

## ABSTRACT

The success of plant defense responses as effective immunity is determined by the robust signaling network that ensures pathogen-specific and appropriate temporal transcriptional reprogramming. The question arises, how robustness of plant immune systems is achieved. High-throughput gene expression profiling has been used to decipher molecular mechanisms of biological processes, thus representing an excellent tool to define molecular footprints of plant immune systems. Indeed, time-series expression profile analyses in *Arabidopsis* wild-type and phytohormone-deficient mutants during basal immunity, triggered upon infection with virulent *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000, and effector-triggered immunity (ETI), induced upon infection with avirulent *Pto* DC3000 (*AvrRpt2*) and *Pto* DC3000 (*AvrRpm1*) strains, revealed expression profile differences at 4-9 hpi that could be crucial for the establishment of effective immunity.

The phytohormone salicylic acid (SA) and the MAP kinases (MAPKs) MPK3 and MPK6 are key signaling components in basal immunity and ETI. Kinetic difference in MPK3/MPK6 activation in basal immunity and ETI has been identified to contribute to network robustness. While sustained MAPK activation in ETI could compensate the function of SA in gene regulation, transient activation in basal immunity could not. Investigating the underlying molecular mechanisms for SA compensation by sustained MAPK activation during ETI was one focus of this study. Hereby, it was hypothesized that temporal regulation of transcription factor(s) modulates transcriptional outputs upon transient compared to sustained activation of MPK3 and MPK6. Previously published large-scale proteomic studies have identified numerous MPK3/MPK6 phosphorylated transcription factors and transcriptional coregulators. WRKY40 is common to all studies. I identified that expression of *WRKY40* and its functional homolog *WRKY18* was strongly induced upon prolonged activation of MPK3 and MPK6. Genetic analysis indicate that WRKY18 and WRKY40 function downstream of MPK3 in compensation of SA signaling in *AvrRpt2*-ETI. Bimolecular fluorescence analysis revealed that MPK3 directly interacts with WRKY18 and WRKY40. Furthermore, transcriptional induction of *WRKY40* and potential WRKY40-target genes correlated with MPK3/MPK6 activation in *AvrRpt2*-ETI, suggesting that interaction with MPK3/MPK6 controlled WRKY18 and WRKY40 transcription factor activities. Compensation of SA signaling by prolonged activation of MPK3/MPK6 and transcriptional regulation through WRKY18 and WRKY40 can keep the ETI network from breakdown.

Bimolecular fluorescence analysis from this study revealed that interaction with WRKY transcription factors occurs at the C-terminus of MPK3 and MPK6. This is the first report that describes where interaction with transcription factors occurs in plant MAPKs. Amino acid sequence alignments of plant MAPKs showed that this 37 amino acid C-terminal sequence is highly conserved among immunity-related Clade A and B MAPKs, suggesting that the putative WRKY-binding motif in the

C-terminus might be conserved. The accessibility of the C-terminus for interaction with WRKY transcription factors might control activation of gene regulation by MAPK-WRKY complexes.

Data from this thesis validated network robustness in ETI and extend current knowledge about how MAPK-mediated signaling and gene regulation contributes to it.

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Erfolg pflanzlicher Immunabwehrantworten ist bestimmt durch die Beständigkeit des Signalnetzwerks, welches pathogen-spezifische und zeitlich abgestimmte transkriptionelle Regulationen ermöglicht. Die Frage stellt sich, wie diese Robustheit in pflanzlichen Immunsystemen erreicht wird. Molekulare Hochdurchsatzverfahren zur Erlangung von Genexpressionsprofilen konnten bereits zur Identifizierung molekularer Mechanismen von biologischen Prozessen genutzt werden und stellt damit ein geeignetes Werkzeug zur Identifizierung molekularer Charakteristika von pflanzlichen Immunsystemen dar. Die in dieser Arbeit erstellten zeitlichen Expressionsprofilanalysen in basaler Immunität, induziert nach Infektion mit einem virulenten *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pto*) DC3000 Pathogen, und Effektor-induzierter Immunität (ETI), angestellt nach Infektion mit avirulenten *Pto* DC3000 (*AvrRpt2*) oder *Pto* DC3000 (*AvrRpm1*) Bakterienstämmen, in Wildtyp und Pflanzenhormon-defizienten Mutanten von *Arabidopsis* wiesen Unterschiede in den Expressionsprofilen 4-9 Stunden nach Infektion auf. Diese Unterschiede könnten wichtig sein für die Etablierung eines effektiven Immunsystems.

Das pflanzliche Hormon Salicylsäure (SA) und die MAP-Kinasen (MAPKs) MPK3 und MPK6 sind wichtige Komponenten des Signalnetzwerkes in basaler Immunität und ETI. Kinetische Unterschiede bei der Aktivierung von MPK/MPK6 in basaler Immunität und ETI tragen zur Robustheit des Netzwerks bei. Während eine anhaltende Aktivierung der MAPK die Funktion von SA für Genregulation ersetzen konnte, war dies nicht der Fall wenn MAPKs kurzzeitig aktiviert wurden. Ein Schwerpunkt meiner Arbeit lag in der Entschlüsselung der molekularen Mechanismen, welche die Kompensation von SA durch anhaltend aktivierte MAPKs in ETI erklären könnten. Ich habe angenommen, dass unterschiedlichen Transkriptionsprofile zwischen kurzzeitig aktivierten und anhaltend aktivierten MPK3 und MPK6 von der temporären Expression von Transkriptionsfaktoren bestimmt werden. Frühere Studien identifizierten viele Transkriptionsfaktoren und Transkriptionscofaktoren die von MPK3 und MPK6 phosphoryliert werden. WRKY40 wurde dabei in allen Studien entdeckt. In meiner Arbeit habe ich herausgefunden, dass die Expression von *WRKY40* und seinem funktionsgleichen Partner *WRKY18* stark induziert ist nach einer anhaltenden Aktivierung von MPK3 und MPK6. Genetische Untersuchungen weisen eine Rolle für *WRKY18* und *WRKY40* für die durch MPK3 ausgeführte Kompensation von SA Signalweiterleitung in *AvrRpt2*-ETI auf. Bimolekulare Fluoreszenzanalysen haben bestätigt das MPK3 direkt mit *WRKY18* und *WRKY40* interagiert. Desweiteren fand die Expression von *WRK40* und möglichen *WRKY40*-kontrollierten Genen zeitgleich mit MPK3 und MPK6 Aktivierung in *AvrRpt2*-ETI statt, was darauf hindeutet, dass MPK3/MPK6 *WRKY18* und *WRKY40* Transkriptionsfaktoraktivität durch direkte Interaktion kontrollieren. Kompensation von SA Signalweiterleitung durch anhaltend aktivierte MPK3/MPK6 und transkriptionelle Regulation durch *WRKY18* und *WRKY40* könnte das ETI Netzwerk vor einem möglichen Zusammenbruch bewahren. Bimolekulare Fluoreszenzanalysen in dieser Arbeit haben

gezeigt, dass die Interaktionen mit WRKY Transkriptionsfaktoren am C-terminus von MPK3 und MPK6 stattfinden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden wo die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren in pflanzlichen MAPKs stattfindet. Vergleiche von Aminosäuresequenzen mit anderen pflanzlichen MAPKs zeigten, dass die 37 Aminosäuren des C-terminus evolutionär konserviert sind zwischen immunität-involvierten MAPKs der Gruppen A und B. Dies deutet darauf hin, dass ein mögliches Bindungsmotiv von WRKYs an den C-terminus konserviert sein könnte. Die Zugänglichkeit des C-terminus für die Interaktion mit WRKY Transkriptionsfaktoren könnte eine Kontrolle der Genregulation durch den MAPK-WRKY-Komplex sein. Daten meiner Arbeit konnten die Beständigkeit des Signalnetzwerks in ETI bestätigen und erweitern das Wissen über den Einfluss von Signalweiterleitung und Genregulation durch MAPKs zur Robustheit des Netzwerks.