neusynthese kontrollieren die Menge von MLA im Ruhezustand

Ich testete, ob proteasomale Degradation und Neusynthese an der Kontrolle der MLA1-Abundanz in Abwesenheit von Pathogenen beteiligt sind. Dafür wurde von den Blättern sieben Tage alter Gerstenkeimlinge die untere Epidermis abgezogen. Die Blätter wurden dann mit Wasser, Cycloheximid (CHX) oder Cycloheximid mit Proteasominhibitor MG-115 oder MG132 infiltriert. Cycloheximid inhibiert die eukaryotische Proteinsynthese, die Proteasominhibitoren hemmen die proteasomale Degradation. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und die Menge von MLA mittels Immunoblotting nachgewiesen (Abbildung 10a) Während man in der Wasserkontrolle stabile Mengen detektieren kann, kann man bei den mit CHX infiltrierten Proben einen deutlichen Rückgang der MLA-Menge erkennen, der in den mit Proteasominhibitor behandelten Proben deutlich geringer ausfällt (Abbildung 10a). Im Gegensatz dazu gab es bei den Kontrollproteinen HSP90 und Rubisco keinerlei signifikante Veränderungen (Abbildung 10a).

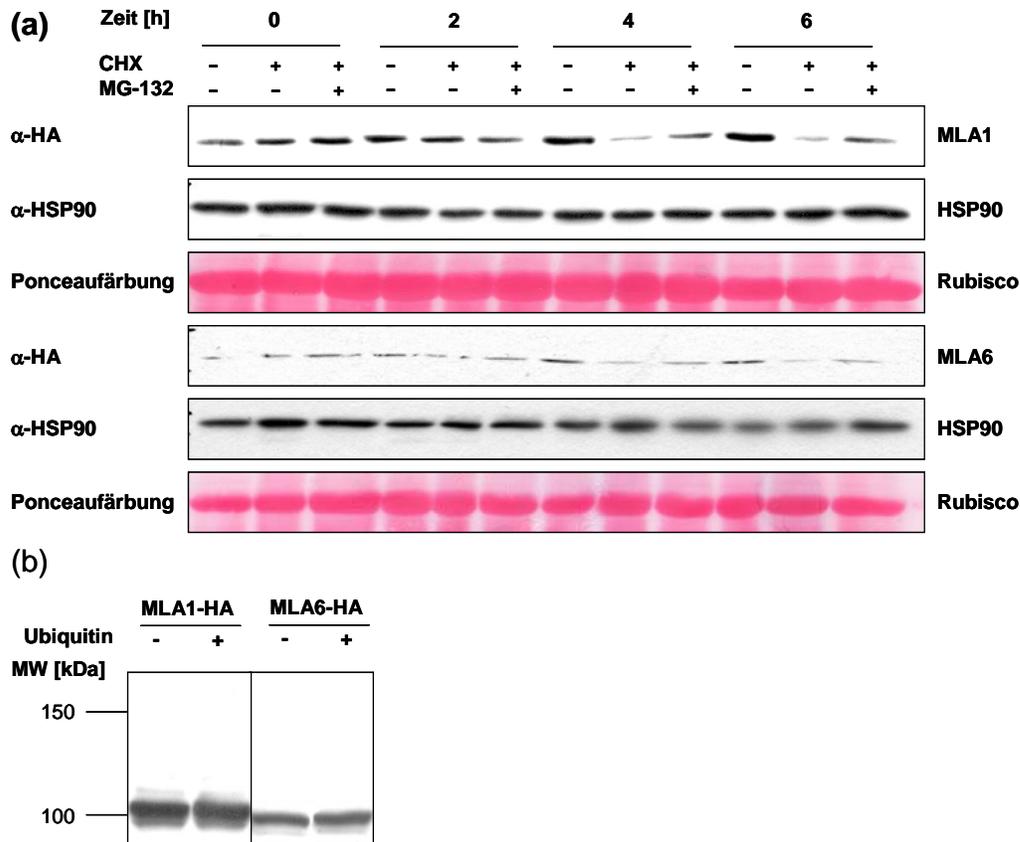


Abbildung 10: MLA1-HA- und MLA6-HA-Menge werden durch das Proteasom kontrolliert

- (a) Von Blättern junger Gerstenkeimlinge wurde die untere Epidermis entfernt und das restliche Blatt mit Wasser, CHX oder CHX und MG132 infiltriert. Proben wurden nach verschiedenen Zeiten genommen und der Proteinrohextrakt mittels Immunoblotting untersucht. Wenn CHX die Proteinneusynthese blockiert, kann man gegenüber der Kontrolle ohne CHX einen deutlichen Rückgang der MLA-Proteinmenge erkennen. Zusätzliche Zugabe von MG132 bewirkt eine deutliche Stabilisierung von MLA1 und MLA6 gegenüber CHX allein.
- (b) Nach Inkubation von in Weizenkeimextrakt exprimiertem MLA mit aufgereinigtem Ubiquitin lässt sich keine Veränderung in der Größe oder der Menge von MLA feststellen. Möglicherweise fehlt die substratspezifische E3-Ligase in Weizenkeimextrakt.

Da Proteine erst ubiquitinyliert werden müssen, um im Proteasom degradiert zu werden, testete ich in Zusammenarbeit mit Hans-Peter Stuitable, ob MLA durch Ubiquitin modifiziert werden kann. Zu diesem Zweck inkubierte ich MLA1-HA und MLA6-HA, das in Weizenkeimextrakt exprimiert wurde, für zwei Stunden mit aufgereinigtem Ubiquitin und detektierte es danach mittels Immunoblotting (Abbildung 10b). Keinerlei Veränderungen in der Größe oder dem Bandenmuster konnte im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Da Protein aus Weizenkeimextrakt im Prinzip durch Zugabe von aufgereinigtem Ubiquitin modifiziert werden kann (Daten nicht gezeigt), gibt es zwei

plausible Erklärungsmöglichkeiten, warum MLA nicht modifiziert wurde. Zum einen kann es sein, dass MLA kein Substrat für eine Modifizierung durch Ubiquitin ist. Da ich gezeigt habe, dass MLA vom Proteasom abgebaut wird, ist dies jedoch unwahrscheinlich, da Ubiquitinylierung eine Grundvoraussetzung für proteasomale Degradation ist. Die wahrscheinlichere Erklärung ist, dass eine spezifische Ubiquitin-Protein-Ligase (E3-Ligase), die hauptverantwortlich für die Substratspezifität ist, in Weizenkeimextrakt nicht vorhanden ist. Ich kann allerdings nicht ausschließen, dass MLA modifiziert wird, dies aber zu keiner sichtbaren Veränderung im Molekulargewicht des Proteins führt.

3.7.2. MLA1-HA und MLA6-HA können *in vitro* sumoyliert werden

Da SUMO unter anderem eine antagonistische Funktion zu Ubiquitin besitzt (Hay, 2005), prüfte ich in Zusammenarbeit mit Hans-Peter Stäubli eine mögliche Modifikation von MLA1-HA und MLA6-HA durch SUMO. In Weizenkeimextrakt exprimiertes MLA1-HA und MLA6-HA wurden mit den in *E. coli* exprimierten und aufgereinigten Enzymen der Sumoylierungskaskade aus *A. thaliana* inkubiert, danach mit autoaktiver Sumoisopeptidase behandelt und mittels Immunoblotting aufgetrennt und nachgewiesen. Deutlich sind in den mit Enzymen inkubierten Proben spezifische Banden bei ungefähr 150 kDa zu sehen, die nach Behandlung mit Sumoisopeptidase wieder verschwinden (Abbildung 11a). Schwache Banden, bei ungefähr 120 und 135 kDa deuten auf eine Trippel-Sumoylierung hin (Abbildung 11a).

In weiteren Experimenten versuchte ich, die Sumoylierungsstellen zu identifizieren. Vier Lysine wurden als Kandidaten für Sumoylierungsstellen gewählt, die in allen MLA Sequenzen konserviert sind. Drei davon, K49, K173 und K219, wurden mittels Computeranalyse mit SUMOblot vorhergesagt, (Gramatikoff, 2004) K916 wurde als Funktionsverlustmutante von MLA12 identifiziert, die unter dem Namen M22

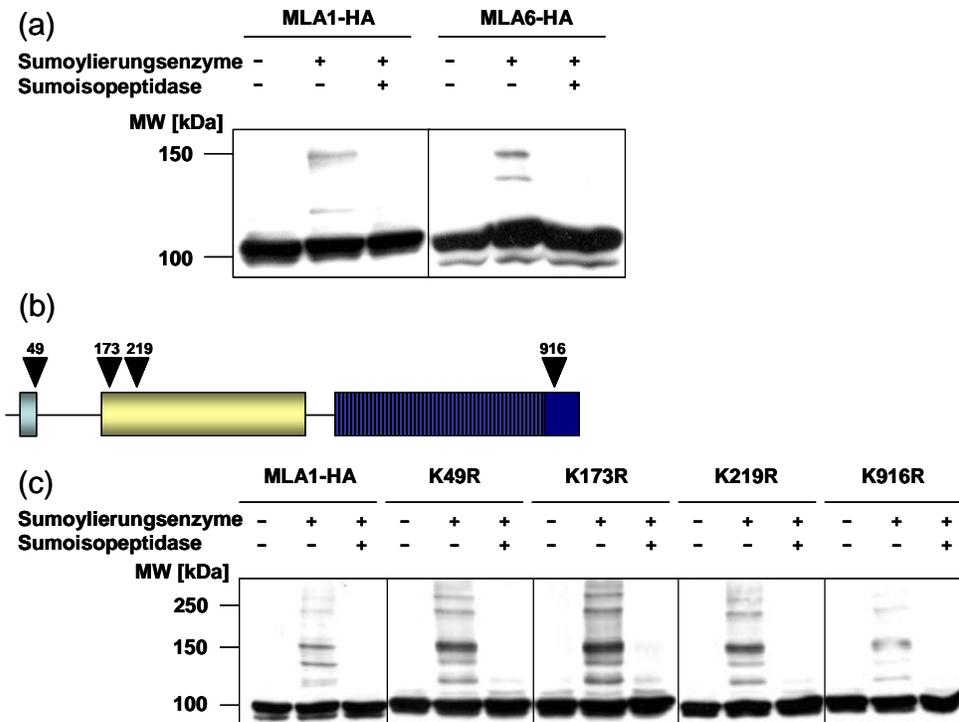


Abbildung 11: MLA1-HA und MLA6-HA können *in vitro* sumoyliert werden

- (a) MLA1-HA und MLA6-HA wurden in Weizenkeimextrakt exprimiert und mit Enzymen der Sumoylierungskaskade aus *A. thaliana* inkubiert. Deutlich ist eine prominente Bande bei ~150 kDa zu erkennen, die nach Behandlung mit Sumoisopeptidase wieder verschwindet. Schwache Banden sind auch bei niedrigeren Molekulargewichten zu erkennen, so dass die Bande bei 150 kDa eine Trippel-Sumoylierung entsprechen könnte.
- (b) In Punktmutanten wurden vier in allen bekannten MLA-Sequenzen konservierte Lysine gegen Arginine ausgetauscht. Drei davon (K49, K173, K219) waren nach Computervorhersage für Sumoylierungsstellen signifikante Kandidaten, eine (K916) wurde als MLA12-Funktionsverlustmutante M22 beschrieben.
- (c) Die in Weizenkeimextrakt exprimierten Mutanten wurden mit den Enzymen der Sumoylierungskaskade und Sumoisopeptidase behandelt. Am Muster der Sumoylierung ist keine Änderung erkennbar. Also scheinen andere als die getesteten Lysinreste sumoyliert worden zu sein.

beschrieben wurde (Shen et al., 2003). Ich konstruierte Expressionvektoren mit MLA1-Sequenzen, bei denen durch Punktmutation die Lysinreste in Arginine umgewandelt wurden (Abbildung 11b). Alle wurden in Weizenkeimextrakt exprimiert und mittels Immunoblotanalyse untersucht. Keine dieser Mutanten zeigt ein Bandenmuster, das sich signifikant von der Kontrolle unterscheidet (Abbildung 11c). Also scheint keiner der getesteten Lysinreste sumoyliert zu werden. Es ist allerdings theoretisch möglich, dass Modifikationen an verschiedenen Stellen zu Proteinen führen, die ähnliches Laufverhalten in der SDS-PAGE aufweisen, sodass ein Unterschied durch eine einzelne Punktmutation nicht zu erkennen sein kann.

4. Diskussion

Die *Mla*-Gene repräsentieren vermutlich eine Reihe von Allelen und vermitteln rassenspezifische Resistenz gegen verschiedene Isolate des Gerstenmehltaus. Sie kodieren für typische R-Proteine vom CC-NB-LRR-Typ und enthalten eine einzigartige carboxyterminale Domäne ohne bekannte Homologien zu anderen Proteinen. Eine zunehmende Anzahl Sequenzen von NB-LRR-Proteinen sind bekannt, eine genaue biochemische Charakterisierung steht aber meist noch aus. Biochemische Daten sind aber essentiell, um die Wirkungsweise dieser Proteine auf molekularer Ebene besser verstehen zu können. Diese Arbeit sollte neue Einsichten in Wirkungsweise von R-Proteinen bringen.

4.1. MLA könnte neben der Resistenz gegen *Bgh* auch noch andere Resistenzen vermitteln

Um die Expression von MLA in der Pflanze zu testen, wurden verschiedene Gewebe von MLA1-HA und MLA6-HA exprimierenden Linien mittels Western Blotting untersucht (Abbildung 4a; Bieri et al., 2004). MLA wurde in allen oberirdischen Teilen der Pflanze nachgewiesen (Abbildung 4a; Bieri et al., 2004). Dies ist konsistent mit Daten, nach denen *Bgh* nur oberirdische Teile von Gerste besiedelt (Hückelhoven, 2005; Zhang et al., 2005). Es ist jedoch überraschend, dass MLA auch in den Wurzeln transgener Pflanzen exprimiert wird. Eine Erklärungsmöglichkeit ist, dass MLA auch Resistenz gegen andere Krankheitserreger vermittelt. Es ist bekannt, dass bestimmte R-Proteine gegen multiple Effektoren und Pathogene Resistenz vermitteln können. So erkennt RPM1 zwei verschiedene Effektoren, AvrRpm1 und AvrB, aus dem Pathogen *Pseudomonas syringae* (Bisgrove et al., 1994). Ein Beispiel für Resistenz gegen multiple Pathogene ist Mi-1.2, ein CC-NB-LRR-Protein, das Resistenz gegen Wurzelgallen-Nematoden (*Meloidogyne* ssp.), Aphidien (*Macrosiphum euphorbiae*) und Weiße Fliege (*Bemisia tabaci*) vermittelt (Milligan et al., 1998; Rossi et al., 1998; Nombela et al., 2003). Da die Pathogene der Rhizosphäre nur ungenügend erforscht sind, ist es möglich, dass ein bisher noch

unbekanntes Wurzelpathogen ebenfalls von MLA erkannt wird, das dann eine spezifische Resistenzreaktion vermitteln kann.

Eine alternative Möglichkeit für die Präsenz eines R-Proteins in Wurzeln wäre eine zusätzliche Funktion in der Entwicklung von Pflanzen, wie momentan diskutiert wird (Whalen, 2005). Verschiedene Cofaktoren der Resistenz spielen auch in der Entwicklung der Pflanzen eine Rolle. So erhöht posttranslationale Geninaktivierung von *AtTIP49a* in *Arabidopsis* die RPP5- und RPP2-vermittelte Resistenz gegen *Peronospora parasitica*, ohne jedoch eine konstitutive Resistenzantwort auszulösen (Holt et al., 2002). Im Gegensatz dazu scheint es sich bei den meisten Phänotypen um sekundäre Effekte zu handeln, da die beobachtete Beeinträchtigung des Wachstums durch eine konstitutiv aktivierte Resistenzreaktion ausgelöst wird, wie z. B. für BON1, einem Repressor des TIR-NB-LRR-Proteins SNC1, oder für RIN4, einem Repressor von RPM1 und RPS2, in *A. thaliana* gezeigt wurde (Mackey et al., 2003; Belkhadir et al., 2004b; Yang und Hua, 2004). Eine direkte Beteiligung von NB-LRR-Proteinen an Entwicklungsprozessen neben der konstitutiven Aktivierung einer Resistenzantwort konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden.

4.2. Die subzelluläre Lokalisation von MLA könnte durch Interaktionspartner reguliert werden

Wenig ist über die subzelluläre Lokalisation von unter nativem Promoter exprimierten NB-LRR-Proteinen bekannt. Es wurde gezeigt, dass detektierbares RPS2 sowie der Großteil von RPM1 mit der Plasmamembran assoziiert ist (Boyes et al., 1998; Axtell und Staskawicz, 2003). Im Gegensatz dazu war bei annähernd physiologischen Salzkonzentrationen der Großteil des MLA-Proteins in der löslichen Fraktion zu finden, während ein zweiter, kleinerer Teil in der mikrosomalen Fraktion detektiert werden konnte (Abbildung 4b, c ; Bieri et al., 2004). Da die Assoziation mit der Membranfraktion reversibel und abhängig von der Ionenstärke war, ist es möglich, dass die subzelluläre Interaktion durch ionischen Wechselwirkungen mit peripheren oder integralen Membranproteinen bestimmt ist. Möglicherweise besteht eine funktionelle

Ähnlichkeit zu RMP1 und RPS2, die zusammen mit ihrem Interaktor RIN4 an der Plasmamembran lokalisiert sind (Mackey et al., 2002; Axtell und Staskawicz, 2003).

4.3. RAR1 kann MLA-Protein unter Temperaturstress nicht stabilisieren

Einige der bekannten *Mla*-vermittelte Resistenzen, z. B. *Mla6*, *Mla10*, *Mla12* und *Mla13*, sind genetisch abhängig von *Rar1*, während andere, z. B. *Mla1* und *Mla7*, von *Rar1* unabhängig sind (Halterman et al., 2001; Zhou et al., 2001; Halterman et al., 2003; Shen et al., 2003; Halterman und Wise, 2004). *Rar1* codiert für ein hochkonserviertes Mitglied einer kleinen Proteinfamilie (Shirasu et al., 1999). Pflanzliches RAR1 besitzt zwei sehr ähnliche, tandemartig angeordnete Zn²⁺-bindende Domänen, die reich an Cystein und Histidin sind (Shirasu et al., 1999). RAR1 oder sein Homolog *chp1* sind in allen eukaryotischen Phyla außer Hefe zu finden (Shirasu et al., 1999). In Vertebraten existiert ein zusätzliches Mitglied dieser Familie, Melusin, das durch Genduplikation in der frühen Entwicklung der Chordata entstanden sein könnte (Brancaccio et al., 1999; Brancaccio et al., 2003b; Brancaccio et al., 2003a). Sowohl für pflanzliches RAR1 als auch für Chp-1 aus Säugetieren wurde gezeigt, dass es mit HSP90 interagiert und somit wahrscheinlich ein Co-Chaperon von HSP90 darstellt (Hubert et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Wu et al., 2005).

Rar1 wurde ursprünglich als Gen isoliert, das für die *Mla12* vermittelte Resistenz notwendig ist (Freialdenhoven et al., 1994). Später wurde gezeigt, dass *Rar1* eine generelle Funktion in der von *R*-Genen vermittelten Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen spielt und RAR1-Protein für die Akkumulation der jeweiligen R-Proteine in der Abwesenheit des Pathogens notwendig ist (Liu et al., 2002a; Muskett et al., 2002; Tornero et al., 2002a; Tornero et al., 2002b; Bieri et al., 2004). Auch in der PAMP-vermittelten Resistenz sind *rar1*-Mutanten anfälliger als Wildtyp-Pflanzen. Dies wurde sowohl in *A. thaliana* mit *Pseudomonas syringae*, als auch in Gerste mit *Magnaporthe grisea* gezeigt (Holt et al., 2005; Jarosch et al., 2005). Die genauen Mechanismen, wie RAR1 R-Proteine stabilisiert oder seine Funktion in der PAMP-vermittelten Resistenz

sind noch weitgehend ungeklärt, möglicherweise spielt es jedoch eine Rolle in der Stabilisierung von PAMP-Rezeptoren. Allerdings könnte es auch einen Zusammenhang mit dem Lipase-ähnlichen Protein EDS1 geben, das sowohl für eine effektive rassenspezifische Resistenzantwort von TIR-NB-LRR-Proteinen als auch für die PAMP-vermittelte basale Resistenz benötigt wird. Die Menge von EDS1 ist nämlich in *rar1*-Mutanten reduziert (Shigeyuki Betsuyaku und Jane Parker, unveröffentlichte Daten, Parker et al., 1996; Falk et al., 1999).

In der vorliegenden Arbeit zeigte ich, dass die MLA1- und MLA6-Menge nach einem Temperaturschock stark abnimmt (Abbildung 5a). Dies ist eine mögliche Erklärung für Berichte, nach denen verschiedene R-Proteine, z. B. N aus Tabak, verschiedene R-Proteine gegen Stammrost aus Weizen und Mi aus Tomate, nach Temperaturerhöhung ihre Funktion verlieren (Samuel, 1931; Loegering und Giss, 1957; Dropkin, 1969). Die Kinetik der Abnahme auch in der *rar1-2* Mutante unterscheidet sich nicht signifikant vom Wildtyp (Abbildung 5b). Obwohl RAR1 für die Akkumulation bei normalen Temperaturen benötigt wird, scheint es trotzdem nicht auszureichen, um MLA bei erhöhten Temperaturen zu stabilisieren. Da der Zerfall von MLA1 und MLA6 unterschiedliche Kinetiken besitzt und ein Regulationsmechanismus auf transkriptioneller Ebene fehlt, ist anzunehmen, dass die Abnahme der MLA-Menge eine intrinsische Eigenschaft dieser Proteine ist und nicht aktiv durch die Zelle reguliert wird. Dies könnte sowohl durch direkte Denaturierung auf Grund der erhöhten Temperatur als auch durch Verringerung der Affinität zu einem stabilisierenden Bindungspartner geschehen. HSP90 und RAR1 haben eine stabilisierende Wirkung auf R-Proteine und könnten so Kandidaten für diesen Bindungspartner sein (Tornerio et al., 2002b; Hubert et al., 2003; Bieri et al., 2004). Es wurde gezeigt, dass SGT1 in Tabak einen positiven Einfluss auf die Abundanz von Rx ausübt, während SGT1b in *A. thaliana* einen negativen Einfluss auf die Akkumulation von RPP5 hat (Holt et al., 2005; Azevedo et al., in Vorbereitung). Azevedo *et al.* zeigen, dass Überexpression von *Sgt1a*, das genetisch nicht mit der Resistenzantwort verknüpft ist, eine *sgt1b*-Mutation komplementieren kann, es also für diese Funktion nur eines bestimmten Schwellenwerts an SGT1-Protein bedarf (Azevedo et al., in Vorbereitung). Die widersprüchlichen Ergebnisse von Azevedo *et al.* und Holt *et*

al. könnten sich also möglicherweise durch eine Restaktivität von SGT1a in der *sgt1b*-Mutante in *A. thaliana* erklären lassen (Holt et al., 2005; Azevedo et al., in Vorbereitung). Deswegen ist auch SGT1 ein möglicher Kandidat für einen stabilisierenden Bindungspartner. Allerdings kann man nicht ausschließen, dass es für verschiedene Proteine unterschiedliche Funktionen haben kann. Da die Menge von RAR1, SGT1 und HSP90 über den getesteten Zeitpunkt konstant bleibt (Abbildung 5a), ist es eher unwahrscheinlich, dass die Destabilisierung auf den Einfluss dieser Proteine zurückzuführen ist. Zusätzliche Hinweise auf einen bisher unbekanntem Faktor gibt eine aktuelle Studie, bei der in *S. cerevisiae* MLA Protein und RAR1 zusammen transient exprimiert wurden (Shen, 2004). Trotz hoher Expression gab es keinerlei Hinweis auf eine RAR1 abhängige Stabilisierung, weder bei 30 °C, noch bei 37 °C, obwohl sowohl HSP90-, als auch SGT1-Homologe in Hefe konserviert sind (Shen, 2004). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass ein bestimmter Cofaktor in Hefe fehlt, der für die Funktion von RAR1 benötigt wird. Auch waren die Menge an exprimiertem MLA1 und MLA6 in Hefe vergleichbar. Man kann daraus schließen, dass MLA-Protein nicht intrinsisch instabil ist, da sonst unterschiedliche Mengen an MLA1 und MLA6 bei gleichen Temperaturen, bzw. zwischen MLA1 oder MLA6 bei 30 °C und 37 °C zu erwarten wären. Es ist auch möglich, dass dieser Cofaktor aus mehreren Proteinen, also einem Komplex besteht, der bei höheren Temperaturen instabil wird und deswegen MLA nicht länger stabilisieren kann. RAR1 würde nach dieser Überlegung benötigt, um die Faltung von MLA in diesen Komplex zu unterstützen.

4.4. Ist der Mechanismus der RAR1-abhängige Stabilisierung von R-Proteinen konserviert *in planta*?

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass RAR1 für die Akkumulation von RPM1, MLA1, MLA6 und Rx notwendig ist (Tornero et al., 2002b; Bieri et al., 2004). Die molekularen Mechanismen dieser Stabilisierung sind jedoch bisher unbekannt. Generell gibt es zwei verschiedene Erklärungsmodelle für dieses Phänomen: RAR1 könnte einen negativen Regulator der Stabilität von MLA inhibieren oder die Stabilität durch Faltung in eine native, stabilere Konformation fördern. Ein potentieller Kandidat

für einen negativen Regulator ist SGT1, da bekannt ist, dass SGT1 mit RAR1 interagiert und zumindest SGT1b für RPP5 antagonistisch zur stabilisierenden Funktion von RAR1 zu wirken scheint (Azevedo et al., 2002; Holt et al., 2005). Im Gegensatz dazu stehen neueste Daten, nach denen SGT1 ähnlich wie RAR1 und HSP90, Rx stabilisieren soll, also eher ein Agonist von RAR1 ist (Azevedo et al., in Vorbereitung).

Da alle bekannten Interaktoren von RAR1, SGT1 und HSP90, und deren Funktionen *in planta* hochkonserviert sind, ist davon auszugehen, dass RAR1 in allen pflanzlichen Systemen diese nötigen Cofaktoren zur Verfügung stehen, um R-Proteine zu stabilisieren. Der Mechanismus ist jedoch noch unklar. Eine Möglichkeit ist die Bildung eines stabilen Rezeptorkomplexes. Die Erkennung des Pathogeneffektors geschieht in diesem Fall entweder über eine direkte Erkennung (Rezeptor-Ligand-Modell) oder über eine indirekte Überwachung der Integrität eines in diesem Komplex enthaltenen Wirtsfaktors (*guard*-Hypothese; Van Der Biezen und Jones, 1998; Dangl und Jones, 2001). Sowohl für die direkte, als auch für die indirekte Erkennung von Effektoren durch NB-LRR-Proteine gibt es verschiedene Beispiele (Jia et al., 2000; Mackey et al., 2002; Axtell und Staskawicz, 2003; Deslandes et al., 2003; Mackey et al., 2003; Shao et al., 2003). Jedoch gibt keinen direkten Beweis für eine direkte Interaktion *in planta*, da beide direkten Interaktionen, von Pi-ta mit AVR-Pita und von RRS1 mit PopP2, nur in *in vitro*-Systemen detektiert wurden (Jia et al., 2000; Deslandes et al., 2003). Ein Beweis der Relevanz dieser Interaktionen *in vivo* steht noch aus. Im Gegensatz dazu wurde *in planta* gezeigt, dass RPM1, RPP5 und RPS2 nicht direkt mit den korrespondierenden Effektoren interagieren, sondern dass die durch die Effektoren verursachte Modifikationen eines Wirtsproteins spezifisch durch die korrespondierenden R-Proteine erkannt werden (Mackey et al., 2002; Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003; Shao et al., 2003). Dies unterstützt die Theorie, dass ausgleichende Selektion die indirekte Erkennung favorisiert (Van der Hoorn et al., 2002). Ob MLA die korrespondierenden Effektoren direkt oder indirekt erkennt, ist noch vollkommen unklar. Die einzigen Anhaltspunkte sind bisher Studien im Zweikomponentensystem in Hefe, bei denen nach bisherigen Ergebnissen keine Interaktion zwischen AVRMLA10 und MLA 10 gefunden wurde (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Einen

Hinweis auf eine Spezifität der Wirtsfaktoren in diesem Erkennungskomplex innerhalb von engen Familiengrenzen liefert, die transiente Expression von *Bs2* aus Pfeffer, das nur innerhalb der *Solanaceae* funktionell ist (Tai et al., 1999). Jedoch scheinen die Signaltransduktionswege konserviert zu sein, da z. B. RPS4 aus *A. thaliana* bei transienter Überexpression in Tabak eine RPS4-spezifische HR auslösen kann (Zhang et al., 2004).

Um zu testen, ob der RAR1-abhängige Stabilisierungsmechanismus in Pflanzen zwischen Monokotyledonen und Dikotyledonen konserviert ist und ob MLA möglicherweise auch in Dikotyledonen funktionell ist, generierte ich transgene *A. thaliana*-Linien, die verschiedene *Mla*-Konstrukte enthalten (Abbildung 6). Im Falle einer Konservierung der RAR1-abhängigen Stabilisierung sollten deutliche Unterschiede in der Abundanz von MLA zwischen den Transformanten im Col-0- und *rar1-20*-Hintergrund detektieren kann. Wenn die RAR1-abhängige Stabilisierung nicht konserviert ist, könnte ein spezifischer Wirtsfaktor fehlen, ähnlich wie in *A. thaliana* RIN4 für die Akkumulation von RPM1 benötigt wird (Belkhadir et al., 2004b). Es wurde bereits gezeigt, dass MLA über die Artgrenzen hinaus funktionell ist. So erhöht transiente Expression von MLA6 im Einzelzellsystem in Weizen die Resistenz gegen Gerstenmehltau, der das korrespondierende *Avr*-Allel trägt (Haltermann et al., 2001). Dies ist interessant, da der Locus, der die meisten bekannten Resistenzgene gegen *Blumeria graminis* in Weizen trägt, der *Pm3*-Locus, nicht homolog zum *Mla*-Locus in Gerste ist (Zhou et al., 2001). So müssen sich diese beiden Spezifitäten parallel in zwei gekoppelten Loci entwickelt haben (Zhou et al., 2001). Da Weizen und Gerste sich vor 10-14 Millionen Jahren aufgespalten haben (Wolfe et al., 1989), kann man vermuten, dass sich diese beiden Loci erst später diversifiziert haben, dass also erst später ein massiver Selektionsdruck durch Mehltauinfektion aufgetreten ist, möglicherweise im Zuge der Kultivierung der beiden Spezies. Allerdings ist es durchaus möglich, dass trotzdem ein Homolog des *Mla*-Locus in Weizen existiert, da verschiedene zu *Mla* homologe mRNA-Sequenzen identifiziert wurden (NCBI-Datenbank, Sequenznummer 29169325, 38532139 und 39983006).

Leider war es mir im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich, die *A. thaliana*-Transformanden funktionell zu analysieren.

4.5. Komplexbildung von MLA und die mögliche Rolle von HSP90 und seiner Co-Chaperonen RAR1 und SGT1 in der MLA-Protein vermittelten Resistenz

RAR1, SGT1 und HSP90 werden in verschiedenem Maße von einer Reihe von R-Proteinen zur Vermittlung einer effizienten Resistenzantwort benötigt (Austin et al., 2002; Azevedo et al., 2002; Hubert et al., 2003; Lu et al., 2003; Takahashi et al., 2003; Liu et al., 2004b; Bentem et al., 2005; Hein et al., 2005). Ihre Rolle in der Regulation der Resistenz, neben der Stabilisierung von R-Proteinen, ist aber noch größtenteils ungeklärt. Vor allem ist nicht klar, ob sie nur transient mit R-Proteinen interagieren und eine Rolle in der Faltung, Komplexbildung und eventuell der Degradation nach Aktivierung spielen oder stabil in einen postulierten präformierten Erkennungskomplex eingebettet sind (Shirasu und Schulze-Lefert, 2003). Ich konnte mittels Gelfiltration und Blau-Nativer Gelelektrophorese zeigen, dass zumindest MLA1 *in vivo* einen präformierten Komplex in der Abwesenheit des Pathogens bildet (Abbildung 7). Dieser Daten konnten mittels Gelfiltration auch für MLA6 und für beide Proteine in einem *rar1*-Mutantenhintergrund bestätigt werden (Yusuke Saijo und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Nach diesen Daten liegt der Großteil von MLA als Komplex vor (Yusuke Saijo und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Allerdings ist nicht geklärt, ob es sich dabei um einen homomeren oder heteromeren Komplex handelt. Interaktionen von MLA konnten *in planta* weder mit HSP90 noch mit SGT1 oder RAR1 nachgewiesen werden (Abbildung 8b, c). Dies ist mit Daten von Hubert *et al.* konsistent, nach denen HSP90 kein Teil eines RIN4 und RPM1-enthaltenden Komplexes ist (Hubert et al., 2003). Der LRR von MLA1 und MLA6 interagiert im Zwei-Komponentensystem in Hefe mit HSP90, aber nur isoformspezifisch mit SGT1 (Bieri et al., 2004). Eine Interaktion mit RAR1 konnte nicht nachgewiesen werden (Bieri et al., 2004). In Pflanzen kann SGT1 nach transienter Expression in *N. tabacum* mit Bs2, einem R-Protein aus Pfeffer, *Capsicum annuum*, interagieren, während für RAR1 bisher keine Interaktionen bekannt

sind (Leister et al., 2005). Dies legt den Schluss nahe, dass RAR1, SGT1 und HSP90 in Pflanzen nur transient mit MLA interagieren und keine stabilen Komplexe formen.

RAR1 und HSP90 sind für die Akkumulation von R-Proteinen notwendig (Tornero et al., 2002b; Hubert et al., 2003; Bieri et al., 2004; Liu et al., 2004b; Bentem et al., 2005). Auch SGT1 scheint für die Akkumulation und intramolekulare Umlagerungen von R-Proteinen notwendig zu sein (Leister et al., 2005; Azevedo et al., in Vorbereitung). Der N-terminale Teil des LRR spielt möglicherweise wichtige Rolle in der Stabilität der Proteine. Dies kann man daraus ersehen, dass die Stabilität von Proteinchimären zwischen MLA1 und MLA6 *in planta* stark davon abhängig war und mit der RAR1-Abhängigkeit korrelierte (Shen et al., 2003; Bieri et al., 2004). Die RAR1-Abhängigkeit ließ sich auf einen einzelnen Aminosäurerest reduzieren: Ein Aspartat an der Position 721, das an der Oberfläche des Proteins liegt, machte die MLA-Varianten unabhängig von RAR1, also möglicherweise stabiler (Haltermann und Wise, 2004). *In silico*-Analysen zeigen, dass der LRR von NB-LRR-Proteinen, der die Pathogenspezifität vermittelt, starker positiver Selektion unterliegt (Mondragon-Palomino et al., 2002; Richly et al., 2002; Shen et al., 2003). Vor allem Aminosäurereste an der Oberfläche des Proteins zeigen oft starke Polymorphismen und nichtsynonyme Substitutionen (Mondragon-Palomino et al., 2002). Dies kann dazu führen, dass die Faltung und Funktionalität der R-Proteine beeinträchtigt wird (Jones und Takemoto, 2004). Von HSP90 ist bekannt, dass es die Auswirkungen genetischer Variationen in Pflanzen, in *Arabidopsis thaliana*, und im tierischen System *Drosophila melanogaster* puffern kann (Rutherford und Lindquist, 1998; Queitsch et al., 2002). So verdeckt es verdeckt also die phänotypischen Konsequenzen der Polymorphismen (rezensiert in (Sangster und Queitsch, 2005). Da sowohl HSP90 als auch SGT1 mit dem LRR interagieren, ist es anzunehmen, dass sie besonders für die korrekte Faltung und Stabilisierung dieser Domäne verantwortlich sind und so strukturelle Faltungsprobleme ausgleichen können. Dies ist konsistent mit Daten aus Hefe, nach denen SGT1 auch dort transient mit dem LRR der Adenylatcyclase interagiert (Dubacq et al., 2002).

In Tieren gibt es verschiedene Systeme, die HSP90 benutzen (Pratt und Toft, 2003; Terasawa et al., 2005). Die Funktion von HSP90 wird dabei von einer Vielzahl von Co-Chaperonen moduliert (Pratt und Toft, 2003; Terasawa et al., 2005). Das wohl am besten untersuchte System ist die Reifung von Steroidrezeptoren: Diese werden von der HSP70/HSP90-Chaperonmaschinerie gefaltet und in einem aktivierten Komplex stabilisiert (Pratt und Toft, 2003; Terasawa et al., 2005). Dabei spielen Co-Chaperone wie Hop und p23 eine große Rolle (Pratt und Toft, 2003; Terasawa et al., 2005). Im Gegensatz zu R-Proteinen ist aber HSP90 Teil dieses reifen Steroidrezeptor-Komplexes (Pratt und Toft, 2003; Terasawa et al., 2005). Diese Komplexe dissoziieren regelmäßig und werden neu geformt, was möglicherweise eine Art der Qualitätskontrolle darstellt (Pratt und Toft, 2003). Da die tierischen Homologe von RAR1 und SGT1 nicht in das System der Steroidrezeptorreifung involviert sind, ist davon auszugehen, dass sie zu einem anderen HSP70/HSP90-Chaperonsystem gehören und die Reifung von R-Proteinen sich von der der Steroidrezeptoren unterscheidet. Weitere Einblicke könnte die Isolierung von Interaktoren in MLA-enthaltenden Komplexen und die Rekonstituierung des RAR1-SGT1-HSP90-Systems *in vitro* geben.

4.6. WRKY2 ist ein Glied der MLA-vermittelten Resistenz direkt stromabwärts von MLA

Die Suche nach Interaktoren von MLA im Zwei-Komponenten-System in Hefe führte zur Identifikation eines WRKY-Transkriptionsfaktors (Shen und Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Diese sind eine sehr alte Genfamilie, die in allen Pflanzen konserviert ist (Ulker und Somssich, 2004; Zhang und Wang, 2005). Auch im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* und dem Protisten *Giardia lamblia* konnten WRKY-Sequenzen detektiert werden (Ulker und Somssich, 2004; Zhang und Wang, 2005). Im Gegensatz dazu scheinen sie in Pilzen und Tieren aus ungeklärter Ursache verschwunden zu sein (Ulker und Somssich, 2004; Zhang und Wang, 2005). WRKY-Transkriptionsfaktoren besitzen eine oder zwei WRKY-Domänen, wobei die Proteine mit zwei Domänen die evolutionär älteren zu sein scheinen (Ulker und Somssich, 2004; Zhang und Wang, 2005). In ihrer carboxyterminalen Hälfte besitzen WRKY-Proteine die

konservierte Aminosäuresequenz WRKYGQK und bilden eine Zink-bindende Struktur (Eulgem et al., 2000; Yamasaki et al., 2005). Mit dieser Struktur binden sie zugehörige *cis*-Elemente, die sogenannte W-Boxen, mit der DNA-Sequenz (T)(T)TGAC(C/T), in Promotorregionen (Eulgem et al., 2000; Yamasaki et al., 2005). WRKY-Proteine können sowohl Aktivatoren, als auch Repressoren der Transkription sein, abhängig von der Sequenz um die W-Box (Robatzek und Somssich, 2002; Miao et al., 2004; Xie et al., 2005).

Die Funktion von WRKY-Proteinen ist eng mit der Antwort auf abiotischen und biotischen Stress verknüpft (Eulgem et al., 2000; Liu et al., 2004a; Ulker und Somssich, 2004). So werden bestimmte WRKY-Transkriptionsfaktoren, z. B. WRKY6, WRKY22 und WRKY29, nach der Erkennung des PAMP Flg22, einem konservierten Peptid aus Flagellin, durch die Rezeptorkinase FLS2 hochreguliert und sind Ziele der von FLS2 ausgelösten MAPK-Kaskade (Gomez-Gomez und Boller, 2000; Asai et al., 2002; Navarro et al., 2004). Die Überexpression von AtWRKY29 führt in *A. thaliana* zu erhöhter Resistenz sowohl gegen den Pilz *Botrytis cinerea*, als auch gegen das Bakterium *Pseudomonas syringae*, was auf eine positive Regulierung der Basalen Resistenz durch bestimmte WRKY-Proteine schließen lässt (Asai et al., 2002; Robatzek und Somssich, 2002).

Auch für eine Verbindung von WRKYs mit der R-Protein-vermittelten Resistenz mehren sich die Hinweise. Liu *et al.* zeigten, dass nach posttranskriptioneller Genaktivierung von *NtWRKY1-3* in Tabak, die *N*-vermittelte Resistenz schwer beeinträchtigt wird und diese Transkriptionsfaktoren deswegen einen Einfluss auf die R-Protein vermittelte Resistenz haben (Liu et al., 2004a). Nach der Rosetta-Stein-Hypothese, die die Evolution von Protein-Protein-Wechselwirkungen beschreibt, ist die Interaktion von Proteinen wahrscheinlich, wenn sie in einer Spezies von zwei unterschiedlichen, unabhängigen Genen codiert werden, in einer anderen nur durch ein Gen (Marcotte et al., 1999). Tatsächlich ist in zwei der 149 putativen NB-LRR-Proteine aus *Arabidopsis* eine WRKY-Domäne mit einer R-Proteinstruktur fusioniert. Eines davon ist RSS1. Bei diesem Protein ist ein aminoterminales TIR-TIR-NB-LRR-Protein mit einer

carboxyterminalen WRKY-Domäne verknüpft (Deslandes et al., 2002; Deslandes et al., 2003). RRS1 vermittelt Resistenz gegen das Bodenbakterium *Ralstonia solanacearum*, indem es direkt den Effektor PopP2 erkennt (Deslandes et al., 2002; Deslandes et al., 2003). *At4g12020* kodiert für ein NB-LRR R-Protein mit einer aminoterminalen WRKY-Domäne (Noutoshi et al., 2005). Seine Funktion ist bisher aber unbekannt (Noutoshi et al., 2005). Das legt nahe, dass WRKY-Proteine auch *in vivo* mit NB-LRR-Proteinen interagieren können (Noutoshi et al., 2005).

Aktuelle Ergebnisse zeigen, dass die CC-Domäne von MLA1 und MLA6 zumindest mit dem C-Terminus von HvWRKY2 in Hefe wechselwirken kann (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Die CC-Domäne interagiert auch mit dem nahe verwandten HvWRKY1 in Hefe (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Meine Ergebnisse bestätigen, dass MLA und HvWRKY2 *in vitro* wechselwirken, ohne dass ein Cofaktor aus Hefe benötigt wird (Abbildung 9c). Diese Interaktion impliziert, dass beide WRKY-Proteine auch eine physiologische Funktion im Zusammenhang mit MLA haben können. Nach Überexpression beider WRKY-Proteine im transienten Einzelzellexpressionssystem wurde eine starke Beeinträchtigung der rassenspezifischen *Mla1*, *Mla10* und *Mla12*-vermittelten Resistenz festgestellt, während der Einfluss auf die *Mla6*-vermittelte Resistenz eher gering war (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Keine signifikanten Unterschiede konnten für die *Mlg*-vermittelte und für die Breitbandresistenz in der *mlo*-Mutante festgestellt werden (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Als weitere Kontrolle wurde SUSIBA2 benutzt, ein WRKY-Protein aus Gerste, das den Stärkestoffwechsel im Endosperm kontrolliert (Sun et al., 2003). Auch hier konnte kein signifikanter Einfluss auf die Resistenz festgestellt werden (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Zusätzlich zur Beeinträchtigung der rassenspezifischen Resistenz konnte eine deutliche negative Regulation der basalen Resistenz in der kompatiblen Interaktion nach transienter Überexpression von HvWRKY2 detektiert werden, was eine Funktion in der PAMP-vermittelten Resistenz impliziert (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Experimente mit posttranskriptionale Geninaktivierung von HvWRKY1 und HvWRKY2

implizieren eine Erhöhung der Resistenz und sind damit konsistent (Eckey et al., 2004; Gregor Langen und Karl-Heinz Kogel, unveröffentlichte Daten). Die Ergebnisse zeigen, dass HvWRKY1 und HvWRKY2 spezifisch in die basale, PAMP-vermittelte und zusätzlich in die *Mla*-vermittelte Resistenz involviert sind. Da sie erst nach der Infektion exprimiert werden und die Resistenzantwort negativ beeinflussen, ist es wahrscheinlich, dass ihre Funktion in der Kontrolle der Intensität der PAMP-vermittelten Resistenz liegt um durch Repression der Resistenzantwort den programmierten Zelltod zu verhindern. Unklar bleibt jedoch die Rolle von HvWRKY1 und HvWRKY2 in der MLA-vermittelten Resistenz.

Verschiedene Gründe favorisieren eine Rolle für die WRKY-Proteine in der Signaltransduktion. So waren in Hefe die Interaktionssignale mit der CC-Domäne stärker als mit den CC-NB-Konstrukten (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Dies lässt darauf schließen, dass intramolekulare Umlagerungen vor der Interaktion notwendig sind, wie sie für die Aktivierung von anderen Proteinen berichtet werden (Moffett et al., 2002; Leister et al., 2005). Also könnte die Möglichkeit zur Interaktion erst nach der Aktivierung von MLA bestehen. Des Weiteren ist die mRNA der WRKY-Proteine in gesunden Pflanzen nicht detektierbar, was darauf hindeutet, dass kein Protein vorhanden ist (Eckey et al., 2004, Gregor Langen und Karl-Heinz Kogel, unveröffentlichte Daten). Deswegen ist es auch unwahrscheinlich, dass sie von MLA überwachte Virulenzziele der Effektoren sind. Dies konnte mit Studien im Zwei-Komponenten-System in Hefe bestätigt werden, bei denen weder eine Interaktion von HvWRKY2 mit dem einzigen bekannten Effektor von MLA, AVRMLA10, noch mit AVRMLK nachgewiesen werden konnte (Ridout et al., in Vorbereitung; Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Allerdings ist möglich, dass eine Prozessierung und somit Aktivierung der Effektoren erst *in planta* stattfindet, wie für AvrRpt2 gezeigt wurde (Coaker et al., 2005). Ein eukaryotisches Cyclophilin katalysiert dabei eine Peptidyl-Prolyl-Isomerisierung, die AvrRpt2 ermöglicht, seinen Aminoterminus zu schneiden und so aktiv zu werden (Coaker et al., 2005). Eine solche Strategie ermöglicht dem Pathogen, sich vor der potentiell schädlichen Wirkung der Effektoren zu schützen und ist auch für die Effektoren anderer Pathogene denkbar.

Möglicherweise ist das auch bei den Effektoren von *B. graminis* der Fall, die dann *in vitro* nicht funktionell wären. Es scheint also möglich, dass MLA-Proteine nach Erkennung der korrespondierenden Effektoren die Funktion der HvWRKY-Proteine inhibieren und so die Resistenzantwort potenzieren, was dann zum Zelltod führt. Um zu verifizieren, dass HvWRKY1 und HvWRKY2 in die Signaltransduktion von MLA involviert sind, müsste man versuchen, ihre Interaktion mit MLA und somit auch die Funktion in der *Mla*-vermittelten Resistenz und ihre Funktion in der basalen Resistenz zu separieren. HvWRKY, was immer noch in der basalen, aber nicht mehr in der MLA-vermittelten Resistenz aktiv ist, würde auf eine Beteiligung an der *Mla*-vermittelten Signatransduktion hinweisen.

4.7. Das Proteasom kontrolliert MLA-Abundanz

Pflanzliche R-Proteine können Zelltod vermitteln. Deswegen ist es essentiell für die Pflanze, R-Proteine genau zu kontrollieren und eventuelle unkontrolliert aktive Varianten sofort zu eliminieren. Meine Daten zeigen, dass eine Inhibierung des Proteasoms den Abbau von MLA1 und MLA6 verlangsamt (Abbildung 10). Dies legt die Überlegung nahe, dass eine Qualitätskontrolle der Integrität von MLA stattfinden und anormales Protein über den proteasomalen Abbau entsorgt werden könnte. Auch in *rar1*-Mutanten konnte nach vorläufigen Ergebnissen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu *RAR1* in der proteasomalen Degradation von MLA festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Posttranslationale Modifikationen und Punktmutationen können die Faltung von Proteinen beeinflussen und zu missgefalteten, anormalen Varianten führen. In der Tat gibt es verschiedene Berichte von mutierten NB-LRR-Protein, die konstitutiv aktiv sind (Bendahmane et al., 2002; Hwang und Williamson, 2003; Zhang et al., 2003). Die Mutationen liegen dabei alle in der NB-Domäne oder der LRR-Region (Bendahmane et al., 2002; Hwang und Williamson, 2003; Zhang et al., 2003). Da besonders die LRR-Region starker Selektion unterworfen ist, was die Faltung und Funktionalität der R-Proteine beeinflussen kann, ist davon auszugehen, dass Punktmutationen in dieser Region zu einer weiteren Beeinträchtigung der Faltungsfähigkeit und so zu konstitutiv aktiven Formen führen können (Jones und Takemoto, 2004; vgl. 4.5.). Es gibt Hinweise

darauf, dass möglicherweise alle R-Proteine konstitutiv aktiv sind. So kann transient in Tabak überexprimiertes RPS4 eine starke HR auslösen, während bei transgener Expression in *A. thaliana* bei vergleichbarem Proteinniveau keine lethalen Phänotypen zu beobachten waren (Zhang et al., 2004). Dies ist konsistent mit der Anwesenheit funktioneller Repressoren in *A. thaliana*, aber nicht in Tabak (Zhang et al., 2004). Das wird durch Ergebnisse unterstützt, nach denen RPM1 und RPS2 ohne den stabilisierenden Interaktor und funktionalen Repressor RIN4 autoaktiv sind (Axtell und Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2003; Belkhadir et al., 2004b). Eine Restaktivität bei unvollständiger Repression ist eine mögliche Erklärung für die Fitnesskosten, die mit der Expression von R-Proteinen verbunden sind (Brown, 2002, 2003; Tian et al., 2003). Um die Pflanze zu schützen, muss also ein Qualitätskontrollmechanismus existieren, der Faltung und Degradation kontrolliert und die Integrität der R-Proteine überwacht. SGT1 ist ein Protein, das an einem solchen Mechanismus beteiligt sein könnte.

Viele *R*-Gene sind genetisch von *Sgt1* abhängig (Azevedo et al., 2002; Tor et al., 2002; Muskett und Parker, 2003; Shen et al., 2003). SGT1 wurde ursprünglich als Protein beschrieben, das in Hefe eine essentielle Komponente des Kinetochorkomplexes und eine Untereinheit des SCF-Ubiquitin-Ligase-Komplexes ist (Kitagawa et al., 1999). Das SGT1-Homolog aus Pflanzen kann die *sgt1*-Mutante in Hefe komplementieren (Azevedo et al., 2002). Im Zell-Lysat von Gerste und von *Nicotiana benthamiana* kann SGT1 mit Komponenten des SCF-Komplexes interagieren (Azevedo et al., 2002; Liu et al., 2002b). Dies deutet darauf hin, dass es in Pflanzen und Hefe ähnliche Funktionen in der proteasomalen Degradation erfüllt. Der SCF-Komplex ist ein E3-Ubiquitinligase-Komplex, der die Substratspezifität der Ubiquitylierung vermittelt (Willems et al., 2004). Zumindest in der N-vermittelten Resistenz scheint der SCF-Komplex und das COP9-Signalosom eine Rolle zu spielen, da durch posttranskriptionelle Geninaktivierung essentieller Komponenten dieser Komplexe die N-vermittelte Resistenz gegen TMV beeinträchtigt wird (Liu et al., 2002b). Dies lässt die Überlegung zu, dass SGT1 in der HSP90-Chaperon-Maschinerie eine Art Kontrollmechanismus darstellen könnte, der missgefaltete Proteine zur Degradation an das Proteasom weiterleitet.

Eine Kopplung von Faltung und Degradation wurde bisher für die HSP90-Substrate Glucocorticoidrezeptor (GR) und Cystische Fibrose Transmembranleitungsregulator (CFTR) gezeigt (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Dabei bindet CHIP (mit dem Carboxyterminus von HSP70 interagierendes Protein) an einen HSP70/HSP90-Chaperonkomplex und blockiert die weitere Faltung (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Interessanterweise zeigt der C-Terminus von CHIP strukturelle Ähnlichkeiten zu Komponenten des Ubiquitin/Proteasom-Systems. Es besitzt ähnlich wie der Ubiquitinylierungsfaktor Ufd2 aus Hefe, eine U-Box-Domäne, die an der Ubiquitinylierung beteiligt ist (Koepl et al., 1999). Es wurde auch gezeigt, dass diese Domäne die Degradation von Chaperon-Substraten durch die Ubiquitin/Proteasom-Maschinerie fördert und sogar direkt als Ubiquitinligase wirkt (Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001; Peng et al., 2004). Auch für ein anderes Protein, VHL (von Hippel-Lindau tumor-suppressor protein), wurde beschrieben, dass es der Qualitätskontrolle durch einen HSP90 abhängigen Mechanismus unterliegt (McClellan et al., 2005). Da andere HSP90/HSP70-Co-Chaperone ebenfalls Domänen aufweisen, die auf eine Verbindung mit der proteasomalen Degradation hindeuten, könnte diese Qualitätskontrolle ein genereller Mechanismus sein (Hohfeld et al., 2001).

SGT1 zeigt gewisse strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zu CHIP. So besitzt SGT1 wie CHIP TRPs (Tetratricopeptidwiederholungen) am N-Terminus (Ballinger et al., 1999; Azevedo et al., 2002). Allerdings bindet CHIP HSP70 und HSP90 durch diese TPRs, während bei SGT1 die CS-Domäne die Bindung zu HSP70 und HSP90 vermittelt (Ballinger et al., 1999; Lee et al., 2004). Für beide Proteine wurde ein direkter Zusammenhang mit der proteasomalen Degradation gezeigt (Kitagawa et al., 1999; Connell et al., 2001; Meacham et al., 2001). Möglicherweise besitzt SGT1 eine ähnliche Funktion, wie für CHIP bei der Prozessierung von ungefaltetem Protein gefunden wurde. Zwei unabhängige Studien zeigen, dass CHIP in der Qualitätskontrolle der Proteinfaltung involviert ist und die Ubiquitinylierung und den Abbau missgefalteter Proteine vermittelt (Meacham et al., 2001; Murata et al., 2001). Außerdem scheint es die HSP70 vermittelte Faltung von Protein *in vivo* zu fördern, besitzt also einen dualen Mechanismus in der Kontrolle der Proteinfaltung (Kampinga et al., 2003). Übertragen auf SGT1 und R-

Proteine würde das bedeuten, dass SGT1 zusammen mit HSP90 und RAR1 die Faltung von R-Proteinen fördert und die Degradation missgebildeter Proteine über das Proteasom vermittelt. Im Gegensatz zu neueren Theorien wäre SGT1 also ebenfalls an der Qualitätskontrolle der R-Proteine beteiligt, nicht nur an der Degradation nach Aktivierung (Tor et al., 2003). Dies deckt sich mit meinen Resultaten. Unklar ist jedoch, ob die Proteasom-vermittelte Degradation wirklich abhängig von SGT1 ist. Des Weiteren ist die Wechselbeziehung zwischen RAR1, HSP90 und dem Proteasom noch ungeklärt, sodass weitere Studien nötig sind, um die genauen Zusammenhänge aufzudecken.

4.8. MLA kann *in vitro* sumoyliert werden

SUMO (small ubiquitin-like modifier) ist ein Ubiquitin-ähnliches Protein, das ähnlich wie Ubiquitin in allen Eukaryoten konserviert ist. Während in Hefe, Nematoden und Insekten nur ein Homolog existiert, sind es in Vertebraten drei und in Pflanzen bis zu acht (Kurepa et al., 2003; Hay, 2005). SUMO modifiziert, wie Ubiquitin und viele Ubiquitin-ähnliche Proteine, Lysinreste von Proteinsubstraten. Neben verschiedenen Funktionen in der Kontrolle des Zellzyklus, der Reparatur von DNA und dem Transport in den Zellkern, blockiert es aber auch Lysinreste für Ubiquitylierung und schützt so das Protein vor Degradation durch das Proteasom (Meluh und Koshland, 1995; Desterro et al., 1998; Tanaka et al., 1999; Rodriguez et al., 2001). Die Desumoylierung ist noch wesentlich komplexer, da es in Pflanzen mindestens zwölf Sumopeptidasen und viele ähnliche Proteine gibt (Kurepa et al., 2003; Murtas et al., 2003). Interessant ist, dass MLA zumindest *in vitro* durch SUMO modifiziert werden kann. (Abbildung 11a). Obwohl es nicht möglich war, die notwendigen Aminosäuren zu lokalisieren, zeigt das, dass MLA im Gegensatz zu anderen Proteinen wie EDS1 und SGT1 über Sumoylierungsstellen verfügt (Abbildung 11c, Hans-Peter Stuibler, unveröffentlichte Daten).

Es ist bekannt, dass SUMO-Peptidasen und SUMO in der Interaktion von Pflanze und Pathogenen wichtig sind. Das SUMO-Homolog T-SUMO aus Tomate scheint eine Rolle in der hypersensitiven Reaktion nach Erkennung des Elicitors EIX (*ethylen-inducing*

protein) aus dem Pilzpathogen *Trichoderma viride* zu spielen (Hanania et al., 1999). EIX wird vom R-Protein LeEix2 erkannt, das strukturelle Ähnlichkeiten zu Cf-Proteinen zeigt (Ron und Avni, 2004). Möglicherweise vermittelt T-SUMO dabei durch die direkte Interaktion die Erkennung des Elicitors (Hanania et al., 1999). Mindestens zwei bakterielle Effektorgene aus *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, XopD und AvrXv4, codieren für funktionelle SUMO-Isopeptidasen mit Homologie zu den Sumoisopeptidasen Ulp1 aus Hefe und YopJ aus dem Humanpathogen *Yersinia* (Orth, 2002; Hotson et al., 2003; Roden et al., 2004). Ein weiterer bakterieller Effektor PopP2 aus *Ralstonia solanacearum*, der ebenfalls strukturelle Ähnlichkeit zu YopJ zeigt, interagiert mit dem TIR-NB-LRR-Protein RRS1 aus *Arabidopsis*, das dann Resistenz vermitteln kann (Deslandes et al., 2003), vgl. Kapitel 4.6.). Unklar ist allerdings, ob PopP2 wirklich SUMO-Peptidaseaktivität zeigt (Hotson und Mudgett, 2004).

Die Rolle von SUMO in der MLA-vermittelten Resistenz ist vollkommen ungeklärt. Unwahrscheinlich ist, dass es an der direkten Erkennung beteiligt ist. Die Sequenz von den bekannten Effektoren AVRMLA10 und AVRMLK weist keine Homologie zu bekannten Proteinen, auch nicht zu Sumopeptidasen, auf (Ridout et al., in Vorbereitung). Mit dem Zwei-Komponentensystem in Hefe wurden weder Hinweise auf eine direkte Interaktion der Effektoren mit MLA noch mit einem SUMO-ähnlichen Protein gefunden (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Auch weist MLA in Pflanzen die gleiche Größe auf wie durch Ulp1 desumoyliertes Protein (Daten nicht gezeigt). Andere mögliche Funktionen beinhalten Transport oder der Stabilisierung von MLA. Möglich ist, dass MLA sumoyliert und in den Kern transportiert wird. Da WRKY-Proteine bevorzugt kernlokalisiert sind, könnte es dort mit ihnen interagieren und die rassenspezifische Resistenz vermitteln. Dies deckt sich mit vorläufigen Daten, die auf eine Kernlokalisierung von MLA hindeuten (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Dabei wurde nach transienter Expression von MLA-GFP im Einzelzellsystem die Fluoreszenz größtenteils im Kern detektiert (Qian-Hua Shen und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten). Bisher konnte jedoch keine Sumoylierung von MLA-Protein in der Abwesenheit des Pathogens detektiert werden, was gegen diese Möglichkeit spricht (Yusuke Saijo und Paul Schulze-Lefert, unveröffentlichte Daten).

Wahrscheinlicher ist, dass SUMO in diesem Fall als Antagonist von Ubiquitin zum Schutz der Proteine vor proteasomaler Degradation dient. SGT1 spielt eine Rolle in der intramolekularen Umlagerung nach Aktivierung, was den Schluss zulässt, dass das Proteasom auch an der Degradation von aktiviertem R-Protein beteiligt sein könnte (Leister et al., 2005 und vgl. 4.7.). Sumoylierung könnte durch Blockierung der Ubiquitynylierung die Halbwertszeit der Proteine erhöhen und somit eine Möglichkeit zur Signalverstärkung darstellen.

4.9. Ein generelles Modell der MLA-vermittelten Resistenz

Obwohl noch viele Kontrollmechanismen der MLA-vermittelten Resistenz im Dunkeln liegen, hat meine Arbeit doch weitere Hinweise über ihre Eigenschaften und Regulierung gebracht. Diese Hinweise wurden zusammen mit Daten anderer Veröffentlichungen zu Modellen über die Regulierung der Faltung und Stabilität sowie der Aktivierung und Vermittlung der Resistenz zusammengefasst, die so oder ähnlich auch für andere R-Proteine gelten könnten (Abbildung 12, Abbildung 13)

Die Beteiligung zumindest von RAR1 an der Stabilisierung von MLA *in planta*, aber die Abwesenheit in einem möglichen präformierten Erkennungskomplex, deuten auf eine transiente Interaktion hin (Abbildung 8; Bieri et al., 2004). Auch HSP90 und SGT1 scheinen in Hefe, aber nicht *in vitro* mit MLA zu interagieren (Bieri et al., 2004). Eine R-Protein stabilisierende Funktion ist auch für SGT1 und HSP90 in anderen pflanzlichen Systemen belegt (Hubert et al., 2003; Liu et al., 2004b; Azevedo et al., in Vorbereitung). Daten aus Hefe und menschlichen Zellen ziehen eine zusätzliche Verbindung von SGT1 und HSP90 zur Degradation von Proteinen (Kitagawa et al., 1999; McClellan et al., 2005). Dies deutet auf eine duale Funktion der beiden Proteine in Faltung und Degradation hin, was auf einen Funktion in der Kontrolle der Strukturintegrität schließen lässt (vgl. 4.5., 4.7). Möglicherweise trifft also ein RAR1, SGT1 und HSP90 enthaltender Komplex die Entscheidung zwischen Stabilisierung und Degradation von MLA (Abbildung 12)

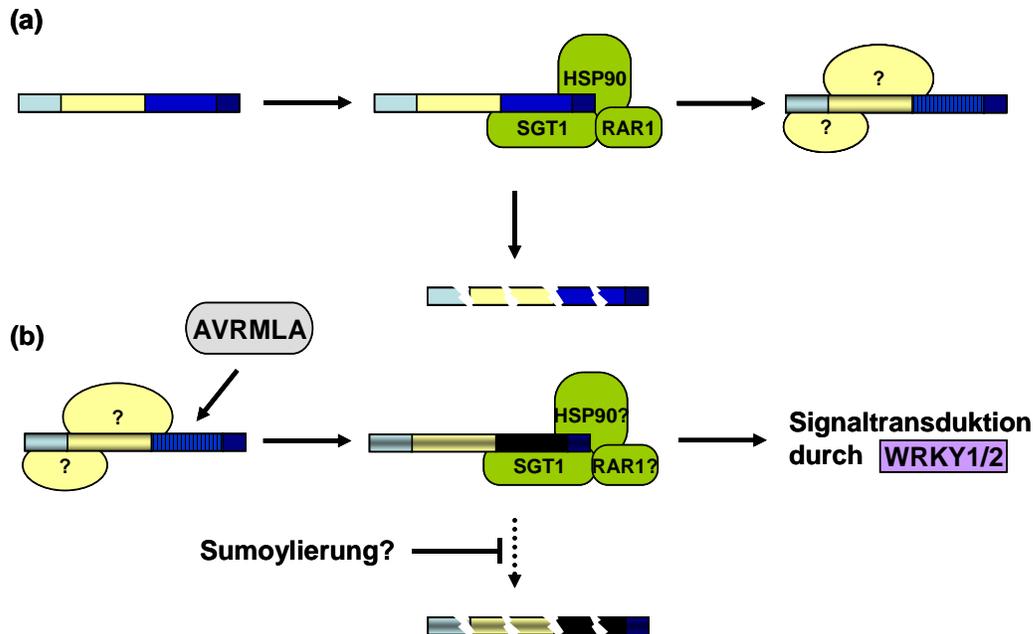


Abbildung 12: Die mögliche Rolle von RAR1, SGT1 und HSP90 in der Stabilisierung und Aktivierung von MLA

- (a) HSP90 und seine Co-Chaperone RAR1 und SGT1 kontrollieren die Stabilisierung von MLA-Protein. Sie könnten ein Kontrollpunkt sein, der die Faltung von MLA fördert und überwacht sowie die Entscheidung zwischen Degradation durch das Proteasom und Stabilisierung in einem präformierten Erkennungskomplex trifft. Dieser Erkennungskomplex enthält mehrere unbekannte Proteine, von denen eines ein Zielprotein von Effektormolekülen sein kann.
- (b) Nach Aktivierung durch Erkennung des korrespondierenden Effektormoleküls AVRMLA ist MLA Subjekt intramolekularer Umlagerungen, die von SGT1 und möglicherweise auch RAR1 und HSP90 unterstützt werden. Aktivierte MLA-Moleküle könnten durch das Proteasom abgebaut werden. Sumoylierung von MLA könnte diesen Abbau hemmen und so das Signal verstärken.

Die Rolle von HSP90, SGT1 und RAR1 nach Aktivierung ist noch ungeklärt. Allerdings gibt es Hinweise, dass zumindest SGT1 an intramolekularen Umlagerungen nach Erkennung von Effektoren beteiligt ist (Leister et al., 2005). Möglicherweise spielen auch seine Interaktoren HSP90 und RAR1 eine Rolle bei Prozessen nach der Aktivierung des R-Proteins (Abbildung 12b). Obwohl die Rolle der Sumoylierung noch offen ist, scheint am ehesten eine Funktion als Antagonist einer möglichen Ubiquitylierung und des darauf folgenden Abbaus in Betracht zu kommen (vgl. 4.8.). So könnte aktiviertes Protein stabilisiert und das Signal verstärkt werden (Abbildung 12b).

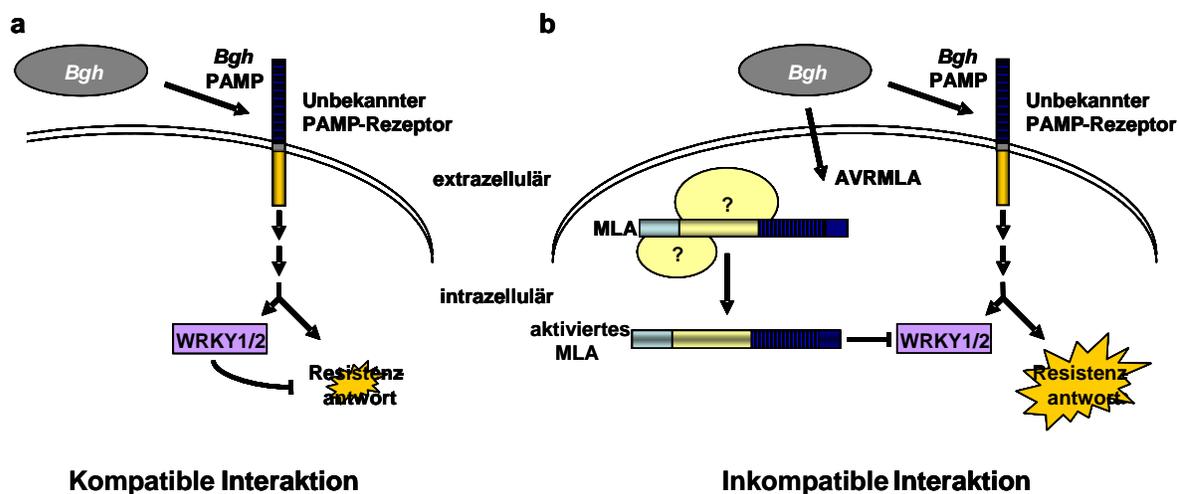


Abbildung 13: Ein generelles Modell der basalen und MLA-vermittelten resistenzspezifischen Resistenz in Gerste gegen Gerstenmehltau

- (a) Nach der Infektion durch *Bgh* werden bestimmte PAMPs durch einen oder mehrere bisher unbekannte PAMP-Rezeptoren erkannt, die eine basale Resistenzreaktion auslösen. HvWRKY1 und HvWRKY2 werden nach der Infektion induziert und inhibieren die Resistenzreaktion um den Zelltod zu verhindern.
- (b) Nach Erkennung des korrespondierenden Effektors wird MLA aktiviert. Aktiviertes MLA inhibiert die inhibierende Funktion des WRKY-Proteins. So wird die PAMP-vermittelte Resistenzantwort potenziert, führt zu Einzelzelltod und somit zu Resistenz.

Die Identifizierung von WRKY-Transkriptionsfaktoren als MLA-Interaktoren wirft neues Licht auf die mögliche Signaltransduktion von Resistenzproteinen. In der basalen Resistenz können sie die Intensität der PAMP-vermittelten Resistenzantwort kontrollieren, um Zelltod zu verhindern (Abbildung 13a). In der MLA-vermittelten Resistenz kann durch die Erkennung von AVRMLA aktiviertes MLA-Protein die Funktion von HvWRKY1 und HvWRKY2 inhibieren, sodass die Resistenzantwort potenziert wird. (Abbildung 13b). Dies führt zum Absterben der Zelle und zu einer Resistenz gegen *Bgh*. Um allerdings ein vollständiges Bild der MLA-vermittelten Resistenz zu entwerfen, werden noch Jahre, wenn nicht Jahrzehnte der Forschung notwendig sein.

5. Literatur

- 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. *PNAS* **95**, 10306-10311.
- Akira, S., and Takeda, K.** (2004). Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* **4**, 499-511.
- 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.
- 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.
- Athman, R., and Philpott, D.** (2004). Innate immunity via Toll-like receptors and Nod proteins. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 25-32.
- Austin, M.J., Muskett, P., Kahn, K., Feys, B.J., Jones, J.D.G., 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.
- Azevedo, C., Betsuyaku, S., Peart, J., Takahashi, A., Noel, L., Sadanandom, A., Casais, C., Baulcombe, D.C., Parker, J., and Shirasu, K.** (in Vorbereitung). Threshold-dependent recruitment of Arabidopsis SGT1 proteins in immunity and development.
- Ballinger, C.A., Patrice Connell, Yaxu Wu, Zhaoyong Hu, Larry J. Thompson, Li-Yan Yin, and Patterson, C.** (1999). Identification of CHIP, a Novel

- Tetratricopeptide Repeat-Containing Protein That Interacts with Heat Shock Proteins and Negatively Regulates Chaperone Functions. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 4535-4545.
- Bansal, P.K., Abdulle, R., and Kitagawa, K.** (2004). Sgt1 Associates with Hsp90: an Initial Step of Assembly of the Core Kinetochore Complex. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8069-8079.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R., and Dangl, J.L.** (2004a). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 391-399.
- Belkhadir, Y., Nimchuk, Z., Hubert, D.A., Mackey, D., and Dangl, J.L.** (2004b). Arabidopsis RIN4 Negatively Regulates Disease Resistance Mediated by RPS2 and RPM1 Downstream or Independent of the NDR1 Signal Modulator and Is Not Required for the Virulence Functions of Bacterial Type III Effectors AvrRpt2 or AvrRpm1. *Plant Cell* **16**, 2822-2835.
- Bendahmane, A., Farnham, G., Moffett, P., and Baulcombe, D.C.** (2002). Constitutive gain-of-function mutants in a nucleotide binding site-leucine rich repeat protein encoded at the Rx locus of potato. *The Plant Journal* **32**, 195-204.
- Bentem, S.d.I.F., Vossen, J.H., Vries, K.J., Wees, S., Tameling, W.I.L., Dekker, H.L., Koster, C.G., Haring, M.A., Takken, F.L.W., and Cornelissen, B.J.C.** (2005). Heat shock protein 90 and its co-chaperone protein phosphatase 5 interact with distinct regions of the tomato I-2 disease resistance protein. *The Plant Journal* **43**, 284-298.
- 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.
- Bisgrove, S.R., Simonich, M.T., Smith, N.M., Sattler, A., and Innes, R.W.** (1994). A Disease Resistance Gene in Arabidopsis with Specificity for Two Different Pathogen Avirulence Genes. *Plant Cell* **6**, 927-933.

- Boyes, D.C., Nam, J., and Dangl, J.L.** (1998). The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *PNAS* **95**, 15849-15854.
- Brancaccio, M., Menini, N., Bongioanni, D., Ferretti, R., De Acetis, M., Silengo, L., and Tarone, G.** (2003a). Chp-1 and melusin, two CHORD containing proteins in vertebrates. *FEBS Letters* **551**, 47-52.
- Brancaccio, M., Guazzone, S., Menini, N., Sibona, E., Hirsch, E., De Andrea, M., Rocchi, M., Altruda, F., Tarone, G., and Silengo, L.** (1999). Melusin Is a New Muscle-specific Interactor for $\beta 1$ Integrin Cytoplasmic Domain. *J. Biol. Chem.* **274**, 29282-29288.
- Brancaccio, M., Fratta, L., Notte, A., Hirsch, E., Poulet, R., Guazzone, S., De Acetis, M., Vecchione, C., Marino, G., Altruda, F., Silengo, L., Tarone, G., and Lembo, G.** (2003b). Melusin, a muscle-specific integrin $\beta 1$ -interacting protein, is required to prevent cardiac failure in response to chronic pressure overload **9**, 68-75.
- Braun, U., Cook, R.T.A., Inman, A.J., and H.-D., S.** (2002). The taxonomy of the powdery mildew fungi. In *The powdery mildews: a comprehensive treatise*, R. Bélanger, A.J. Dik, and W.R. Bushnell, eds (St. Paul, Minnesota, USA: APS Press), pp. 13-54.
- Brown, J.K.M.** (2002). Yield penalties of disease resistance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 339-344.
- Brown, J.K.M.** (2003). A cost of disease resistance: paradigm or peculiarity? *Trends in Genetics* **19**, 667-671.
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstra, R.D.** (1995). Structure and Evolution of Genes Encoding Polyubiquitin and Ubiquitin-Like Proteins in *Arabidopsis thaliana* Ecotype Columbia. *Genetics* **139**, 921-939.
- Cannon, S.B., Zhu, H., Baumgarten, A.M., Spangler, R., May, G., and Cook, D.R.** (2002). Diversity, Distribution, and Ancient Taxonomic Relationships Within the TIR and Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Subfamilies. *Journal of Molecular Evolution* **54**, 548-562.

- Chamaillard, M., Hashimoto, M., Horie, Y., Masumoto, J., Qiu, S., Saab, L., Ogura, Y., Kawasaki, A., Fukase, K., Kusumoto, S., Valvano, M.A., Foster, S.J., Mak, T.W., Nunez, G., and Inohara, N.** (2003). An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid 4, 702-707.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987). Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**, 156-159.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**, 735-743.
- Coaker, G., Falick, A., and Staskawicz, B.** (2005). Activation of a Phytopathogenic Bacterial Effector Protein by a Eukaryotic 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.
- Connell, P., Ballinger, C.A., Jiang, J., Wu, Y., Thompson, L.J., Hohfeld, J., and Patterson, C.** (2001). The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins **3**, 93-96.
- Coppinger, P., Repetti, P.P., Day, B., Dahlbeck, D., Mehlert, A., and Staskawicz, B.J.** (2004). Overexpression of the plasma membrane-localized NDR1 protein results in enhanced bacterial disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **40**, 225-237.
- Dangl, J.L., and Jones, J.D.G.** (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Day, B., Dahlbeck, D., Huang, J., Chisholm, S.T., Li, D., and Staskawicz, B.J.** (2005). Molecular Basis for the RIN4 Negative Regulation of RPS2 Disease Resistance. *Plant Cell* **17**, 1292-1305.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., and Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.

- Deslandes, L., Olivier, J., Theulieres, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y.** (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS* **99**, 2404-2409.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *PNAS* **100**, 8024-8029.
- Desterro, J.M.P., Rodriguez, M.S., and Hay, R.T.** (1998). SUMO-1 Modification of I κ B α Inhibits NF- κ B Activation. *Molecular Cell* **2**, 233-239.
- Dittgen, J.** (2005). Genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz gegenüber biotrophen Mehltreiberpilzen in *Arabidopsis thaliana*. In MPI für Züchtungsforschung (Köln: Universität zu Köln).
- Dropkin, V.H.** (1969). The necrotic reaction of tomatoes and other hosts resistant to *Meloidogyne*: Reversal by temperature. *Phytopathology* **59**, 1632-1637.
- Dubacq, C., Guerois, R., Courbeyrette, R., Kitagawa, K., and Mann, C.** (2002). Sgt1p Contributes to Cyclic AMP Pathway Activity and Physically Interacts with the Adenylyl Cyclase Cyr1p/Cdc35p in Budding Yeast. *Eukaryotic Cell* **1**, 568-582.
- Durner, J., Wendehenne, D., and Klessig, D.F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *PNAS* **95**, 10328-10333.
- Durrant, W.E., and Dong, X.** (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* **42**, 185-209.
- Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G., and Kogel, K.-H.** (2004). Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* **55**, 1-15.
- Espinosa, A., and Alfano, J.R.** (2004). Disabling surveillance: bacterial type III secretion system effectors that suppress innate immunity. *Cellular Microbiology* **6**, 1027-1040.

- Esquerre-Tugaye, 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 in Plant Science* **10**, 71-78.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* **5**, 199-206.
- Falk, A., Feys, B.J., Frost, L.N., Jones, J.D.G., 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. *PNAS* **96**, 3292-3297.
- 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.J., Wiermer, M., Bhat, R.A., Moisan, L.J., Medina-Escobar, N., Neu, C., Cabral, A., and Parker, J.E.** (2005). Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. *Plant Cell* **17**, 2601-2613.
- Flor, H.H.** (1971). Current Status of the Gene for Gene Concept. In *Annual Review of Phytopathology*, J.G. Horsfall, ed (Palo Alto, Calif., U.S.A: Illus. Annual Reviews Inc.), pp. 275-296.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M.J., Pittman, J.K., Marvier, A.C., Buchanan, A.J., Sauer, N., Hall, J.L., and Williams, L.E.** (2003). The Monosaccharide Transporter Gene, AtSTP4, and the Cell-Wall Invertase, At β fruct1, Are Induced in Arabidopsis during Infection with the Fungal Biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiol.* **132**, 821-829.
- 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.

- Garcia-Ranea, J.A., Mirey, G., Camonis, J., and Valencia, A.** (2002). p23 and HSP20/[alpha]-crystallin proteins define a conserved sequence domain present in other eukaryotic protein families. *FEBS Letters* **529**, 162-167.
- Girardin, S.E., Sansonetti, P.J., and Philpott, D.J.** (2002). Intracellular vs extracellular recognition of pathogens - common concepts in mammals and flies. *Trends in Microbiology* **10**, 193-199.
- 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*. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
- Gomez-Gomez, L., Bauer, Z., and Boller, T.** (2001). Both the Extracellular Leucine-Rich Repeat Domain and the Kinase Activity of FLS2 Are Required for Flagellin Binding and Signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **13**, 1155-1163.
- Gramatikoff, K.** (2004). *Frontiers of Biotechnology and Pharmaceuticals*. (Science Press USA Inc).
- Green, J.R., Carver, T.L.W., and Gurr, S.J.** (2002). The formation and function of infection structures. In *The powdery mildews: a comprehensive treatise*, R. Bélanger, A.J. Dik, and W.R. Bushnell, eds (St. Paul, Minnesota, USA: APS Press,), pp. 66-82.
- Greenberg, J.T., and Yao, N.** (2004). The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 201-211.
- Halterman, D., Zhou, F., Wei, F., Wise, R.P., and Schulze-Lefert, P.** (2001). The MLA6 coiled-coil, NBS-LRR protein confers AvrMla6-dependent resistance specificity to *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* in barley and wheat. *The Plant Journal* **25**, 335-348.
- Halterman, D.A., and Wise, R.P.** (2004). A single-amino acid substitution in the sixth leucine-rich repeat of barley MLA6 and MLA13 alleviates dependence on RAR1 for disease resistance signaling. *Plant J* **38**, 215-226.

- Halterman, D.A., Wei, F., and Wise, R.P.** (2003). Powdery Mildew-Induced Mla mRNAs Are Alternatively Spliced and Contain Multiple Upstream Open Reading Frames. *Plant Physiol.* **131**, 558-567.
- Hammond-Kosack, K., and Jones, J.D.G.** (2000). Responses to Plant Pathogens. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, eds (Rockville: American Society of Plant Physiologists), pp. 1113-1156.
- Hanania, U., Furman-Matarasso, N., Ron, M., and Avni, A.** (1999). Isolation of a novel SUMO protein from tomato that suppresses EIX-induced cell death. *The Plant Journal* **19**, 533-541.
- Hay, R.T.** (2005). SUMO: A History of Modification. *Molecular Cell* **18**, 1-12.
- Hein, I., Barciszewska-Pacak, M., Hrubikova, K., Williamson, S., Dinesen, M., Soenderby, I.E., Sundar, S., Jarmolowski, A., Shirasu, K., and Lacomme, C.** (2005). Virus-Induced Gene Silencing-Based Functional Characterization of Genes Associated with Powdery Mildew Resistance in Barley. *Plant Physiol.* **138**, 2155-2164.
- Hohfeld, J., Cyr, D.M., and Patterson, C.** (2001). From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. *EMBO Reports* **2**, 885-890.
- Holt, B.F., III, Belkhadir, Y., and Dangl, J.L.** (2005). Antagonistic Control of Disease Resistance Protein Stability in the Plant Immune System. *Science* **309**, 929-932.
- Holt, I., Ben F., Boyes, D.C., Ellerstrom, M., Siefers, N., Wiig, A., Kauffman, S., Grant, M.R., and Dangl, J.L.** (2002). An Evolutionarily Conserved Mediator of Plant Disease Resistance Gene Function Is Required for Normal Arabidopsis Development. *Developmental Cell* **2**, 807-817.
- Holub, E.B.** (2001). The arms race is ancient history in *Arabidopsis*, the wildflower. *Nature Reviews Genetics* **2**, 516-527.
- Hotson, A., and Mudgett, M.B.** (2004). Cysteine proteases in phytopathogenic bacteria: identification of plant targets and activation of innate immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 384-390.

- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K., and Mudgett, M.B.** (2003). Xanthomonas type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Molecular Microbiology* **50**, 377-389.
- 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 Journal* **22**, 5679–5689.
- Hückelhoven, R.** (2005). Powdery mildew susceptibility and biotrophic infection strategies. *FEMS Microbiology Letters* **245**, 9-17.
- Hwang, C.-F., and Williamson, V.M.** (2003). Leucine-rich repeat-mediated intramolecular interactions in nematode recognition and cell death signaling by the tomato resistance protein Mi. *The Plant Journal* **34**, 585-593.
- Inohara, N., and Nunez, G.** (2003). NODs: Intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nature Reviews Immunology* **3**, 371-382.
- Jarosch, B., Collins, N.C., Zellerhoff, N., and Schaffrath, U.** (2005). RAR1, ROR1, and the Actin Cytoskeleton Contribute to Basal Resistance to Magnaporthe grisea in Barley. *MPMI* **18**, 397-404.
- Jia, Y., McAdams, S.A., Bryan, G.T., Hershey, H.P., and Valent, B.** (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *EMBO J.* **19**, 4004-4014.
- Jin, P., Wood, M.D., Wu, Y., Xie, Z., and Katagiri, F.** (2003). Cleavage of the Pseudomonas syringae Type III Effector AvrRpt2 Requires a Host Factor(s) Common among Eukaryotes and Is Important for AvrRpt2 Localization in the Host Cell. *Plant Physiol.* **133**, 1072-1082.
- 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. *PNAS* **96**, 13583-13588.
- Jones, D.A., and Jones, J.D.G.** (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. In *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, Vol 24, pp. 89-167.

- Jones, D.A., and Takemoto, D.** (2004). Plant innate immunity - direct and indirect recognition of general and specific pathogen-associated molecules. *Current Opinion in Immunology* **16**, 48-62.
- Jorgensen, J.H.** (1996). Effect of three suppressors on the expression of powdery mildew resistance genes in barley. *Genome* **39**, 492-498.
- Jorgensen, J.H., and Wolfe, M.** (1994). Genetics of powdery mildew resistance in barley. *Critical Reviews in Plant Sciences* **13**, 97-119.
- Kajava, A.V.** (1998). Structural diversity of leucine-rich repeat proteins. *Journal of Molecular Biology* **277**, 519-527.
- Kampinga, H.H., Kanon, B., Salomons, F.A., Kabakov, A.E., and Patterson, C.** (2003). Overexpression of the Cochaperone CHIP Enhances Hsp70-Dependent Folding Activity in Mammalian Cells. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 4948-4958.
- Kim, H.-S., Desveaux, D., Singer, A.U., Patel, P., Sondek, J., and Dangl, J.L.** (2005a). The *Pseudomonas syringae* effector AvrRpt2 cleaves its C-terminally acylated target, RIN4, from *Arabidopsis* membranes to block RPM1 activation. *PNAS* **102**, 6496-6501.
- Kim, M.G., da Cunha, L., McFall, A.J., Belkhadir, Y., DebRoy, S., Dangl, J.L., and Mackey, D.** (2005b). Two *Pseudomonas syringae* Type III Effectors Inhibit RIN4-Regulated Basal Defense in *Arabidopsis*. *Cell* **121**, 749-759.
- 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. *Molecular Cell* **4**, 21-33.
- Kobayashi, Y., Yamada, M., Kobayashi, I., and Kunoh, H.** (1997a). Actin microfilaments are required for the expression of nonhost resistance in higher plants. *Plant & Cell Physiology* **38**, 725-733.
- Kobayashi, Y., Kobayashi, I., Funaki, Y., Fujimoto, S., Takemoto, T., and Kunoh, H.** (1997b). Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells. *The Plant Journal* **11**, 525-537.

- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S.** (1999). A Novel Ubiquitination Factor, E4, Is Involved in Multiubiquitin Chain Assembly. *Cell* **96**, 635-644.
- Kolster, P., Munk, L., Stolen, O., and Lohde, J.** (1986). Near-Isogenic Barley Lines with Genes for Resistance to Powdery Mildew. *Crop Science* **26**, 903-907.
- Koncz, C., and Schell, J.** (1986). The Promoter of T-L DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector. *Molecular & General Genetics* **204**, 383-396.
- Kurepa, J., Walker, J.M., Smalle, J., Gosink, M.M., Davis, S.J., Durham, T.L., Sung, D.-Y., and Vierstra, R.D.** (2003). The Small Ubiquitin-like Modifier (SUMO) Protein Modification System in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J. Biol. Chem.* **278**, 6862-6872.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lecourieux, D., Mazars, C., Pauly, N., Ranjeva, R., and Pugin, A.** (2002). Analysis and Effects of Cytosolic Free Calcium Increases in Response to Elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* Cells. *Plant Cell* **14**, 2627-2641.
- Lee, Y.-T., Jacob, J., Michowski, W., Nowotny, M., Kuznicki, J., and Chazin, W.J.** (2004). Human Sgt1 Binds HSP90 through the CHORD-Sgt1 Domain and Not the Tetratricopeptide Repeat Domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 16511-16517.
- Leister, R.T., Dahlbeck, D., Day, B., Li, Y., Chesnokova, O., and Staskawicz, B.J.** (2005). Molecular Genetic Evidence for the Role of SGT1 in the Intramolecular Complementation of Bs2 Protein Activity in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, tpc.104.029637.
- Li, S.-J., and Hochstrasser, M.** (2003). The Ulp1 SUMO isopeptidase: distinct domains required for viability, nuclear envelope localization, and substrate specificity. *J. Cell Biol.* **160**, 1069-1082.
- Lingelbach, L.B., and Kaplan, K.B.** (2004). The Interaction between Sgt1p and Skp1p Is Regulated by HSP90 Chaperones and Is Required for Proper CBF3 Assembly. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8938-8950.

- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2004a). Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* **38**, 800-809.
- Liu, Y., Schiff, M., Marathe, R., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002a). Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant Journal* **30**, 415-429.
- Liu, Y., Schiff, M., Serino, G., Deng, X.-W., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2002b). 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.
- Liu, Y., Burch-Smith, T., Schiff, M., Feng, S., and Dinesh-Kumar, S.P.** (2004b). Molecular Chaperone Hsp90 Associates with Resistance Protein N and Its Signaling Proteins SGT1 and Rar1 to Modulate an Innate Immune Response in Plants. *J. Biol. Chem.* **279**, 2101-2108.
- Loegering, W.Q., and Giss, J.R.** (1957). Independence in the action of three genes conditioning stem rust resistance in Red Egyptian wheat. *Phytopathology* **47**, 740-741.
- Lu, R., Malcuit, I., Moffett, P., Ruiz, M.T., Peart, J., Wu, A.-J., Rathjen, J.P., Bendahmane, A., Day, L., and Baulcombe, D.C.** (2003). High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. *EMBO J.* **22**, 5690-5699.
- Mackey, D., Holt III, 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.
- Marcotte, E.M., Pellegrini, M., Ng, H.-L., Rice, D.W., Yeates, T.O., and Eisenberg, D.** (1999). Detecting Protein Function and Protein-Protein Interactions from Genome Sequences. *Science* **285**, 751-753.

- Mary, W., Crombie, L., and Crombie, L.** (1986). Distribution of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots: Their fungicidal activity towards take-all fungus. *Phytochemistry* **25**, 2069-2073.
- McClellan, A.J., Scott, M.D., and Frydman, J.** (2005). Folding and Quality Control of the VHL Tumor Suppressor Proceed through Distinct Chaperone Pathways. *Cell* **121**, 739-748.
- Meacham, G.C., Patterson, C., Zhang, W., Younger, J.M., and Cyr, D.M.** (2001). The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation **3**, 100-105.
- Meluh, P.B., and Koshland, D.** (1995). Evidence that the MIF2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Encodes a Centromere Protein with Homology to the Mammalian Centromere Protein CENP-C. *Molecular Biology of the Cell* **6**, 793-807.
- Menke, F.L.H., van Pelt, J.A., Pieterse, C.M.J., and Klessig, D.F.** (2004). Silencing of the Mitogen-Activated Protein Kinase MPK6 Compromises Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Meyers, B.C., Kozik, A., Griego, A., Kuang, H., and Michelmore, R.W.** (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-Encoding Genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 809-834.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P., and Zentgraf, U.** (2004). Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **55**, 853-867.
- Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., and Williamson, V.M.** (1998). The Root Knot Nematode Resistance Gene Mi from Tomato Is a Member of the Leucine Zipper, Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat Family of Plant Genes. *Plant Cell* **10**, 1307-1320.
- Moffett, P., Farnham, G., Peart, J., and Baulcombe, D.C.** (2002). Interaction between domains of a plant NBS-LRR protein in disease resistance-related cell death. *EMBO J.* **21**, 4511-4519.
- Mondragon-Palomino, M., Meyers, B.C., Michelmore, R.W., and Gaut, B.S.** (2002). Patterns of Positive Selection in the Complete NBS-LRR Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.* **12**, 1305-1315.

- Murata, S., Minami, Y., Minami, M., Chiba, T., and Tanaka, K.** (2001). CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Reports* **2**, 1133-1138.
- Murtas, G., Reeves, P.H., Fu, Y.-F., Bancroft, I., Dean, C., and Coupland, G.** (2003). A Nuclear Protease Required for Flowering-Time Regulation in Arabidopsis Reduces the Abundance of SMALL UBIQUITIN-RELATED MODIFIER Conjugates. *Plant Cell* **15**, 2308-2319.
- Muskett, P., and Parker, J.** (2003). Role of SGT1 in the regulation of plant R gene signalling. *Microbes and Infection* **5**, 969-976.
- Muskett, P.R., Kahn, K., Austin, M.J., Moisan, L.J., Sadanandom, A., Shirasu, K., Jones, J.D.G., 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 in Plant Science* **9**, 97-104.
- Navarro, L., Zipfel, C., Rowland, O., Keller, I., Robatzek, S., Boller, T., and Jones, J.D.G.** (2004). The transcriptional innate immune response to flg22. interplay and overlap with Avr gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis. *Plant Physiology (Rockville)* **135**, 1113-1128.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt III, B.F., and Dangl, J.L.** (2003). Recognition and response in the plant immune system. *Annual Review of Genetics* **37**, 579-609.
- Nombela, G., Williamson, V.M., and Muñiz, M.** (2003). The Root-Knot Nematode Resistance Gene *Mi-1.2* of Tomato Is Responsible for Resistance Against the Whitefly *Bemisia tabaci*. *MPMI* **16**, 645-649.
- Nomura, K., Melotto, M., and He, S.-Y.** (2005). Suppression of host defense in compatible plant-Pseudomonas syringae interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 361-368.
- Noutoshi, Y., Ito, T., Seki, M., Nakashita, H., Yoshida, S., Marco, Y., Shirasu, K., and Shinozaki, K.** (2005). A single amino acid insertion in the WRKY domain of the Arabidopsis TIR-NBS-LRR-WRKY-type disease resistance protein SLH1

- (sensitive to low humidity 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *The Plant Journal* **0**, ???-???
- Nürnbergger, T., and Lipka, V.** (2005). Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon. *Molecular Plant Pathology* **6**, 335-345.
- Nürnbergger, T., Brunner, F., Kemmerling, B., and Piater, L.** (2004). Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* **198**, 249-266.
- Orth, K.** (2002). Function of the *Yersinia* effector YopJ. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 38-43.
- Pan, Q., Wendel, J., and Fluhr, R.** (2000). Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. *Journal of Molecular Evolution* **50**, 203-213.
- Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E.** (1999). Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *PNAS* **96**, 12923-12928.
- Parker, J.E.** (2003). Plant recognition of microbial patterns. *Trends in Plant Science* **8**, 245-247.
- 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., Schauser, L., Jaggard, D.A.W., Xiao, S., Coleman, M.J., Dow, M., Jones, J.D.G., Shirasu, K., and Baulcombe, D.C.** (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *PNAS* **99**, 10865-10869.
- Peng, H.-M., Morishima, Y., Jenkins, G.J., Dunbar, A.Y., Lau, M., Patterson, C., Pratt, W.B., and Osawa, Y.** (2004). Ubiquitylation of Neuronal Nitric-oxide Synthase by CHIP, a Chaperone-dependent E3 Ligase. *J. Biol. Chem.* **279**, 52970-52977.

- Pratt, W.B., and Toft, D.O.** (2003). Regulation of Signaling Protein Function and Trafficking by the hsp90/hsp70-Based Chaperone Machinery. *Experimental Biology and Medicine* **228**, 111-133.
- Queitsch, C., Sangster, T.A., and Lindquist, S.** (2002). Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**, 618-624.
- Richly, E., Kurth, J., and Leister, D.** (2002). Mode of Amplification and Reorganization of Resistance Genes During Recent *Arabidopsis thaliana* Evolution. *Mol Biol Evol* **19**, 76-84.
- Ridout, C.J., Skamnioti, R., Porrit, O., Jones, J.D.G., and Brown, J.K.M.** (in Vorbereitung). Fungal pathogenicity determinants conferring host recognition.
- Robatzek, S., and Somssich, I.E.** (2002). Targets of AtWRKY6 regulation during plant senescence and pathogen defense. *Genes Dev.* **16**, 1139-1149.
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y., and Mudgett, M.B.** (2004). Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 Effector, a SUMO Protease Translocated into Plant Cells. *MPMI* **17**, 633-643.
- Rodriguez, M.S., Dargemont, C., and Hay, R.T.** (2001). SUMO-1 Conjugation in Vivo Requires Both a Consensus Modification Motif and Nuclear Targeting. *J. Biol. Chem.* **276**, 12654-12659.
- Ron, M., and Avni, A.** (2004). The Receptor for the Fungal Elicitor Ethylene-Inducing Xylanase Is a Member of a Resistance-Like Gene Family in Tomato. *Plant Cell* **16**, 1604-1615.
- Rossi, M., Goggin, F.L., Milligan, S.B., Kaloshian, I., Ullman, D.E., and Williamson, V.M.** (1998). The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *PNAS* **95**, 9750-9754.
- Rusterucci, C., Aviv, D.H., Holt, B.F., III, 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.
- Rutherford, S.L., and Lindquist, S.** (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**, 336-342.

- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular Cloning a Laboratory Manual* (Cold Spring Harbour, NY, USA: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Samuel, G.** (1931). Some experiments on inoculating methods with plant viruses, and on local lesions. *Ann. Appl. Biol.* **18**, 494-507.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *PNAS* **74**, 5463-5467.
- Sangster, T.A., and Queitsch, C.** (2005). The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 86-92.
- Schägger, H., and von Jagow, G.** (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* **199**, 223-231.
- Schägger, H., Cramer, W.A., and Von Jagow, G.** (1994). Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Analytical Biochemistry* **217**, 220-230.
- Scheel, D.** (1998). Resistance response physiology and signal transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 305-310.
- Schmelzer, E.** (2002). Cell polarization, a crucial process in fungal defence. *Trends in Plant Science* **7**, 411-415.
- Schönfeld, M., G., F., and A., J.** (1994). Identifizierung und Lokalisierung der Mehltreueresistenzgene aus der Wildgerste und deren möglicher Einsatz in der Resistenzzüchtung. *Vorträge für Pflanzenzüchtung* **28**, 184-186.
- Schulze-Lefert, P.** (2004a). Plant Immunity: The Origami of Receptor Activation. *Current Biology* **14**, R22-R24.
- Schulze-Lefert, P.** (2004b). Knocking on the heaven's wall: pathogenesis of and resistance to biotrophic fungi at the cell wall. *Current Opinion in Plant Biology* **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 & Molecular Plant Pathology* **56**, 157-167.

- Scofield, S.R., Tobias, C.M., Rathjen, J.P., Chang, J.H., Lavelle, D.T., Michelmore, R.W., and Staskawicz, B.J.** (1996). Molecular Basis of Gene-for-Gene Specificity in Bacterial Speck Disease of Tomato. *Science* **274**, 2063-2065.
- Shao, F., Golstein, C., Ade, J., Stoutemyer, M., Dixon, J.E., and Innes, R.W.** (2003). Cleavage of Arabidopsis PBS1 by a Bacterial Type III Effector. *Science* **301**, 1230-1233.
- 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.** (2004). Functional Analysis of Barley MLA-triggered Disease Resistance to the Powdery Mildew Pathogen. In *MPI für Züchtungsforschung (Köln: Universität zu Köln)*.
- 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., and Schulze-Lefert, P.** (2003). Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. *Trends in Plant Science* **8**, 252-258.
- 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.
- Skamnioti, P., and Ridout, C.J.** (2005). Microbial avirulence determinants: guided missiles or antigenic flak? *Molecular Plant Pathology* **6**, 551-559.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L.R., Cookson, B.T., and Aderem, A.** (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility **4**, 1247-1253.
- Smith, T.J., and Bell, J.E.** (1986). An exponential gradient maker for use with minigel polyacrylamide electrophoresis systems. *Analytical Biochemistry* **152**, 74-77.
- Sun, C., Palmqvist, S., Olsson, H., Boren, M., Ahlandsberg, S., and Jansson, C.** (2003). A Novel WRKY Transcription Factor, SUSIBA2, Participates in Sugar

- Signaling in Barley by Binding to the Sugar-Responsive Elements of the iso1 Promoter. *Plant Cell* **15**, 2076-2092.
- Sutton, P.N., Henry, M.J., and Hall, J.L.** (1999). Glucose, and not sucrose, is transported from wheat to wheat powdery mildew. *Planta* **208**, 426-430.
- Tai, T.H., Dahlbeck, D., Clark, E.T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M.C., Stall, R.E., and Staskawicz, B.J.** (1999). Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *PNAS* **96**, 14153-14158.
- 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*. *PNAS* **100**, 11777-11782.
- Tameling, W.I.L., Elzinga, S.D.J., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L.W., Haring, M.A., and Cornelissen, B.J.C.** (2002). The Tomato R Gene Products I-2 and Mi-1 Are Functional ATP Binding Proteins with ATPase Activity. *Plant Cell* **14**, 2929-2939.
- Tanaka, K., Nishide, J., Okazaki, K., Kato, H., Niwa, O., Nakagawa, T., Matsuda, H., Kawamukai, M., and Murakami, Y.** (1999). Characterization of a Fission Yeast SUMO-1 Homologue, Pmt3p, Required for Multiple Nuclear Events, Including the Control of Telomere Length and Chromosome Segregation. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8660-8672.
- Tang, X., Frederick, R.D., Zhou, J., Halterman, D.A., Jia, Y., and Martin, G.B.** (1996). Initiation of Plant Disease Resistance by Physical Interaction of AvrPto and Pto Kinase. *Science* **274**, 2060-2063.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F.** (2003). Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* **15**, 317-330.
- Terasawa, K., Minami, M., and Minami, Y.** (2005). Constantly Updated Knowledge of Hsp90. *J Biochem (Tokyo)* **137**, 443-447.
- Thordal-Christensen, H.** (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 351-357.

- Tian, D., Traw, M.B., Chen, J.Q., Kreitman, M., and Bergelson, J.** (2003). Fitness costs of R-gene-mediated resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **423**, 74-77.
- Tor, M., Yemm, A., and Holub, E.** (2003). The role of proteolysis in R gene mediated defence in plants. *Molecular Plant Pathology* **4**, 287-296.
- 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., Chao, R.A., Luthin, W.N., Goff, S.A., and Dangl, J.L.** (2002a). Large-Scale Structure -Function Analysis of the *Arabidopsis* RPM1 Disease Resistance Protein. *Plant Cell* **14**, 435-450.
- Tornero, P., Merritt, P., Sadanandom, A., Shirasu, K., Innes, R.W., and Dangl, J.L.** (2002b). 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.
- Torp, J., and Jorgensen, J.H.** (1986). Modification of Barley Powdery Mildew Resistance Gene Ml-a-12 by Induced Mutation. *Canadian Journal of Genetics & Cytology* **28**, 725-731.
- Torres, M.A., Jones, J.D.G., and Dangl, J.L.** (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana* **37**, 1130-1134.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets: Procedure and Some Applications. *PNAS* **76**, 4350-4354.
- Turck, F., Zhou, A., and Somssich, I.E.** (2004). Stimulus-Dependent, Promoter-Specific Binding of Transcription Factor WRKY1 to Its Native Promoter and the Defense-Related Gene PcPR1-1 in Parsley. *Plant Cell* **16**, 2573-2585.
- Ulker, B., and Somssich, I.E.** (2004). WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. *Current Opinion in Plant Biology* **7**, 491-498.
- Underhill, D.M., and Ozinsky, A.** (2002). Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Current Opinion in Immunology* **14**, 103-110.

- Van Der Biezen, E.A., and Jones, J.D.G.** (1998). Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 454-456.
- Van der Hoorn, R.A.L., Roth, R., and De Wit, P.J.G.M.** (2001). Identification of Distinct Specificity Determinants in Resistance Protein Cf-4 Allows Construction of a Cf-9 Mutant That Confers Recognition of Avirulence Protein AVR4. *Plant Cell* **13**, 273-285.
- Van der Hoorn, R.A.L., De Wit, P.J.G.M., and Joosten, M.H.A.J.** (2002). Balancing selection favors guarding resistance proteins. *Trends in Plant Science* **7**, 67-71.
- Warren, R.F., Merritt, P.M., Holub, E., and Innes, R.W.** (1999). Identification of Three Putative Signal Transduction Genes Involved in R Gene-Specified Disease Resistance in Arabidopsis. *Genetics* **152**, 401-412.
- Whalen, M.C.** (2005). Host defence in a developmental context. *Molecular Plant Pathology* **6**, 347-360.
- Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M.** (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1695**, 133-170.
- Wolfe, K.H., Gouy, M., Yang, Y.-W., Sharp, P.M., and Li, W.-H.** (1989). Date of the Monocot--Dicot Divergence Estimated from Chloroplast DNA Sequence Data. *PNAS* **86**, 6201-6205.
- Wu, J., Luo, S., Jiang, H., and Li, H.** (2005). Mammalian CHORD-containing protein 1 is a novel heat shock protein 90-interacting protein. *FEBS Letters* **579**, 421-426.
- Xie, Z., Zhang, Z.-L., Zou, X., Huang, J., Ruas, P., Thompson, D., and Shen, Q.J.** (2005). Annotations and Functional Analyses of the Rice WRKY Gene Superfamily Reveal Positive and Negative Regulators of Abscisic Acid Signaling in Aleurone Cells. *Plant Physiol.* **137**, 176-189.
- Yamamoto, T., Mori, Y., Ishibashi, T., Uchiyama, Y., Sakaguchi, N., Furukawa, T., Hashimoto, J., Kimura, S., and Sakaguchi, K.** (2004). Characterization of Rad6 from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.) and its interaction with Sgt1, a subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **314**, 434-439.

- Yamasaki, K., Kigawa, T., Inoue, M., Tateno, M., Yamasaki, T., Yabuki, T., Aoki, M., Seki, E., Matsuda, T., Tomo, Y., Hayami, N., Terada, T., Shirouzu, M., Tanaka, A., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S.** (2005). Solution Structure of an Arabidopsis WRKY DNA Binding Domain. *Plant Cell* **17**, 944-956.
- Yang, S., and Hua, J.** (2004). A Haplotype-Specific Resistance Gene Regulated by BONZAI1 Mediates Temperature-Dependent Growth Control in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 1060-1071.
- Zeidler, D., Zahringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J.** (2004). Innate immunity in Arabidopsis thaliana: Lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *PNAS* **101**, 15811-15816.
- Zhang, S., and Klessig, D.F.** (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527.
- Zhang, Y., and Wang, L.** (2005). The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. *BMC Evolutionary Biology* **5**, 1.
- Zhang, Y., Goritschnig, S., Dong, X., and Li, X.** (2003). A Gain-of-Function Mutation in a Plant Disease Resistance Gene Leads to Constitutive Activation of Downstream Signal Transduction Pathways in suppressor of npr1-1, constitutive 1. *Plant Cell* **15**, 2636-2646.
- Zhang, Y., Dorey, S., Swiderski, M., and Jones, J.D.G.** (2004). Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 and HSP90. *The Plant Journal* **40**, 213-224.
- Zhang, Z., Henderson, C., Perfect, E., Carver, T.L.W., Thomas, B.J., Skamnioti, R., and Gurr, S.J.** (2005). Of genes and genomes, needles and haystacks: Blumeria graminis and functionality. *Molecular Plant Pathology* **6**, 561-575.
- Zhou, F., Kurth, J., Wei, F., Elliott, C., Vale, G., Yahiaoui, N., Keller, B., Somerville, S., Wise, R., and Schulze-Lefert, P.** (2001). Cell-Autonomous Expression of Barley Mla1 Confers Race-Specific Resistance to the Powdery Mildew Fungus via a Rar1-Independent Signaling Pathway. *Plant Cell* **13**, 337-350.

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.

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

Appendix I: Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rezeptoren für die Pathogenerkennung in Pflanzen (nach Parker, 2003)..	22
Abbildung 2: Struktur der <i>Mla</i> -Konstrukts, das zur Transformation von Gerste verwendet wurde.....	72
Abbildung 3: Infektionsphänotypen der homozygoten transgenen Gerstenlinien von <i>Mla1-HA</i> und <i>Mla6-HA</i> und deren Kreuzungen mit einer <i>rar1-2</i> Mutante.....	73
Abbildung 4: Expression von MLA1-HA und MLA6-HA in verschiedenen Organen der Pflanze und in subzellulären Fraktionen.....	76
Abbildung 5: Die Akkumulation von MLA ist temperatursensitiv und nicht abhängig von RAR1	78
Abbildung 6: Expression von MLA1-HA und MLA6-HA in <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
Abbildung 7: MLA1-HA kann in einem Komplex von ~750kDa nachgewiesen werden	82
Abbildung 8: Eine direkte Interaktion von MLA-HA und den potentiellen Interaktoren HSP90, SGT1 und RAR1 kann nicht nachgewiesen werden.	84
Abbildung 9: Die CC-Region von MLA1 interagiert spezifisch mit dem C-Terminus von HvWRKY2 <i>in vitro</i>	86
Abbildung 10: MLA1-HA- und MLA6-HA-Menge werden durch das Proteasome kontrolliert.....	91
Abbildung 11: MLA1-HA und MLA6-HA können <i>in vitro</i> sumoyliert werden.....	93
Abbildung 12: Die mögliche Rolle von RAR1, SGT1 und HSP90 in der Stabilisierung und Aktivierung von MLA	114
Abbildung 13: Ein generelles Modell der basalen und MLA-vermittelten rassenspezifischen Resistenz in Gerste gegen Gerstenmehltau	115

Appendix II: Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Gerstenkultivare und Mutanten	33
Tabelle 2: Benutzte Ökotypen und Mutanten von <i>A. thaliana</i>	33
Tabelle 3: Gerstenmehltauisolate, ihre Avirulenz- und Virulenzgene.....	34
Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme von <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	34
Tabelle 5: Verwendete Vektoren	35
Tabelle 6: Benutzte Oligonukleotide	37
Tabelle 7: Verwendete Enzyme	38
Tabelle 8: Verwendete Antibiotika	38
Tabelle 9: Verwendete Chemikalien.....	41
Tabelle 10: Primäre Antikörper	43
Tabelle 11: Sekundäre Antikörper	43
Tabelle 12: Anzuchtbedingungen der verwendeten Pflanzen.....	46
Tabelle 13: PCR-Reaktionsmix	48
Tabelle 14: Temperaturprofil der PCR-Reaktion	48
Tabelle 15: Konstrukte für die Expression im Weizenkeimextrakt.....	89
Tabelle 16: Konstrukte für die Expression als GST-Fusionsprotein in <i>E. coli</i>	89

Appendix III: Erklärung

„Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig 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, im Oktober 2005

Stefan Mauch

Teilpublikation dieser Arbeit:

Bieri, S., Mauch, S., Shen, Q.-H., Peart, J., Devoto, A., Casais, C., Ceron, F., Schulze, S., Steinbiss, H.-H., Shirasu, K. und 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.

Appendix IV: Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Stefan Mauch
Anschrift	Peter-von-Fliesteden-Straße 6 50933 Köln
Telefon	0221 5060141
Geburtsdatum und -ort	25. Juli 1975 in Rottweil
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Familienstand	Ledig

Studium

seit 08/2002	Promotion in Genetik am Max-Planck-Institut für Züchtungs- forschung, Köln, Abteilung Molekulare Phytopathologie unter der Leitung von Prof. Dr. P. Schulze-Lefert Thema der Doktorarbeit: „Die molekularen Mechanismen der MLA-vermittelten Resistenz“ Stipendium der IMPRS (<i>International Max-Planck-Research School</i>) „Molekularen Grundlagen der Entwicklung von Pflanzen und ihre Wechselbeziehungen zur Umwelt“
04/2002	Studienabschluss als Diplom-Biologe, Abschlussnote 1,6
10/1996 – 04/2002	Biologiestudium an der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i.Br.

mit Hauptfach Biochemie der Pflanzen und Nebenfächern
Pflanzenphysiologie, Paläobotanik und Ethnologie

Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. W Haehnel

Thema der Diplom-Arbeit: „Untersuchung der funktionellen
Differenzierung von Chloroplasten aus *Zea mays* unter Einsatz von
Proteomicsmethoden“

Zivildienst

07/1995 - 07/1996 Zivildienst im Feriendorf Eckenhof, Schramberg-Sulgen

Schulbildung

06/1995 Abitur am Albertus-Magnus-Gymnasium Rottweil

9/1986 – 06/1995 Albertus-Magnus-Gymnasium Rottweil

09/1982-07/1986 Grundschule Dietingen

Appendix V: Danksagung

Diese Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Paul Schulze-Lefert angefertigt. Ich möchte mich bei Paul für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Gruppe, für die Motivation durch Begeisterung und für die gute Mischung aus Fordern und Fördern bedanken. Danke Paul, ich habe sowohl in wissenschaftlicher als auch in menschlicher Hinsicht viel gelernt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. M. Hülskamp für die Übernahme des Koreferats sowie Herrn Prof. Dr. R. Krämer für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Stéphane Bieri danke ich für seine Hilfe besonders zu Beginn des Projekts, für die transgenen Gerstenlinien, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben, für gute Ratschläge und ein sehr angenehmes Arbeitsklima.

Many thanks to the rest of the *Mla* team, Qian-Hua Shen, Simone Pajonk and Francesca Ceron, for the nice and friendly atmosphere, for good and critical advice and help when ever required. And of course for the new member, Yusuke Saijo, who helped me to believe my results.

Thanks to all other members of the Pangstruga lab, for all the fun and your support during all this years.

Und natürlich noch speziellen Dank an Anja Reinstädler, die immer alles kann, weiß und hat, besonders Antibiotika und Agarplatten!

Thanks to the people from the Jane Parker group for a lot of fun and especially Shige for loads of antibody. Und natürlich auch ein Dankeschön an Tina und die „Romeisens“ für gute Tipps und nette Gespräche.

Thanks to Ken Shirasu and the people in his lab for antibodies against HSP90, SGT1 and RAR1.

Thanks to Ralf Petri and my friends from the IMPRS. You gave me quite some opportunity to understand different cultures. And you made me enjoy this program a lot.

Danke an meine Freunde, die mich ertragen und es stets geschafft haben, mich erfolgreich von meinem Stress abzulenken.

Ich danke meiner Familie, meinen Eltern, Hermann und Elisabeth, und meinen Schwestern, Karin und Lucia, die mich bedingungslos unterstützt und ein Zuhause gegeben haben.

Besonders danke ich Claudia, die mich immer wieder aufgebaut und zu mir gestanden hat, und die viele anstrengende Tage und Wochen mit mir ausgehalten hat.