

- **Abstract**

Salicylic acid (SA) constitutes an essential part of endogenous resistance signaling in plants enabling them to fight against various biotrophic and hemi-biotrophic pathogens. In addition to pathogen resistance, SA is involved in a number of different physiological processes such as flowering, nodule formation and thermogenesis. Intensive research over the last 25 years has helped us considerably to understand the synthesis, regulation and modulation of SA signaling. However, there are still a number of open questions that need to be addressed. To this end, traditional genetic methods have fallen short due to their inability to overcome gene redundancy, lethality and pleiotropy. Due to these shortfalls, many of the molecular components involved in mediating SA signaling remain unknown. By employing a chemical genetics approach, I aimed at solving these challenges by identifying unknown component/s involved in SA signaling. Since, chemical genetics has been shown to overcome limitations of classical genetics it thus, promised to be a useful approach.

To achieve my aims, I screened about 1500 chemical compounds in a bidirectional manner on SA responsive *PR1p::GUS Arabidopsis thaliana* seedlings to identify chemicals which can act as inhibitors of SA-induced *PR1* expression or which alone can induce *PR1* gene expression. To have a confident hit selection, I developed a facile, high-throughput forward chemical genetic screening method by *in situ* monitoring of glucuronidase (GUS)-based reporter gene expression in *Arabidopsis thaliana*. In this method, I quantified GUS activity in intact seedlings which for chemical screening purposes is a much better alternative than the traditional labor-intensive *in vitro* quantitative GUS assay or the less robust qualitative histochemical GUS staining method. Advantageously, the quantitative data obtained from the *in situ* GUS assay, allowed the use of statistical tools to identify weak and strong chemical hits. Rigorous and stringent screening conditions led to the identification of three strong and selective activators of SA signaling and one inhibitor.

Gliclazide, the identified SA-inhibitor, is a sulfonylurea drug widely used for diabetes in humans. In *Arabidopsis*, it acted in a dose response manner and remained the most active structural analogs of sulfonylurea drugs that inhibited SA-signaling.

The activators included a rhizobacterial cyclic lipopeptide; colistin sulfate and two synthetic protein kinase inhibitors neratinib and SP600125. They upregulated, endogenous SA levels and acted in a dose-responsive manner. In particular, colistin sulfate not only activated SA signaling, but also inhibited jasmonic acid (JA) pathway in a SA-independent manner, indicating it might target SA-JA crosstalk components. Besides this, it increased lateral root density at nanomolar concentration and increased plant fitness.

Kinase inhibitor, SP600125, is known to inhibit cell-division kinases in humans and thus might identify similar kinases in plants regulating SA signaling whereas neratinib, a covalent inhibitor of receptor like tyrosine kinases can identify proteins that require tyrosine phosphorylation to activate SA regulated pathways. All three activators mediated their activity independent of SA regulators EDS1, PAD4 and SAG101 and SA-transducer NPR1, but were completely dependent on SA biosynthesis enzyme, ICS1. Of interest, no activator interfered with early defense responses like ROS or MAPK activation, indicating that these processes have no role in the effects mediated by the compounds.

Finally, having narrowed down to the site of actions, ongoing biochemical approaches will now help in protein target identification of identified chemicals which will serve as effective bioactive tools to further dissect SA signaling.

• Zusammenfassung

Salicylsäure (SA) ist ein essentieller Bestandteil der endogenen pflanzlichen Immunabwehr gegen biotrophe und hemi-biotrophe Pathogene. Zudem ist SA beteiligt an der Regulation physiologischer Prozesse wie Bildung und Wachstum von Blüten und Wurzeln sowie der Thermogenese. Intensive Forschung der letzten 25 Jahre hat das Verständnis von SA-Synthese, sowie der Regulation und Modulation der SA-Signalübertragung deutlich voran gebracht. Trotzdem sind wegen der Einschränkungen traditioneller genetischer Methoden durch Genredundanz, Pleiotropie und Lethalität von Mutationen, noch immer viele Komponenten der SA-Signalübertragung unbekannt.

In meiner Arbeit nutzte ich die Methode der chemischen Genetik, die bereits erfolgreich eingesetzt wurde, um die Grenzen der klassischen Genetik zu überwinden. Zur Identifikation unbekannter Komponenten der SA-Signalübertragung testete ich in einem bidirektionalen Ansatz die Wirkung von etwa 1500 chemischen Verbindungen auf die Expression des SA-responsiven Markergens *PR1p::GUS* in *Arabidopsis thaliana* Keimlingen. Die Verbindungen wurde sowohl auf Aktivatoren der *PR1p::GUS* Expression, als auch Inhibitoren der SA-induzierten Expression des Markergens durchmustert.

Zunächst entwickelte ich ein Hochdurchsatzverfahren zur Quantifizierung der Glucuronidase (GUS)-Aktivität in intakten *Arabidopsis* Keimlingen. Die Vorteile dieses neuen Verfahrens liegen in der Einfachheit und Schnelligkeit mit der die Aktivitätsbestimmungen in situ durchgeführt werden können, im Gegensatz zur zeitaufwendigen und arbeitsintensiven quantitativen GUS-Aktivitätsbestimmung in vitro. Da gleichzeitig numerische Werte von hoher Genauigkeit erhalten werden, verglichen mit qualitativen histochemischen GUS-Färbungen, eignete sich dieses Hochdurchsatzverfahren besonders für Screeningverfahren. Die erhobenen quantitativen Daten konnten statistischen Tests unterzogen werden, was eine vorurteilsfreie Identifikation von bioaktiven Verbindungen erlaubte, sowie die Unterscheidung von schwachen und starken Aktivitäten. Durch die Anwendung präziser und stringenter Auswahlkriterien konnten drei selektive Aktivatoren, sowie ein selektiver Inhibitor der SA-Signaltransduktion identifiziert werden.

Gliclazide, der identifizierte SA-Inhibitor, ist ein Sulfonylharnstoff-Derivat, das im Menschen als Medikament zur Behandlung von Diabetes angewendet wird. In *Arabidopsis* wirkte es dosisabhängig und stellte den effektivsten Inhibitor der SA-aktivierten PR1-Expression von allen getesteten Sulfonylharnstoffderivaten dar.

Unter den identifizierten SA-Aktivatoren befanden sich Colistinsulfat, ein zyklisches Lipopeptid und die beiden synthetischen Inhibitoren von Proteinkinasen, Neratinib und SP600125. Alle Verbindungen wirkten dosisabhängig und erhöhten den endogenen SA-Gehalt in *Arabidopsis*.

Colistinulfat inhibierte darüber hinaus auch den Jasmonsäure (JA)-stimulierten Signalweg, was auf eine (direkte oder indirekte) Wirkung auf gemeinsame Komponenten der SA- und JA-Signaltransduktion hindeuten könnte. Außerdem erhöhte Colistinulfat in nanomolekularen Konzentrationen die Seitenwurzelbildung in Arabidopsis und wirkte positiv auf das Pflanzenwachstum. Der Inhibitor SP600125 hemmt in tierischen Systemen Proteinkinasen, die in der Zellteilung eine Rolle spielen, und könnte dementsprechend auch in Pflanzen auf ähnliche Proteinkinasen wirken. Neratinib ist ein kovalenter Inhibitor von rezeptorähnlichen Tyrosinkinasen und kann somit zur Identifikation von Proteinen führen, die an der Aktivierung der SA-abhängigen Signaltransduktion beteiligt sind und an Tyrosinresten phosphoryliert werden.

Durch Untersuchung von Mutanten konnte gezeigt werden, dass alle drei Aktivatoren unabhängig von den SA-Regulatoren EDS1, PAD4 und SAG101 sowie dem SA-Signalvermittler NPR1 wirkten, aber vollständig von intakter SA-Biosynthese (d.h. dem Enzym ICS1) abhängig waren. Darüber hinaus hat keine dieser Verbindungen die Aktivierung schneller Abwehrreaktionen bewirkt, wie z.B. die Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) oder die Aktivierung von MAP-Kinasen, was auf eine Wirkung unabhängig von diesen Reaktionen hindeutet.

Nach der Eingrenzung der möglichen Wirkmechanismen der Chemikalien wird derzeit versucht, die Zielproteine durch biochemische Methoden zu identifizieren. Die neuartigen Aktivatoren können so als effiziente, bioaktive Werkzeuge zur weiteren Aufklärung der SA-Signaltransduktionkette dienen.