

A Einleitung

1 Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz

Pflanzen sind aufgrund ihrer sessilen Lebensweise unterschiedlichen abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt. Neben dem Schutz vor lebensfeindlichen klimatischen Einflüssen, wie UV-Strahlung, Trocken- oder Temperaturstress müssen sich Pflanzen ebenso vor einer Vielzahl phytopathogener Organismen, wie Pilzen, Bakterien und Viren schützen.

Durch das komplexe Zusammenwirken verschiedener Abwehrmechanismen stellt die Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen in ihrer natürlichen Umgebung jedoch eher die Ausnahme dar. Ein Grund hierfür wird in den zu den passiven Abwehrmechanismen gehörenden strukturellen und chemischen Barrieren in der pflanzlichen Zellperipherie gesehen (Kombrink & Somssich, 1995). Strukturelle Modifikationen, wie die Lignifizierung der Zellwand oder die Einlagerung von Cutin und Suberin in die Kutikula bzw. chemische Modifikationen, wie die Zellwandeinlagerung antimikrobiell wirksamer Substanzen (z. B. phenolischer Verbindungen) bilden so eine erste Ebene der Pathogenabwehr (Osbourn, 1996). Desweiteren stellt die präformierte Akkumulation von biologisch inaktiven Vorstufen antibiotischer Substanzen, wie zyanogenen Glykosiden eine weitere Form der passiven Abwehr dar.

Gelingt es dem Pathogen, diese erste Ebene der Abwehr zu durchbrechen, kann die Aktivierung weiterer Abwehrreaktionen eine folgende Parasitierung durch das Pathogen verhindern. Voraussetzung für die Aktivierung von Abwehrmechanismen ist jedoch eine durch die Pflanze erfolgte Erkennung des eindringenden Pathogens als „Nicht-selbst“. Diese Fähigkeit bildet die Grundlage der angeborenen Immunität (*innate immunity*), einem gleichermaßen in pflanzlichen als auch in tierischen Organismen zu findenden Prozess, welcher gegen mikrobielle Infektionen gerichtet ist (Medzhitov & Janeway, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004). Ein Teil der nach Erkennung eines potentiellen Pathogens induzierten Abwehr stellt die transkriptionelle Aktivierung von Abwehr-assoziierten Genen, wie z. B. den *PR*-Genen (*pathogenesis related*; Kombrink & Somssich, 1995; Scheel, 1998; Eulgem, 2005) dar. Neben der Expression eines sogenannten „Abwehr-Transkriptoms“ spielen aber auch posttranslationale Modifikationen von Proteinen, z. B. der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs) eine Rolle in der induzierten Pathogenabwehr (Scheel, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Jonak *et al.*, 2002). Grundsätzlich unterscheidet man in der pflanzlichen Pathogenresistenz zwei Typen. Die in der Natur vorherrschende Resistenzform ist die Nichtwirtsresistenz, welche auch als Basisinkompatibilität oder Basisresistenz bezeichnet wird (Heath, 2000; Abb. A-1; siehe 1.7, A Einleitung).

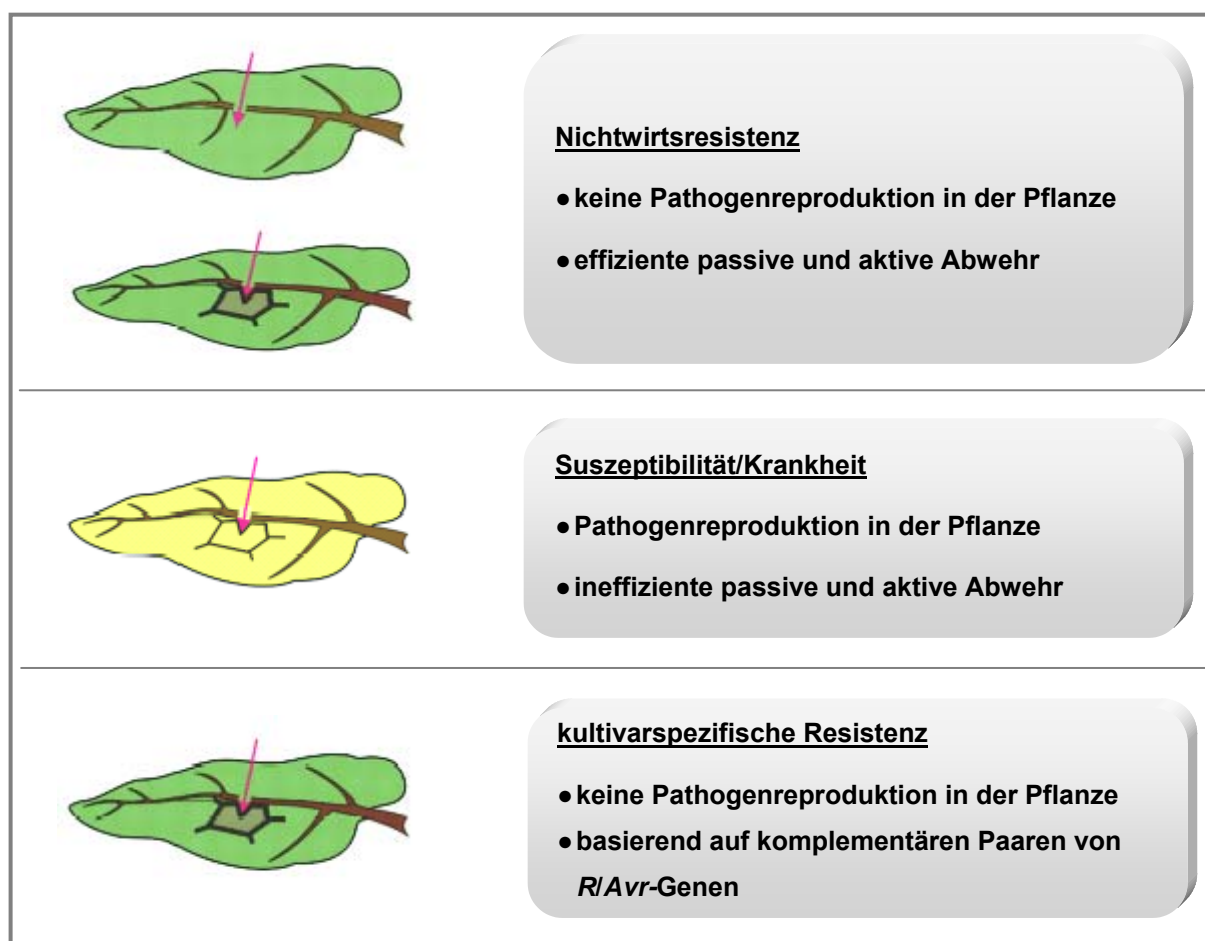


Abb. A-1: Konzepte pflanzlicher Pathogenresistenz (nach Nürnberger *et al.*, 2004).

Einigen Pathogenen ist es im Verlauf der Evolution gelungen, die Basisresistenz bestimmter Pflanzen zu überwinden bzw. zu unterdrücken, was zu einer Besiedlung der anfälligen Wirtspflanzen durch den phytopathogenen Organismus führt.

Diese, vergleichsweise selten, auftretende Wechselwirkung zwischen dem virulenten Pathogen und der suszeptiblen Wirtspflanze wird als kompatible Pflanze-Pathogen-Interaktion bezeichnet (Abb. A-1). Der auf den Wirtspflanzen lastende Selektionsdruck führte jedoch zu resistenten Kultivaren innerhalb der suszeptiblen Pflanzenspezies. Diese Form der Resistenz ist jedoch nur gegen eine oder wenige Pathogenrassen gerichtet und wird daher als rassen- oder kultivarspezifische Wirtsresistenz bezeichnet (Prell *et al.*, 1996; Cohn *et al.*, 2001; Dangl & Jones, 2001; Nürnberger *et al.*, 2004; Abb. A-1). Ein genetisches Modell der Resistenzprägung in einer solchen inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktion wird durch die von Flor (1971) aufgestellte „Gen-für-Gen-Hypothese“ beschrieben. Danach ist die Inkompatibilität durch die Interaktion von komplementären Paaren der Avirulenzgene (*AVR*) der eindringenden Pathogene und der dominanten Resistenzgene (*R*) der Pflanzen determiniert, welche schließlich zur Ausprägung der *R*-Gen-vermittelten Resistenz führt. Es wird angenommen, dass AVR-Proteine primär als Virulenzfaktoren die Kolonisierung suszeptibler Wirtspflanzen ermöglichten und einen

selektiven Vorteil für das Pathogen darstellten. Im Verlauf der Koevolution von Wirtspflanze und virulentem Pathogen erfolgte jedoch eine Erkennung der AVR-Proteine oder deren Funktion durch die *R*-Genprodukte, was zur Ausprägung der kultivarspezifischen Resistenz führte (Collmer, 1998; Galan & Collmer, 1999; Staskawicz *et al.*, 2001). Als sogenannte spezifische Elicitoren sind AVR-Proteine daher in der Lage, R-Protein-vermittelte Abwehrreaktionen in resistenten Kultivaren der Wirtspflanzen auszulösen. In Wirtspflanzen, denen die korrespondierenden R-Proteine fehlen, d. h. in Abwesenheit einer spezifischen Erkennung des Pathogens, kann die sogenannte basale Abwehr, welche weniger effizient als die *R*-Gen-vermittelte Abwehr ist, die Besiedlung der Wirtspflanze zumindestens limitieren aber nicht verhindern (Glazebrook *et al.*, 1997b).

1.1 Pathogenperzeption

Als Auslöser basaler Abwehrreaktionen sind die als sogenannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns*; PAMPs) oder als generelle Elicitoren bezeichneten Signalmoleküle, wie z. B. (Glyko)proteine, Glykolipide, Peptide oder Lipopolysaccharide (LPS) beschrieben worden (Boller, 1995; Ebel & Scheel, 1997; Ebel & Mithöfer, 1998; Nürnberger, 1999; Dow, 2000; Heath, 2000). PAMPs sind typischerweise charakteristisch für eine ganze Klasse mikrobieller Pathogene, wie z. B. die pilzlichen Zellwandbestandteile Chitin und Ergosterol oder das bakterielle Flagellin (Granado *et al.*, 1995; Felix *et al.*, 1993). Ein weiteres Merkmal von PAMPs ist ihre stark konservierte Struktur, welche jedoch nicht in potentiellen Wirtsorganismen vorkommt. Außerdem sind PAMPs für bestimmte Lebensfunktionen notwendig und sind daher für das Pathogen von essentieller Bedeutung. Pflanzen sind also in der Lage, mikrobielle Strukturen als „Nicht-selbst“ zu erkennen und in Folge dessen Abwehrreaktionen auszulösen. Wie eingangs erwähnt, zeigt dieser Prozess der Erkennung von „Nicht-selbst“ starke Parallelen mit den Mechanismen der angeborenen Immunität in tierischen Systemen und deutet so auf einen hohen Grad der Konservierung pflanzlicher und tierischer Pathogenerkennungsmechanismen (Medzhitov & Janeway, 2000; Aderem & Ulevitch, 2000; Khush & Lemaitre, 2000; Imler & Hoffmann, 2001; Underhill & Ozinsky, 2002). Die differenzierte Erkennung von Pathogenmustern durch entsprechende Rezeptoren liefern aber auch Hinweise für eine konvergente Evolution der Pathogenperzeptionsysteme innerhalb eukaryontischer Organismen (Zipfel & Felix, 2005).

Aufgrund der für großen strukturellen Diversität der PAMPs wird angenommen, dass unterschiedliche strukturelle Motive durch entsprechende Rezeptoren erkannt werden und Abwehrreaktionen auslösen können. Dabei scheint die Fähigkeit der Wahrnehmung komplexer statt einzelner Pathogenstrukturen die Effizienz der Pathogenabwehr entscheidend zu beeinflussen (Boller, 1995; Ebel & Scheel, 1997; Nürnberger & Brunner, 2002).

Die Bindung des Elicitors an den Rezeptor stellt den ersten Schritt in der vom Pathogen ausgelösten Signaltransduktionskaskade dar (Yang *et al.*, 1997; Grant & Mansfield, 1999). Die

dabei induzierten pflanzlichen Abwehrreaktionen (1.3) sind grundsätzlich relativ ähnlich und unabhängig von der Art des auslösenden Pathogens (Yang *et al.*, 1997; Nürnberger & Scheel, 2001; Xiao *et al.*, 2001). Studien der Elicitor-Rezeptor-Bindung in verschiedenen Pflanze-Pathogen-Interaktionen deuten darauf hin, dass die Bindeproteine genereller Elicitoren als Teil von Multikomponentenkomplexen in der Zelle vorliegen (Mithöfer *et al.*, 2000; Cosio *et al.*, 1992).

Ein detailliert untersuchtes Beispiel der Signalperzeption von PAMPs stellt das aus 22 Aminosäuren bestehende Fragment des bakteriellen Flagellins (flg22) dar. Als Hauptbestandteil der bakteriellen Flagelle bildet Flagellin eine charakteristische Oberflächenstruktur gram-negativer phytopathogener Bakterien und erfüllt daher ein Merkmal der PAMPs. In Untersuchungen von Felix *et al.* (1999) wurde gezeigt, dass flg22 in Tomate und *Arabidopsis* Abwehrreaktionen auslösen kann. Neuere Studien belegen, dass flg22-Perzeption in *Arabidopsis* auch Resistenz gegen bakterielle Pathogene induziert (Zipfel *et al.*, 2004). Mutantanalysen in *Arabidopsis* führten über die Isolierung Flagellin-insensitiver Mutanten zur Identifizierung der Rezeptorkinase FLS2 (Flagellin-sensing2). Weiterführende Studien belegten, dass entweder direkt oder indirekt eine Erkennung von flg22 durch FLS2 stattfindet (Gomez-Gomez & Boller, 2000; Bauer *et al.*, 2001). Durch Sequenzanalysen wurde einerseits gezeigt, dass FLS2 extrazelluläre leucinreiche Sequenzwiederholungen (leucin-rich-repeats, LRR) sowie eine intrazelluläre Serin/Threonin-Proteinkinase-Domäne besitzt, andererseits wurde eine hohe Homologie des N-Terminus zum Toll-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* bzw. zu den menschlichen TLR-Rezeptoren (Toll-like-receptors) gefunden (Gomez-Gomez & Boller, 2000). Die sehr ähnliche extrazelluläre Struktur des menschlichen TLR5-Rezeptors, welcher bakterielles Flagellin erkennt und des FLS2-Rezeptors stellt ein weiteres Beispiel dar, das die bereits erwähnte evolutionäre Konservierung pflanzlicher als auch tierischer Pathogenerkennung belegt (Hayashi *et al.*, 2001).

Weitere Beispiele der Erkennung charakteristischer Pathogenmuster durch pflanzliche Perzeptionssysteme und deren Funktion als generelle Elicitoren von Abwehrreaktionen stellen das 13 Aminosäuren umfassende Peptidfragment einer Zellwandtransglutaminase aus *Phytophthora sojae* (Pep-13) und die zentrale Region eines RNA-Bindeproteins (RNP-1) gram-positiver Bakterien (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Felix & Boller, 2003) dar. Während Pep-13 Abwehrreaktionen in Petersilie und Kartoffel eliciert, ist RNP-1 in der Lage, die Abwehr in Tabak zu induzieren (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004; Felix & Boller, 2003). In beiden PAMPs stellt die für die Abwehr-induzierende Funktion notwendige sowie ausreichende Region eine hochkonservierte Sequenz dar, welche gleichzeitig unverzichtbar für die jeweils essentielle physiologische Funktion ist.

1.2 R-Gen-spezifische Wirtsresistenz

In der bereits erwähnten, auf der Interaktion von komplementären *R/Avr*-Genprodukten basierenden, kultivarspezifischen Wirtsresistenz führte die Untersuchung zahlreicher

Pathosysteme zu einem besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der R-Gen-spezifischen Resistenz. Eine Klassifizierung der R-Proteine erfolgte in Abhängigkeit von Strukturmerkmalen in fünf Klassen, wobei jedoch eine grundsätzliche Typisierung in die Gruppe der R-Proteine mit extrazellulären oder intrazellulären leucinreichen Regionen (*leucine-rich repeats*; LRRs) gemacht wird (Dangl & Jones, 2001). Die zentrale Nukleotid-Bindungs-Stelle (*nucleotide-binding site*; NBS) ist ein gemeinsames Strukturmerkmal der meisten LRR-Proteine, welche für die Bindung bzw. Hydrolyse eines ATPs verantwortlich ist und potentiell eine Funktion in der Signaltransduktion hat (Tameling *et al.*, 2002). Die Gruppe der R-Proteine mit intrazellulären LRRs besitzt Amino-terminal entweder eine „*coiled-coil*“-Struktur (CC) oder die bereits erwähnte TIR-Domäne. Durch genetische Analysen wurden unterschiedliche Mutanten mit einem Verlust der Resistenz gegen avirulente Pathogene isoliert. Die Identifizierung der Mutanten zeigte, dass die korrespondierenden Gene für NBS-LRR-Proteine kodierenden, denen daher eine prinzipielle Funktion in der Resistenzausprägung gegen avirulente Pathogene zugeordnet wird (Holt *et al.*, 2003).

Unabhängig von strukturellen Merkmalen besitzen alle R-Proteine das Potential, AVR-Proteine direkt oder indirekt zu erkennen und infolgedessen durch Transduktion eines Signals Abwehrreaktionen in der Zelle auszulösen. Experimentelle Hinweise, welche eine direkte Interaktion von R- und AVR-Protein belegen (Rezeptor-Ligand-Modell) sind bisher selten beschrieben worden. Die physische Interaktion eines Liganden mit dem korrespondierenden R-Protein ist beispielweise für die Interaktion des R-Proteins PI-TA aus Reis mit dem AVR-Protein aus *Magnaporthe grisea* PITA nachgewiesen worden (Jia *et al.*, 2000).

Vielmehr wird angenommen, dass R-Proteine durch eine indirekte Erkennung von AVR-Proteinen, z. B. durch Erkennung der AVR-Funktion, in der Lage sind, Abwehr zu induzieren. Das als „*guard hypothesis*“ bezeichnete Modell der R-Gen-Funktion nimmt an, dass R-Proteine eine „Überwachungsfunktion“ in der Zelle übernehmen und daher auf Veränderungen von Zielmolekülen, welche in der Gegenwart der AVR-Proteine potentiell modifiziert vorliegen, reagieren und Resistenz aktivieren (Van der Biezen & Jones, 1998; Dangl & Jones, 2001). Das Modell setzt voraus, dass in Abwesenheit komplementärer R-Genprodukte die Avr-Genprodukte zelluläre Proteine modifizieren und so durch Störung der Wirtszellhomöostase als Virulenzfaktoren die Krankheit der Wirtspflanze auslösen (Belkhadir *et al.*, 2004). Experimentelle Daten hierfür kommen hauptsächlich aus Untersuchungen der Interaktion von R-Proteinen mit bakteriellen AVR-Proteinen (Effektorproteinen), welche über das Typ-III(Three)-Sekretionssystem (TTSS) bakterieller Phytopathogene direkt in pflanzliche Zellen injiziert werden (Nimchuk *et al.*, 2001, Staskawicz *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass RIN4 (RESISTANCE to PSEUDOMONAS SYRINGAE pv MACULICOLA1 INTERACTOR 4) ein Zielmolekül von drei unterschiedlichen TTSS-Effektorproteinen, AVR-RPM1 (AVR-RESISTANCE to P. SYRINGAE pv MACULICOLA1), AVR-RPT2 (AVR-RESISTANCE to P. SYRINGAE pv IOMATO2) und AVR-B (AVR-proteinB from *P.*

SYRINGAE pv *GLYCINEA*) darstellt und *in vivo* mit diesen AVR-Proteinen interagiert (Mackey *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003). Es wird angenommen, dass durch die Bindung der Effektorproteine an RIN4 dessen Funktion als negativer Regulator der basalen Abwehr stimuliert wird (Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Kim *et al.*, 2005; Lim & Kunkel, 2004). Eine von der AVR/R-Protein-Interaktion unabhängige Funktion von RIN4 in der Regulation der PAMP-induzierten basalen Abwehr ist in Untersuchungen von Kim *et al.* (2005) demonstriert worden. Die experimentelle Befunde zeigen, dass die Überexpression von RIN4 eine Suppression der Kallose-Auflagerungen sowie der *PR*-Genexpression nach flg22-Induzierung bewirkt. Übereinstimmend damit reagieren flg22-behandelte *rin4*-Mutanten mit einer verstärkt aktivierbaren Kallose-Akkumulation und *PR*-Genexpression.

In resistenten Kultivaren erfolgt möglicherweise eine indirekte Wahrnehmung der Störung der RIN4-Funktion über die R-Proteine RPM1 und RPS2. Es wurde gezeigt, dass die Phosphorylierung von RIN4 (im Fall von AVR-RPM1 und AVR-B) bzw. die proteolytische Eliminierung von RIN4 (im Fall von AVR-RPT2) durch die entsprechenden R-Proteine wahrgenommen werden (Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Day *et al.* 2005).

Einen weiteren Hinweis für die indirekte Aktivierung von R-Proteinen liefert das Beispiel von RPS5 (RESISTANCE to *P. SYRINGAE*5), einem NBS-LRR-R-Protein, welches Resistenz gegen AVR-PPHB (AVR-gene B FROM *P. SYRINGAE* pv *PHASEOLICOLA*)-exprimierende Stämme von *P. syringae* vermittelt (Warren *et al.*, 1998). Die Erkennung von AVR-PPHB durch RPS5 erfordert die Proteinkinase PBS1 (AVR-PPHB SUSCEPTIBLE1), welche ein direktes Substrat der Zystein-Protease AVR-PPHB ist. Es wurde gezeigt, dass die Spaltung von PBS1 sowie die Kinaseaktivität für die RPS5-vermittelte Resistenz notwendig ist (Shao *et al.*, 2003). Die Erkennung des AVR-Proteins PphB durch RPS5 erfolgt also auch hier indirekt durch Wahrnehmung des durch Spaltung modifizierten Zielmoleküls PBS1. Diese und weitere experimentellen Befunde der molekularen Funktion der *R*-Gene lassen die Richtigkeit der „guard-hypothesis“ als sehr wahrscheinlich erscheinen (van der Hoorn *et al.*, 2002; Mackey *et al.*, 2003; Axtell & Staskawicz, 2003; Lim & Kunkel, 2004; Day *et al.*, 2005).

Als eine weitere Komponente in der Regulation von R-Proteinkomplexen einiger NBS-LRR-Proteine ist zytosolisches HSP90 (HEAT SHOCK PROTEIN90) beschrieben worden (Schulze-Lefert, 2004; Hubert *et al.*, 2003). HSP90 scheint eine Funktion in der Aufrechterhaltung und Stabilisierung eines Aktivierungs-kompetenten R-Proteinkomplexes in Abwesenheit eines Pathogenstimulus zu haben (Pratt & Toft, 2003). Die Notwendigkeit eines durch negative Regulatoren deaktivierten und stabilisierten Komplexes in Abwesenheit eines Pathogens erscheint sinnvoll, um eine unkontrollierte Signaltransduktion durch basale R-Proteinaktivität zu vermeiden (Belkhadir *et al.*, 2004; Shirasu & Schulze-Lefert, 2003). In Anwesenheit eines Pathogens ist es im Gegensatz dazu notwendig, über eine destabilisierende und Degradations-sensitive Konformationsänderung einen aktivierten Zustand des R-Proteins, d. h. die Signaltransduktion zu

ermöglichen (Moffett *et al.*, 2002; Bendahmane *et al.*, 2002). Es ist davon auszugehen, dass HSP90 über intra- und intermolekulare Wechselwirkungen unter Beteiligung weiterer Kochaperone Einfluss auf die Stabilität und Aktivität von R-Protein-Erkennungskomplexen nimmt (Belkhadir *et al.*, 2004; Sangster & Queitsch, 2005).

Eine Unterstützung der Annahme der durch intramolekulare Interaktion bewirkten Regulation in der R-Gen-vermittelten Signaltransduktion lieferten Untersuchungen von Moffett *et al.*, (2002). Es wurde gezeigt, dass die *in vivo*-Interaktion zwischen der NBS-LRR-Domäne und der N-terminalen CC-Domäne des R-Proteins RX (RESISTANCE to POTATO VIRUS X) aus Kartoffel durch PVX coat protein (POTATO VIRUS X) verhindert werden kann, was zu der Annahme führte, dass die PVX-vermittelte Aktivierung von RX durch Inhibierung intramolekularer Interaktionen erfolgt.

Durch Mutantanalysen, welche hauptsächlich in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* durchgeführt wurden, konnte in der Vergangenheit eine zunehmende Zahl von Komponenten identifiziert werden, für die eine Rolle in der R-Gen-vermittelten Resistenz belegt worden ist. Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass die Signaltransduktion in der durch NBS-LRR-R-Proteine vermittelten Resistenz grundsätzlich durch zwei, von der Struktur des N-Terminus des R-Proteins abhängige Wege erfolgen. Mit einigen Ausnahmen transduzieren TIR-NBS-LRR R-Proteine über EDS1- und CC-NBS-LRR R-Proteine über NDR1-abhängige abhängige Signalkaskaden (Aarts *et al.*, 1998).

Die Identifizierung von EDS1 (ENHANCED DISEASE SSUSCEPTIBILITATY1) erfolgte nach Durchmusterung von Mutanten mit einer erhöhten Anfälligkeit gegen virulente Stämme von *Pseudomonas syringae* bzw. virulente Rassen des Oomyzeten *Hyaloperonospora parasitica* (Glazebrook *et al.*, 1996; Parker *et al.*, 1996). Die Mutante ndr1 (nonrace-specific disease resistance1) wurde in einer Durchmusterung von *A. thaliana*-Mutanten mit einem Verlust der Resistenz gegen den avirulenten *P. syringae* pv *tomato*-Stamm DC3000 (*avrB*) isoliert (Century *et al.*, 1995; 1997). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die biochemische Funktion des Membranlokalisierten NDR1 gegenwärtig noch unklar ist. Ein Verlust der Funktion von EDS1 und NDR1 führt zur Störung der R-Gen-vermittelten Signaltransduktion bzw. zur Anfälligkeit gegenüber ansonsten avirulenter Pathogene.

Weiterhin wurde gezeigt, dass neben EDS1 auch PAD4 (PHYTOALEXIN DEFICIENT4) für die Signaltransduktion von TIR-NBS-LRR R-Proteinen notwendig ist (Glazebrook *et al.*, 1996; Feys *et al.*, 2001). Die von Feys *et al.* (2001) demonstrierte *in vivo*-Interaktion von EDS1 und PAD4 unterstützt das Modell einer gemeinsamen Funktion von EDS1 und PAD4 in der R-Gen-vermittelten Resistenz. Obwohl eine katalytische Funktion von EDS1 und PAD4 bisher nicht gezeigt wurde, wird angenommen, dass die Homologie beider Komponenten zu eukaryontischen Lipasen sowie die Funktion als positive Regulatoren der Salizylsäure (salicylic acid; SA)-Akkumulation ein Hinweis für eine mögliche Beteiligung von EDS1 und PAD4 an der Lipid-

abhängigen SA-Signaltransduktion liefert (Falk *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 1998; Wiermer *et al.*, 2005). Als ein weiterer Interaktionspartner von EDS1 ist kürzlich SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101) identifiziert worden, welches in Kombination mit PAD4 eine Funktion in der EDS1-abhängigen Resistenz hat (Feys *et al.*, 2005). Es wurde gezeigt, dass SAG101 als Komplex mit EDS1 im Gegensatz zu den im Zytoplasma und im Zellkern befindlichen EDS1-Komplexen ausschließlich im Zellkern lokalisiert ist. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass EDS1 eine potentielle Funktion in der Stabilisierung der Komponenten PAD4 und SAG101 hat, wobei ebenso eine Stabilisierung von EDS1 durch Komplexbildung mit PAD4 und SAG101 erfolgt. Es wird angenommen, dass PAD4 und SAG101 neben der Stabilisierung von EDS1 auch eine Funktion als Signalkomponente in der durch TIR-NBS-LRR R-Proteine ausgelösten Signaltransduktion haben. Die Zellkompartiment-abhängigen dynamischen Interaktionen von EDS1 scheinen daher entscheidende Funktionen in der R-Gen-spezifischen Resistenz zu haben.

Die Betrachtungsweise einer vom Strukturtyp des entsprechenden R-Proteins abhängigen, entweder durch *EDS1*- oder *NDR1*-vermittelten R-Gen-Resistenzausprägung musste jedoch nach der Identifizierung zweier weiterer Komponenten, *RAR1* (REQUIRED for MLA12 RESISTANCE1) und *SGT1* (SUPPRESSOR of G-TWO ALLELE of SUPPRESSOR of KINETOCHORE PROTEIN1) erweitert werden.

RAR1 ist erstmals in Mutantanalysen in Gerste (*Hordeum vulgare*) isoliert worden und scheint ein Konvergenzpunkt in der kultivarspezifischen Wirtsresistenz gegen zahlreiche Mehltau-Isolate zu sein (Shirasu *et al.*, 1999). Untersuchungen des *RAR1*-Homologs in *Arabidopsis* deuten auch hier auf eine konservierte Funktion von *RAR1* in der R-Gen-spezifischen Resistenz gegen Pathogene verschiedener Klassen, welche von R-Proteinen des CC-NBS-LRR- als auch des TIR-NBS-LRR-Typs vermittelt werden (Muskett *et al.*, 2002; Torneo *et al.*, 2002). Sequenzvergleiche zeigten, dass *RAR1* zwei zinkbindende Domänen (zystein- und histidinreiche Domäne; CHORD I und II) sowie eine CS-Domäne (CHORD and SGT1-motif) aufweist und innerhalb des eukaryontischen Reiches hoch konserviert ist. Tatsächlich konnten Interaktionsstudien mit verschiedenen Pflanzen-Proteinextrakten eine direkte physische Interaktion von *RAR1* und *SGT1* nachweisen (Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). Eine Mutation in einem von zwei sequenzverwandten *Arabidopsis SGT1*-Genen, *SGT1b*, führte zur Störung einer Reihe von sowohl TIR- als auch CC-NBS-LRR-R-Protein-vermittelter Resistenzen gegen den Oomyzeten *H. parasitica* (Austin *et al.*, 2002; Tör *et al.*, 2002). Obwohl *RAR1* und *SGT1* in *Arabidopsis* physisch interagieren und als Komplex vorliegen, sind für verschiedene R-Proteine aus *Arabidopsis* unterschiedliche Notwendigkeiten der Beteiligung von *RAR1*, *SGT1* bzw. *RAR1* und *SGT1* in Kombination an der R-Gen-vermittelten Resistenz gezeigt worden (Muskett *et al.*, 2002; Torneo *et al.*, 2002; Austin *et al.*, 2002). So belegen Untersuchungen von Torneo *et al.* (2002), dass das R-Protein RPM1 in der *rar1*-Mutante destabilisiert vorliegt. Es wird angenommen, dass *RAR1*

und/oder SGT1, ähnlich der erwähnten Funktion von zytosolischem HSP90, als Kochaperone für die Zusammensetzung einiger, jedoch nicht aller R-Protein-Erkennungskomplexe notwendig sind (Gray *et al.*, 2003; Shirasu & Schulze-Lefert, 2003). In Studien von Takahashi *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass die direkte Interaktion von HSP90, RAR1 und SGT1 für die Ausprägung der RPS2-vermittelten Resistenz notwendig ist. RAR1 und SGT1 scheinen daher gemeinsame und unterschiedliche Funktionen in der R-Gen-vermittelten Wirtsresistenz zu haben.

Durch Identifizierung von SGT1-*in vivo*-Interaktoren wurde weiter zur Aufklärung von R-Gen-vermittelten Resistenzmechanismen beigetragen. Parallelen zu zellulären Ubiquitinierungsprozessen wurden nach Untersuchung der SGT1-Interaktoren SKP1 (S-phase kinase associated protein1) und CUL1 (CULLIN1), welche Komponenten des SCF (SKP1-CULLIN-E-BOX)-E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes darstellen, erstmals beobachtet (Kitagawa *et al.*, 1999; Azevedo *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). SCF-Komplexe vermitteln die Ubiquitinierung und Degradation von Proteinen durch das 26S-Proteasom und könnten somit eine spezifische Funktion in der Stabilisierung bzw. Destabilisierung, d. h. in der Regulation von Resistenz-vermittelnden Proteinkomplexen haben. Experimentelle Hinweise für die Beteiligung von SCF-Komplexen in der R-Gen-Resistenz kommen aus *gene-silencing*-Studien in *N. benthamiana*. Das Inaktivieren von SKP1-Genen führte zu einer Beeinträchtigung der N-Gen-vermittelten Resistenz gegen das Tabak-Mosaik-Virus (Liu *et al.*, 2002).

Ein strukturell von den zuvor beschriebenen und durch LRR-Domänen gekennzeichneten R-Genen stellt das R-Gen RPW8 (RESISTANCE to POWDERY MILDEW8) dar, welches zu einer Resistenzausprägung gegen mehrere Mehltaupilze in *Arabidopsis* notwendig ist (Xiao *et al.*, 2001). RPW8 besitzt lediglich ein CC-Motiv sowie eine Transmembran-Domäne. Neben EDS1 und PAD4 ist die RPW8-vermittelte Resistenz auch abhängig von SGT1 jedoch unabhängig von RAR1 und NDR1 (Hammond-Kosack & Parker, 2003; Xiao *et al.*, 2005). Ergänzend in der Reihe der vom NBS-LRR-Strukturtyp abweichenden R-Proteine ist die intrazelluläre Proteinkinase PTO aus Tomate zu erwähnen, welche Resistenz gegen *P. syringae* (*avrPto*)-Stämme vermittelt (Martin *et al.*, 1993). Die durch PTO vermittelte Resistenz ist abhängig von dem NBS-LRR Protein PRF (PSEUDOMONAS RESISTANCE and FENTHION SENSITIVITY) sowie von RAR1 (Salmeron *et al.*, 1996). Die Resistenzmechanismen der atypischen R-Gene RPW8 und Pto liefern somit einen Hinweis, dass sowohl LRR- als auch nicht-LRR-R-Proteine Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Wege oder Konvergenzpunkte in der R-Gen-spezifischen Signaltransduktion zeigen (Bonas & Lahaye, 2002).

1.3 Induzierbare pflanzliche Abwehrreaktionen

Wie eingangs erwähnt stellt die Gesamtheit der passiven und aktiven Abwehr einen zumeist effizienten Mechanismus der Pflanzen dar, um eindringende Pathogene abzuwehren. Dabei sind die nach Pathogenerkennung ausgelösten intrazellulären Signaltransduktionskaskaden bzw. die

dadurch induzierten Abwehrreaktionen grundsätzlich ähnlich und unabhängig vom Typ der Pflanze-Pathogen-Interaktion (Yang *et al.*, 1997; Nürnberger und Scheel, 2001).

Eine unmittelbar nach spezifischer oder genereller Elicitierung beobachtete Reaktion stellt die Aktivierung von Ionenkanälen in der Plasmamembran bzw. der nachfolgende Efflux von Cl^- und K^+ sowie Influx von H^+ und Ca^{2+} dar (Atkinson *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997; Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Blatt *et al.*, 1999; Klüsener & Weiler, 1999). So wurde in Petersilie-Zellkulturen gezeigt, dass ein transients Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Generierung extrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Superoxidanionen (O_2^-) notwendig ist (Blume *et al.*, 2000). Dieser als „oxidative burst“ bezeichnete Prozess der Pathogen-induzierten Akkumulation von ROS, welcher durch Plasmamembran-lokalisierte NADPH (reduzierte Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat)-Oxidasen und apoplastische Peroxidasen katalysiert wird, scheint auf mehreren Ebenen in der Pathogenabwehr involviert zu sein. So wird neben einer direkten toxischen Eigenschaft von H_2O_2 eine Beteiligung von ROS an der oxidativen Quervernetzung der Zellwand sowie in der Signaltransduktion (H_2O_2) nach Pathogenbefall beschrieben (Bradley *et al.*, 1992; Thordal-Christensen *et al.*, 1997; Lamb & Dixon, 1997). In Petersilie und *Arabidopsis* wurde eine Beteiligung von H_2O_2 bzw. O_2^- an der Auslösung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach Elicitierung bzw. Pathogeninfektion gezeigt (Jabs *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

Desweiteren ist die kombinierte Funktion von ROS, Ca^{2+} und Stickstoffmonoxid (NO) während der transkriptionellen Aktivierung pflanzlicher Abwehrgene beschrieben worden (Durner *et al.*, 1998; Klessig *et al.*, 2000; Wendehenne *et al.*, 2004). Eine Abhängigkeit von intrazellulärem Ca^{2+} ist beispielsweise für die Bildung von ROS aber auch für die Aktivierung von kalziumabhängigen Proteinkinasen (*calcium-dependent protein kinases*; CDPKs) und Calmodulin demonstriert worden (Romeis *et al.*, 2001; Heo *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2002). Sowohl CDPKs als auch Calmodulin haben essentielle Funktionen in der Aktivierung pflanzlicher Abwehrreaktionen.

Eine weitere häufig beobachtete Abwehrreaktion in der Pflanze-Pathogen-Interaktion ist die hypersensitive Reaktion (HR), welche durch ein lokal begrenztes Absterben pflanzlicher Zellen unmittelbar am Infektionsort gekennzeichnet ist und Ähnlichkeiten mit dem Prozess der Apoptose in tierischen Systemen aufweist (Lam *et al.*, 2001; Beers & McDowell, 2001; Lam, 2004). So ist eine Beteiligung von ROS an der Aktivierung des programmierten Zelltods (*programmed cell death*; PCD) für Pflanzen und Tiere gleichermaßen beschrieben worden (Lam *et al.*, 2001; Ameisen, 2002). Neuere Studien unterstützen dabei die Annahme, dass ROS eine Rolle als Signaltransduktionskomponenten in der pflanzlichen Zelltod-Reaktion spielen (Kachroo *et al.*, 2003; Dat *et al.*, 2003; Yoda *et al.*, 2003). Der erste Beleg für die Beteiligung pflanzlicher NADPH-Oxidasen an der Generierung von ROS und deren Beteiligung am hypersensitiven Zelltod wurde durch Untersuchung der *Arabidopsis respiratory burst oxidase homologues*-Gene, *rbohD* und

rbohF gezeigt (Torres *et al.*, 2002). Ein Verlust der Funktion beider Gene führte zu einer Abnahme der ROS-Akkumulation und zu einem abgeschwächten hypersensitiven Zelltod nach Pathogeninfektion.

Die Aufklärung der in Pflanzen ablaufenden PCD-Prozesse, insbesondere der nach Pathogeninfektion induzierten HR ist durch die Identifizierung der Pflanzen-spezifischen PCD-Regulatoren aus *Arabidopsis* (*LESIONS SIMULATING DISEASE1*; LSD1) und Gerste (MLO) entscheidend vorangetrieben worden (Jabs *et al.*, 1996; Piffanelli *et al.*, 2002). Genetische Studien der *lsd1*-Mutante deuten auf eine Schlüssel-Funktion von LSD1 als negativer Regulator des nach Pathogenstimulus ausgelösten PCDs hin, wobei noch unklar ist, ob LSD1 eine spezifische Funktion in dem Pathogen-induzierten PCD hat oder auch andere Formen des PCDs in Pflanzen kontrolliert (Aviv *et al.*, 2002; Lam *et al.*, 2004).

Die Untersuchung von *mlo*-Mutanten in Gerste zeigte, dass der Verlust der MLO-Funktion zu einem spontan, d. h. ohne äußeren Stimulus aktivierten PCD und zu einer erhöhten Pathogenresistenz führt, was eine Eigenschaft von MLO als Suppressor der Zelltod-Aktivierung und der Pathogenresistenz in Gerste nahelegt (Piffanelli *et al.*, 2002). Es wurde außerdem gezeigt, dass die MLO-Suppressor-Funktion von dem Ca^{2+} -Sensor Calmodulin positiv reguliert wird, was ein Hinweis für eine direkte Modulation der Regulatoren pflanzlicher Pathogenabwehr durch Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen darstellt (Kim *et al.*, 2002; Lam, 2004; Bhat *et al.*, 2005).

Ein weiteres wesentliches Element in der Signaltransduktion während der pflanzlichen Pathogenabwehr stellen die MAPK-Kaskaden dar (Zhang & Klessig, 2001; Jonak *et al.*, 2002; Bent, 2001). MAPK stellen die Endglieder in der nach Pathogenerkennung ausgelösten Signaltransduktionskaskade dar. Die durch Transphosphorylierung erfolgte posttranslationale Modifikation der MAPK bewirkt eine transkriptionelle Aktivierung unterschiedlicher Zielgene. So wurde in Petersilie-Zellkulturen die Beteiligung einer nach Elicitierung mit Pep13 in den Zellkern translozierten MAPK an der Induzierung einer von WRKY-Transkriptionsfaktoren abhängigen Abwehrgenexpression beobachtet (Ligterink *et al.*, 1997; Kroj *et al.*, 2003). Weitere experimentelle Befunde aus Analysen transgener Tabakpflanzen, welche konstitutiv aktive MAPK exprimieren, belegen eine Korrelation von MAPK-Aktivierung und *PR*-Genexpression (Yang *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2002). Ebenso ist aber auch eine negative Regulation von pflanzlichen Abwehrreaktionen durch Aktivierung von MAPK beschrieben worden (Petersen *et al.*, 2000; Frye *et al.*, 2001). Beispielsweise führt der Verlust der Funktion des Gens *EDR1* (*ENHANCED DISEASE RESISTANCE1*), welches für eine MAPK-Kinase-Kinase kodiert, in der *Arabidopsis*-Mutante *edr1-1* zu einer erhöhten Resistenz gegen den Mehltaupilz *E. cichoracearum* (Frye *et al.*, 2001). Eine verstärkte Pathogenresistenz ist auch für die *A. thaliana*-Mutante *mpk4* gezeigt worden (Petersen *et al.*, 2000). Die nach Mutation in *AtMPK4* beobachtete erhöhte Pathogenresistenz korreliert außerdem mit einer konstitutiven *PR*-Genexpression sowie erhöhter SA-Akkumulation und liefert daher ein weiteres Beispiel der durch MAPKs negativ regulierten Pathogenabwehr.

Ein in vielen Pflanzen-Spezies beobachtetes Phänomen ist die durch lokale Pathogeninfektion bzw. durch die daraus resultierenden lokalen Abwehrreaktionen induzierte systemische Resistenz in entfernten nicht infizierten Pflanzenteilen. Für die systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*; SAR), welche durch eine Pathogen-unspezifische und längere Zeit anhaltende systemische Abwehr charakterisiert ist, scheint Salizylsäure (*salicylic acid*; SA) eine herausragende Bedeutung zu haben. (Ryals *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2001). Experimentelle Hinweise belegen, dass SA notwendig und zugleich hinreichend für die Ausprägung der SAR ist (Ryals *et al.*, 1996). Obwohl SA in verschiedenen Pflanzenteilen nachgewiesen worden ist, scheint es jedoch nicht als mobiles Signal in der SAR in Frage zu kommen (Sticher *et al.*, 1997). Die Identifizierung von *DIR1* (*DEFECTIVE in INDUCED RESISTANCE1*), welches für ein apoplastisches putatives Lipid-Transferprotein kodiert, demonstriert, dass möglicherweise Lipid-ähnliche Signalmoleküle Bedeutung in der Signalübermittlung der SAR haben (Maldonado *et al.*, 2002). Einen weiteren Hinweis dafür lieferte *SFD1* (*SUPPRESSOR of FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1*), welches zur SAR in *Arabidopsis* notwendig ist und ebenfalls im Lipid-Metabolismus involviert ist (Nandi *et al.*, 2004).

Ein charakteristisches Merkmal für die in der SAR beobachtete systemische Abwehr stellt die SA-abhängige Expression verschiedener *PR*-Gene, welche z. B. für 1,3- β -Glukanasen, Chitinasen oder *PR1*-Proteine kodieren, dar (Ryals *et al.*, 1996).

Eine weitere Form der systemischen Resistenz, die induzierte systemische Resistenz (ISR) ist im Gegensatz dazu SA-unabhängig bzw. Jasmonat- (*jasmonic acid*; JA) sowie Ethylen (*ethylene*; ET)-abhängig und kann durch nichtpathogene Wurzelbakterien hervorgerufen werden (Pieterse *et al.*, 1998; 2001; Penninckx *et al.*, 1998).

Generell kann gesagt werden, dass Pflanzen in Abhängigkeit von der Art des eindringenden Pathogens ein komplexes Programm SA- und/oder JA/ET-abhängiger Signaltransduktionswege zur Auslösung zumeist effizienter Abwehrreaktionen nutzen. Es wird angenommen, dass nekrotrophe Pathogene grundsätzlich durch SA-unabhängige Abwehrmechanismen kontrolliert werden bzw. SA-abhängige Abwehrreaktionen in der Pflanze unterdrücken (Thomma *et al.*, 2001; Oliver & Ipcho, 2004). Im Gegensatz dazu werden biotrophe Pathogene in den meisten Fällen durch eine SA-abhängige Abwehr effizient an der Besiedlung der Pflanze gehindert (Ton *et al.*, 2002).

Es gilt als sehr wahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Signalwege weniger unabhängig voneinander als vielmehr durch ein komplexes, durch positive und negative Regulation einzelner Signalkomponenten gestaltetes Netzwerk, dem „*signaling cross-talk*“ agieren (Thomma *et al.*, 2001; Kunkel & Brooks, 2002; Glazebrook *et al.*, 2003; Glazebrook, 2005).

1.4 Salizylsäure-abhängige Abwehrreaktionen

Genetische Analysen haben bereits seit längerem gezeigt, dass zur Aktivierung von lokalen Abwehrreaktionen (z. B. HR) als auch zur Ausprägung systemischer Resistenz (SAR) die Akkumulation von SA essentiell ist. Es wurde auch gezeigt, dass in Pathogen-infiziertem Gewebe die SA-Konzentration erhöht ist und dass durch exogene SA-Applikation eine erhöhte Resistenz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen induziert werden kann (Ryals *et al.*, 1996). In Übereinstimmung damit führt der Verlust der SA-Akkumulation in transgenen Pflanzen, welche ein für die bakterielle Salizylsäure-Hydroxylase kodierendes Gen (*NahG*) exprimieren, zur Unfähigkeit SAR auszuprägen (Gaffney *et al.*, 1993). Jedoch demonstrieren neuere Studien, dass für die in den *nahG*-Linien beobachtete veränderte Pathogenabwehr neben dem Verlust der SA-Akkumulation auch die gebildeten Abbauprodukte von SA, wie z. B. Catechol verantwortlich sein können (Heck *et al.*, 2003; Van Wees *et al.*, 2003).

Genetische Analysen in *Arabidopsis* führten zur Isolation zahlreicher SA-Biosynthese und SA-Signaltransduktionsmutanten. Die Identifizierung der SA-Biosynthese-Mutanten *sid2* (*salicylic-acid-induction deficient2*) bzw. die der zu *sid2* allelischen Mutante *eds16* zeigte, dass das korrespondierende Gen für eine putative Chloroplast-lokalisierte Isochorismatsynthese (ICS) kodiert, welche SA wahrscheinlich über einen alternativ zum Phenylpropan-Stoffwechselweg existierenden Weg synthetisiert (Shah, 2003). *sid2* und *eds16* zeigen neben der Inhibierung von sowohl SA-Synthese als auch SAR-Aktivierung eine verstärkte Pathogenanfälligkeit, welche durch SA-Applikation komplementiert werden kann (Wildermuth *et al.*, 2001; Nawrath & Métraux, 1999). Eine weitere Komponente wurde durch die Identifizierung des Membran-Proteins EDS5 gefunden, welches Homologien zu Transportern des MATE-Typs (*multidrug and toxin extrusion*) zeigt und daher am Transport phenolischer Vorstufen an der SA-Biosynthese beteiligt sein könnte (Nawrath *et al.*, 2002). Genetische und biochemische Studien der Mutanten *eds1* und *pad4*, deren Funktion in der R-Gen-Resistenz bereits erwähnt wurde, zeigen eine gestörte Akkumulation von SA nach Pathogeninfektion und legen eine in der Regulation der SA-Biosynthese übergeordnete Funktion von EDS1 und PAD4 relativ zu EDS5 nahe (Jirage *et al.*, 1999; Feys *et al.*, 2001; Nawrath *et al.*, 2002).

Grundsätzlich kann eine Einteilung der SA-abhängigen Signaltransduktion in mindestens zwei Wege erfolgen, welche durch eine vorhandene oder nicht vorhandene Notwendigkeit von NPR1 (*NON-EXPRESSOR of PR-GENES1*) gekennzeichnet sind (Shah, 2003). Die Mutante *npr1*, sowie die zu *npr1* allelische Mutante *nim1* (*non inducible immunity1*) sind SA-insensitiv und in der Resistenz gegen virulente Pathogene eingeschränkt (Cao *et al.*, 1994; Delaney *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Shah *et al.*, 1997). NPR1 zeigt neben einem als Ankyrinwiederholung (*Ankyrin-repeat*) bezeichneten Proteinbindungs-Motiv und einer Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localisation sequence*; NLS) noch eine weitere Protein-Protein-Interaktionsdomäne (Cao *et al.*, 1997). NPR1 ist als ein Modulator der PR-Genexpression beschrieben worden, wobei *in*

vivo-Interaktionsstudien als auch genetische Studien belegen, dass die Aktivierung SA-abhängiger *PR*-Gene durch NPR1 nach Bindung von bZIP (*basic leucine-zipper*)-Transkriptionsfaktoren des TGA-Typs erfolgt (Després *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000; Fan & Dong, 2002; Johnsen *et al.*, 2003). Weitere intensive Analysen zur Aufklärung der Funktion von NPR1 und SA in der Ausprägung der SAR lieferten unabhängige Hinweise, dass möglicherweise über eine von SA regulierte Veränderung des zellulären Redox-Status eine Änderung der NPR1-Aktivität erfolgt (Mou *et al.*, 2003; Després *et al.*, 2003). So wurde gezeigt, dass nach SA-Induktion eine Monomerisierung des als Oligomer im Zytoplasma vorliegenden NPR1 erfolgt, was eine Translokation des monomerisierten und aktivierten NPR1 in den Zellkern bewirkt. Es scheint daher, dass die Änderung des Redox-Status, ausgelöst durch eine SA-Akkumulation, die Verbindung zwischen dem SA-Signal und der NPR1-Aktivität in der Ausprägung der SAR darstellt (Pieterse & Van Loon, 2004). Über den Mechanismus, der durch die Akkumulation von SA zu einer Veränderung des Redox-Status führt, wird diskutiert, dass möglicherweise nach der SA-abhängigen Aktivierung von Genen die für antioxidative Proteine, wie z. B. Katalase oder Superoxid Dismutase, kodieren, eine Neutralisierung von ROS-Intermediaten sowie eine zunehmende Etablierung reduzierender Bedingungen erfolgt (Dong, 2004).

Die Existenz eines von NPR1 unabhängigen Signalwegs ist aufgrund der in *npr1*-Mutanten nach Pathogenbefall beobachteten *PR*-Genexpression gezeigt worden (Shah *et al.*, 1999, 2001; Kachroo *et al.*, 2001).

Die Isolation der Mutante *ssi2* (*suppressor of SA-insensitivity2*), die teilweise den *npr1*-Phänotyp supprimiert, sowie die Identifizierung des korrespondierenden Gens, welches für eine Stearoyl-ACP-Desaturase kodiert, führte zu der Annahme, dass Lipide in der durch *ssi2*-vermittelten NPR1-unabhängigen Resistenz involviert sind (Shah *et al.*, 2001; Kachroo *et al.*, 2001). Unterstützt wird diese Annahme durch die Identifizierung der *sfd*-Mutanten, welche den *ssi2*-Phänotyp supprimieren und daher weder konstitutive *PR*-Genexpression noch verstärkte Pathogenresistenz zeigen (Nandi *et al.*, 2003). SFD1 katalysiert die Synthese von Glycerin-3-Phosphat in der Glycerolipid-Biosynthese (Nandi *et al.*, 2004). Da nur die Ausprägung der SAR, nicht jedoch die lokale Pathogenresistenz in *sfd1* beeinträchtigt ist, wird angenommen, dass SFD1 bzw. Lipide möglicherweise in der Signalübermittlung der SAR involviert sind (Nandi *et al.*, 2004). Desweiteren wurde gezeigt, dass durch Applikation von SA die *PR1*-Genexpression in der *sfd1*-Einzelmutante nicht induziert wird, was darauf hindeutet, dass Lipid-Abkömmlinge als Signalkomponenten sowohl in der NPR1-abhängigen als auch in der NPR1-unabhängigen SA-Signaltransduktion beteiligt sind (Shah, 2003).

Ein NPR1-unabhängiger und SA-abhängiger Resistenzmechanismus ist ebenso in den *Arabidopsis*-Mutanten *ssi1*, *cpr5* und *cpr6* (*constitutive expressor of PR-gene 5 und 6*) beobachtet worden (Shah *et al.*, 1999; Clarke *et al.*, 2000). Die Mutante *ssi1* zeigt neben erhöhter Pathogenresistenz und konstitutiver *PR1*-Genexpression auch eine konstitutive Expression des

JA-abhängigen Gens *PDF1.2*. Interessanterweise zeigten genetische Studien, dass für die *PDF1.2*-Expression neben der JA- und ET-Signaltransduktion auch eine Akkumulation von SA notwendig ist. Ebenso ist demonstriert worden, dass für die NPR1-unabhängige *PR1*-Expression eine funktionelle sowohl SA-regulierte als auch JA/ET-regulierte Signaltransduktion notwendig ist (Nandi *et al.*, 2003). Es wird daher angenommen, dass SSI1 eine gemeinsame Komponente der durch SA und JA/ET vermittelten Signaltransduktion ist und möglicherweise ein Modulator im *cross-talk* dieser Signalwege darstellt (Shah *et al.*, 1999; Nandi *et al.*, 2003).

Die Analyse der Mutanten *cpr5* und *cpr6* deutet, in Analogie zu *ssi1*, darauf hin, dass die Ausprägung der NPR1-unabhängigen Resistenz durch Mutationen, die zu Insensitivität gegenüber JA und ET führen, supprimiert werden kann (Clarke *et al.*, 2000). Durch Untersuchungen von Yoshida *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass es sich bei *cpr5* um ein Allel der Mutation *hys1* (*hyper**senescence**1*) handelt, welche zu einem frühen Altern der Blätter führt. Die Identifizierung von HYS1/CPR5 liefert daher einen Hinweis auf eine gemeinsame Komponente in dem Prozess der Blattseneszenz und der Pathogenabwehr.

1.5 Jasmonsäure- und Ethylen-abhängige Abwehrreaktionen

Die Existenz pflanzlicher Pathogenresistenzen, welche offensichtlich unabhängig von einer SA-Akkumulation in den untersuchten Pflanzen waren, deuteten auf die Notwendigkeit von effizienten SA-unabhängigen Abwehrmechanismen (Thomma *et al.*, 1998; 1999). So wurden in der Vergangenheit eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten isoliert, welche in der JA/ET-Biosynthese oder JA/ET-Signalperzeption gestört waren und zugleich eine erhöhte Anfälligkeit gegen unterschiedliche nekrotrophe Pathogene zeigten. Mutationen in der JA-Biosynthese, wie in der Dreifachmutante *fad3 fad7 fad8* (*fatty acid desaturase3/7/8*) oder in der JA-Perzeption, wie *coi1-1* (*coronatine insensitive1*) und *jar1-1* (*jasmonic acid resistant1*) führten zu einer erhöhten Anfälligkeit gegen *A. brassicicola*, *B. cinerea* und gegen unterschiedliche *Pythium*-Spezies (Thomma *et al.*, 1998; Penninckx *et al.*, 1998; 1999; Staswick *et al.*, 1998; Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Devoto *et al.*, 2005). Die Ethylen-insensitive Mutante *ein2-1* (*ethylene insensitive2*) ist anfälliger gegen *B. cinerea* und *E. carotovora* (Thomma *et al.*, 1999a; Norman-Setterblad *et al.*, 2000).

Grundsätzlich zeigen JA- und ET-abhängige Abwehr parallele Muster, wie z. B. hinsichtlich der Expression von *PDF1.2* (*PLANT DEFENSIN1.2*), *THI2.1* (*THIONIN2.1*), *HEL* (*HEVEIN LIKE PROTEIN*) oder *CHIB* (*CHITINASEB*) (Norman-Setterblad *et al.*, 2000; Penninckx *et al.*, 1998). Ebenso ist die Notwendigkeit von sowohl JA- als auch ET-abhängiger Signaltransduktion in der Ausprägung der bereits erwähnten ISR beschrieben worden (Pieterse & Van Loon, 1999).

Neuere Studien der JA-Signaltransduktion deuten im Zusammenhang mit CO11 darauf hin, dass ein E3-Ubiquitin-Ligasekomplex unter Beteiligung von CO11 (SCF^{CO11}) an dem 26S-Proteasom-abhängigen Proteinabbau putativ negativer Regulatoren des JA-Signalweges involviert ist (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Feng *et al.*, 2003; Devoto & Turner, 2005). Sequenzanalysen zeigten,

dass das F-Box-Motiv in COI1 die Substrat-spezifische Komponente im SCF^{COI1}-Komplex darstellt (Xie *et al.*, 1998, Cheong & Choi, 2003).

Ebenso sind unterschiedliche Mutanten isoliert worden, in denen die konstitutiv aktivierte JA-Signaltransduktion mit einer erhöhten Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene korreliert. So ist die Resistenz der Mutante *cev1-1* (*c*onstitutive *e*xpression of *V*SP1) gegen verschiedene *Erysiphe*-Spezies erhöht (Ellis & Turner, 2001). In Analogie dazu zeigt eine transgene *Arabidopsis*-Linie, die das Gen *JMT* (*J*A *C*ARBOXYL *M*ETHYL*T*RANSFERASE) überexprimiert, eine konstitutive *PDF1.2*-Expression sowie eine erhöhte Resistenz gegen das nekrotrophe Pathogen *B. cinerea* (Seo *et al.*, 2001). Über die den Resistenzmechanismen zugrunde liegenden Faktoren ist bisher jedoch wenig bekannt geworden. Hinweise, welche für eine möglicherweise durch Freisetzung von Zellwandbestandteilen und Oligosacchariden konstitutiv aktivierte JA-abhängige Abwehr sprechen liefert die Mutante *cev1-1*, für die ein Defekt in der Zellulosesynthase (*C*ELLULOSE *S*YNTHA*S*E3) *CESA3* beschrieben wurde (Ellis *et al.*, 2002).

ET-abhängige Abwehrreaktionen scheinen eine divergente Funktion in der Pathogenabwehr zu haben, da neben der bereits erwähnten erhöhten Pathogenanfälligkeit der Mutante *ein2-1* ebenso verringerte Symptome nach Infektion mit virulenten Stämmen von *P. syringae* und *X. campestris* beobachtet wurden (Bent *et al.*, 1992).

Während der ET-Signaltransduktion aktiviert EIN2 als positiver Regulator den Transkriptionsfaktor EIN3, welcher zur transkriptionellen Aktivierung ET-induzierbarer Gene, wie z. B. des Transkriptionsfaktors *ERF1* (*E*THYLENE *R*ESPONSE *F*ACTOR1) führt. Die Tatsache, dass *ERF1* durch JA koreguliert wird und sowohl ET als auch JA zur *ERF1*-Genexpression notwendig sind, deutet auf die synergistische Nutzung von Signaltransduktionskomponenten in JA- und ET-abhängigen Signalwegen (Lorenzo *et al.*, 2003; Guo & Ecker, 2004; Stepanova & Alonso, 2005). In Analysen mit *ERF1*-überexprimierenden *Arabidopsis*-Linien wurde gezeigt, dass *ERF1* die Expression von zwei Gruppen JA-induzierbarer Gene differenziell reguliert. Während die Expression von Genen, die in der Pathogenabwehr involviert sind durch *ERF1* positiv reguliert wird, scheint die Genexpression der nach Verwundung induzierten Gene durch *ERF1* supprimiert zu werden (Lorenzo *et al.*, 2003). Durch die Identifizierung des bHLHZIP (*b*asic *h*elix-*l*oop-*h*elix-*l*eucine *z*ipper)-Transkriptionsfaktors *AtMYC2* wurde die Beteiligung einer weiteren Komponente in der JA-vermittelten Signaltransduktion gezeigt, welche jedoch ein zu *ERF1* antagonistischen Effekt in der JA-abhängigen Genexpression hat (Lorenzo *et al.*, 2004). *ERF1* und *AtMYC2* stellen daher Komponenten der differentiellen Regulation JA/ET-abhängiger Gene dar, die in Abhängigkeit vom auslösenden Stimulus, d. h. Verwundung oder Pathogenstress eine jeweils effiziente Abwehrreaktion in der Pflanze auslösen.

1.6 „Cross-talk“ der unterschiedlichen Signaltransduktionswege

Die Untersuchung zahlreicher Pflanze-Pathogen-Interaktionen, unter Nutzung bekannter Signaltransduktionsmutanten in *Arabidopsis*, liefern zunehmend Hinweise, dass die bekannten SA, JA- und ET-abhängigen Signalwege weniger unabhängig als vielmehr in einem komplexen Netzwerk durch positive und negative Modulatoren reguliert werden, was letztendlich zu einer effizienten Abwehr der Virulenzstrategie des eindringenden Pathogens führt. Ein Beispiel für die biologische Signifikanz dieses Modells stellt die überwiegend durch SA-abhängige Signalwege bestimmte Abwehr gegen avirulente *P. syringae* pv *tomato* (DC3000) dar. Im Gegensatz zum Wildtyp ist in infizierten *Arabidopsis nahG*-Linien die SA-Akkumulation und SA-Signaltransduktion unterdrückt, während die JA-Akkumulation und JA-Signaltransduktion hochreguliert ist (Spoel *et al.*, 2003). Diese Beobachtung ist ein Hinweis dafür, dass die nach *P. syringae* (DC3000)-Infektion induzierte weniger effiziente JA-abhängige Abwehr durch SA-Akkumulation unterdrückt wird. Dieser Effekt wird im *npr1*-Hintergrund abgeschwächt, was auf eine Funktion von NPR1 als negativen Regulator des JA-Signals im „cross-talk“ beider Signalwege hindeutet (Spoel *et al.*, 2003). NPR1 scheint entgegen seiner erwähnten Kern-lokalisierten Funktion während der SAR nun während der Suppression des JA-Signalwegs im Zytoplasma lokalisiert zu sein. Es wird vermutet, dass zytosolisches NPR1 möglicherweise durch Interaktion mit dem SCF^{COI1}-Komplex Einfluss auf den Abbau putativ negativer Regulatoren der JA-Signaltransduktion nimmt (Devoto *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2002; Pieterse & Val Loon, 2004).

Andere Hinweise legen einen antagonistischen Effekt von JA in der SA-abhängigen Abwehr nahe. Genetische Studien der JA-Signaltransduktionsmutante *mpk4* und der Mutante *ssi2* belegen eine negative Regulation der SA-abhängigen Pathogenabwehr durch Aktivierung der JA-vermittelten Signaltransduktion (Kachroo *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2000). So wurde gezeigt, dass der Verlust der JA-regulierten Signaltransduktion in den Mutanten *mpk4* und *ssi2* eine konstitutive SA-abhängige Abwehr sowie die erhöhte Resistenz gegen biotrophe Pathogene zur Folge hat. Ein weiterer experimenteller Hinweis für diese Hypothese stellt die verstärkte SA-abhängige Abwehr nach *P. syringae*-Infektion der Coronatin-insensitiven Mutante *coi1* dar (Feys *et al.*, 1994; Kloek *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass die Virulenzfunktion des bakteriellen Phytotoxins Coronatin darin besteht, durch Unterdrückung der SA-abhängigen Abwehr in anfälligen Wirtspflanzen die JA-abhängige Signaltransduktion zu aktivieren. Die JA-vermittelten Abwehrreaktionen sind jedoch nicht in der Lage eine Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen zu verhindern (Reymond & Farmer, 1998; Nomura *et al.*, 2005). In Analogie zu *Arabidopsis* ist in Tomate ebenso eine Inhibierung der SA-vermittelten Abwehr durch Aktivierung der JA-abhängigen Signaltransduktion beschrieben worden (Zhao *et al.*, 2003).

Neuere Untersuchungen deuten auch auf eine Funktion des Transkriptionsfaktors WRKY70 im Netzwerk der SA- und JA/ET-regulierten Signaltransduktion (Li *et al.*, 2004). Die durch Pathogeninfektion veränderte zelluläre SA- bzw. JA-Konzentration führt zu einer differentiellen

WRKY70-Expression, wobei hohe SA-Konzentrationen eine Aktivierung bzw. hohe JA-Konzentrationen eine Suppression der WRKY70-Genexpression bewirken (Li *et al.*, 2004).

1.7 Nichtwirtsresistenz

Die Immunität einer gesamten Pflanzen-Spezies gegen die meisten potentiell phytopathogenen Mikroorganismen wird als Nichtwirtsresistenz bezeichnet. Diese Form der Resistenz beschreibt die Unfähigkeit einer gesamten Pathogen-Spezies eine bestimmte Pflanzen-Spezies zu kolonisieren. Die Nichtwirtsresistenz bildet die in der Natur vorherrschende Form der Resistenzausprägung, welche u. a. dazu führt, dass die Besiedlung einer Pflanze durch ein Pathogen in ihrer natürlichen Umgebung zumeist die Ausnahme darstellt (Heath, 2000). Charakteristisch für die Nichtwirtsresistenz ist ihre relativ hohe genetische Stabilität, welche darin Ausdruck findet, dass selten Veränderungen im Wirtsspektrum von Phytopathogenen beobachtet werden (Heath, 2000; Kamoun, 2001). Es wird auch angenommen, dass im Gegensatz zur der relativ leicht durch Mutationen zu überwindende *R*-Gen-vermittelten Resistenz, die durch Multigenizität gekennzeichnete Nichtwirtsresistenz eine beständigere Resistenz darstellt (Heath, 1996; 2000).

Im Vergleich zu den gut untersuchten Mechanismen der *R*-Gen-vermittelten Wirtsresistenz sind die molekularen Mechanismen der Nichtwirtsresistenz noch weitestgehend unbekannt. Dennoch wurde durch die Identifizierung neuer Komponenten ein Beitrag zum Verstehen der molekularen Grundlagen der Nichtwirtsresistenz geleistet (Jones & Takemoto, 2004; Abramovitch & Martin, 2004; Nürnberger & Lipka, 2005). Analysen der Genexpression während der Ausprägung von sowohl *R*-Gen-spezifischer Wirtsresistenz als auch der Nichtwirtsresistenz lieferten Hinweise für signifikante Ähnlichkeiten der Genexpressionsmuster, deuteten aber auch auf Gene mit einer differentiellen Expression in Abhängigkeit von der Pathogen-Interaktion (Tao *et al.*, 2003; Huitema *et al.*, 2003). Unterschiedliche experimentelle Befunde demonstrieren auch die Beteiligung von bereits für *R*-Gen-vermittelte Resistenzmechanismen beschriebene Faktoren.

So belegten Untersuchungen von *nahG*-Linien in *Arabidopsis*, dass SA eine Rolle in der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen den Rostpilz *Uromyces vignae* spielt (Mellersh & Heath, 2003). An dieser Stelle ist jedoch auch zu erwähnen, dass der Verlust der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis nahG*-Linien gegen *P. syringae* pv *phaseolicola* neueren Untersuchungen zufolge nicht durch den Verlust der SA-Akkumulation sondern durch SA-Abbauprodukte, wie Catechol verursacht wird (Lu *et al.*, 2002; Van Wees & Glazebrook, 2003).

„Gene-silencing“-Studien in *N. benthamiana* verdeutlichten auch die Beteiligung des Ubiquitin-Ligase-assoziierten Proteins SGT1 in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. syringae* und liefern Hinweise auf eine mögliche generelle Funktion von SGT1 in der Pathogenresistenz hin (Peart *et al.*, 2002).

Desweiteren scheint HSP90, dessen Funktion in der R-Proteinstabilität bereits erwähnt wurde, eine Funktion in der Nichtwirtsresistenz von *Nicotiana benthamiana* gegen *Pseudomonas cichorii* zu haben (Kanzaki *et al.*, 2003).

Durch pharmakologische Inhibierung der Aktin-Polymerisierung wurde ebenso eine Funktion des Zytoskeletts in der Nichtwirtsresistenz in Gerste gezeigt (Kobayahshi *et al.*, 1997). Die kombinierte Inhibierung von Aktin-Funktion und EDS1-Aktivität führte zum Verlust der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen Weizenmehltau (Yun *et al.*, 2003).

Untersuchungen von Bais *et al.* (2005) demonstrierten eine Funktion für die von der Wurzel abgesonderten antimikrobiellen Verbindungen in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *P. syringae*. Es wurde gezeigt, dass virulente *P. syringae* pv *tomato* DC3000 in der Lage sind neben oberirdischen Pflanzenteilen auch Wurzeln zu infizieren. Es wird davon ausgegangen, dass diese Fähigkeit virulenter Pathogene in Verbindung mit der Entwicklung von Mechanismen zur Tolerierung und/oder Inaktivierung von antimikrobiellen Wurzelexudaten steht. Nichtwirtspathogene scheinen dagegen nicht dazu befähigt zu sein und werden daher durch diese Barriere effizient an der Besiedlung der Pflanze gehindert.

Die Supprimierung der Expression von *Arabidopsis-NHO1* (*NONHOST RESISTANCE1*) durch *P. syringae* pv *tomato* DC3000 verdeutlicht ebenso, dass virulente *P. syringae*-Stämme aktiv Mechanismen der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* unterdrücken können. Die Beteiligung von NHO1 an der basalen Abwehr gegen *P. syringae* zeigt desweiteren, dass die Notwendigkeit einer zumindest partiellen Überlappung von Mechanismen, welche zur R-Gen-vermittelten Resistenz sowie zur Nichtwirtsresistenz führen, besteht (Lu *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2003; Thordal-Christensen, 2003; Mysore & Ryu, 2004).

Genetische Analysen der Pathogenresistenz in *Arabidopsis* belegen aber auch die Existenz von Mechanismen, die spezifisch für die Nichtwirtsresistenz sind und daher keinen Einfluss auf die Wirtsresistenz haben. Beispielsweise ist hier *PEN1* (*PENETRATION1*; 1.7.1) zu erwähnen, welches an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) beteiligt ist, aber scheinbar keinen Einfluss auf die R-Gen-vermittelte Resistenz hat (Collins *et al.*, 2003).

Die Identifizierung von unterschiedlichen Komponenten und Mechanismen, die in der Nichtwirtsresistenz involviert sind, verdeutlicht die Beteiligung von diversen Prozessen an der Ausprägung der Resistenz gegen Nichtwirtspathogene und bestätigt das von Heath (2000) vorgeschlagene Modell einer auf multiplen Faktoren und unterschiedlichen Ebenen basierten Nichtwirtsresistenz.

Eine Klassifizierung der Nichtwirtsresistenz nach qualitativen Kriterien wurde kürzlich von Mysore & Ryu (2004) vorgeschlagen. Demnach stellen die Nichtwirts-Interaktionen mit phytopathogenen Bakterien, Pilzen und Oomyzeten, welche durch das Fehlen sichtbarer Symptome, wie HR gekennzeichnet sind, den Typ I dar. Die Nichtwirts-Interaktionen, welche mit einer sichtbaren HR-

Ausprägung assoziiert sind, bilden den Typ II. Es wird davon ausgegangen, dass in erster Linie präformierte pflanzliche Barrieren in Interaktionen des Typs I ein Eindringen der meisten Pathogene verhindern kann, welcher daher wahrscheinlich den verbreitetsten Typ der Nichtwirtsresistenz darstellt (Mysore & Ryu, 2004). Jedoch kann es auch in einer zweiten Ebene der Abwehr zur Aktivierung von Abwehrmechanismen, wie z. B. *PR*-Genexpression kommen, welche durch Erkennung genereller Elicitoren (PAMPs) ausgelöst werden und ohne sichtbare Symptome verlaufen können (Lu *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2003; Mysore & Ryu 2004; Nürnberger & Lipka; 2005). Ist das Pathogen in der Lage, die präformierte und induzierte Abwehr zu überwinden, können die von Pilzen und Oomyzeten sekretierten Proteine bzw. die durch das TTSS bakterieller Pathogene injizierten AVR-Proteine von der Pflanze erkannt werden und zur Auslösung der HR führen (Mysore & Ryu 2004). Beispielsweise löst das extrazelluläre Protein INF1, ein Elicitin des Oomyzeten *P. infestans*, eine HR im Nichtwirt *N. benthamiana* sowie in den meisten anderen *Nicotiana*-Spezies aus (Kamoun *et al.*, 1998; Huitema *et al.*, 2005). Ebenso wurde gezeigt, dass funktionelles *Hrp*-TTSS (*Hypersensitive response and pathogenicity*-TTSS) für phytopathogene Bakterien notwendig ist, um eine HR in verschiedenen Nichtwirtspflanzen auszulösen (Alfano & Collmer, 2004).

Studien der Nichtwirtsresistenz gegen Oomyzeten der Gattung *Phytophthora* deuten darauf hin, dass wahrscheinlich multiple Ebenen von „Gen-für-Gen“-Interaktionen die molekulare Grundlage der Nichtwirtsresistenz bilden (Kamoun, 2001). In dem dabei vorgeschlagenen Modell wird weniger davon ausgegangen, dass *R*-Gen-Allele sich kurzfristig durch Adaption an einzelne Pathogene entwickelt haben als dass eine lange koevolutionäre Entwicklung von Resistenz-Allelen und Pathogenpopulationen zu *R*-Gen-Loci geführt haben, welche in ihrer Summe ein breites Resistenzspektrum vermitteln (Kamoun, 2001).

1.7.1 Komponenten der Nichtwirtsresistenz gegen *Blumeria graminis*

Durch unabhängige Mutanten-Durchmusterungen in *Arabidopsis* konnten mehrere *pen* (*penetration*)-Mutanten isoliert werden, die in der Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau beeinträchtigt sind. Bisher wurden drei unabhängige Mutanten-Loci (*pen1* - *pen3*) mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp bzw. mit einer erhöhten Penetrations-Häufigkeit nach *B. graminis*-Infektion isoliert. Es wird angenommen, dass PEN1, PEN2 und PEN3 die Hauptelemente der sogenannten Penetrationsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze darstellen. Die Identifizierung der mit den *pen*-Mutationen korrespondierenden Gene führte zu Faktoren, die in Mechanismen involviert sind, deren Beteiligung an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* bisher nicht bekannt war.

Durch die Identifizierung von PEN1 wurde erstmals eine Beteiligung von Vesikelfusionsereignissen an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* gezeigt (Collins *et al.*, 2003). *PEN1* kodiert für das plasmamembranlokalisierte *Arabidopsis*-Syntxin (At)SYP121

(Sanderfoot *et al.*, 2000). Syntaxine gehören zur Familie der SNARE (Synaptosom-assoziierte Protein-Rezeptor)-Proteine, welche in Membranfusionsprozessen beteiligt sind. PEN1 bildet als t (*target-associated*)-SNARE-Protein einen Komplex mit einem ebenfalls membranständigen SNA (Synaptosom-assoziierten)-Protein, welcher als Rezeptor für v (*vesicel-associated*)-SNAREs fungiert und die Fusion von Vesikel- und Zielmembran ermöglicht (Xue & Zhang, 2002; Collins *et al.*, 2003; Pratelli *et al.*, 2004). Es wurde gezeigt, dass PEN1 Pathogen-induziert in den Zellwandauflagerungen unterhalb der *B. graminis*-Penetrationsstellen lokalisiert ist und daher wahrscheinlich durch Polarisierung von Sekretionsereignissen eine Funktion in der Zellperipherie-assoziierten Abwehrreaktion hat (Assaad *et al.*, 2004).

Desweiteren wurde eine funktionelle Homologie zu dem bereits erwähnten ROR2 aus Gerste gefunden, welches zur Ausprägung der *mlo*-vermittelten basalen Penetrationsresistenz in Gerste notwendig ist. Die homologe Funktion beider Syntaxine liefert daher einen Hinweis für eine gemeinsame Komponente der Nichtwirtsresistenz sowie der basalen Penetrationsresistenz in *Arabidopsis* und Gerste (Collins *et al.*, 2003).

Eine Mutation in *PEN2* hingegen führt neben einer erhöhten Anfälligkeit für Gerstemehltau auch zu einer Beeinträchtigung der Resistenz gegen weitere biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Pathogene (Lipka *et al.*, 2005; diese Arbeit). *PEN2* ist eine Familie-1- β -Glykosyl-Hydrolase, welche die Spaltung glykosidischer Bindungen zwischen Glukoseresten und einem Substrat katalysiert. Ein spezifisches Merkmal von *PEN2* stellt die C-terminale putativ membranassoziierte Verlängerung dar, welche für die *PEN2*-Funktion in der Pathogenabwehr essentiell ist (Lipka *et al.*, 2005). Desweiteren deuten genetische Studien unterschiedlicher Signaltransduktionskomponenten auf eine weitere, vom EDS1-PAD4-SAG101-Komplex abhängige Ebene in der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehлтаupilze hin (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005).

Die Mutante *pen3* zeigt neben der beeinträchtigten Nichtwirtsresistenz gegen *B. graminis* auch einen veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach Infektion mit dem Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* sowie nach *P. infestans*-Infektion (Stein *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu scheint die Mutation *pen3* zu Resistenz gegen den virulenten *Arabidopsis*-Mehltau *Erysiphe cichoracearum* zu führen (Stein *et al.*, 2006). Die Identifizierung des in *pen3* mutierten Locus zeigte, dass *PEN3* für das ABC (ATP-binding cassette)-Transporterprotein PDR8 (PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8) kodiert (Stein *et al.*, 2006). ABC-Transporter katalysieren unterschiedliche zelluläre Transportvorgänge, z. B. von Schwermetallen, Lipiden und toxischen Komponenten unter ATP/GTP-Hydrolyse (Martinoia *et al.*, 2002). Kürzlich wurde der ABC-Transporter CER5 (ECERIFERUM5) aus *Arabidopsis* isoliert, welcher im epidermalen Lipid-Transport von langkettigen Fettsäurederivaten (Wachsen) zur Kutikula involviert ist (Pighin *et al.*, 2004). Ein möglicher veränderter Phenotyp der *cer5*-Mutante nach Pathogeninfektion ist bisher jedoch noch nicht beschrieben worden.

1.7.2 Das Nichtwirtspathosystem *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora infestans*

Als geeignetes experimentelles System für Studien der Resistenzen gegen *Phytophthora*-Pathogene hat sich zunehmend die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt (Huitema *et al.*, 2004). Bisher sind zwei *Phytophthora*-Spezies bekannt, *P. brassicae* und *P. cinnamomi*, welche in der Lage sind, *Arabidopsis* erfolgreich zu besiedeln (Roetschi *et al.*, 2001; Si-Ammour *et al.*, 2003; Robinson & Cahill, 2003). Andere *Phytophthora*-Spezies, wie z. B. *P. infestans* können *Arabidopsis* nicht kolonisieren oder Krankheit in *Arabidopsis* auslösen und stellen daher Nichtwirtspathogene dar (Huitema *et al.*, 2003; Takemoto *et al.*, 2003). Das Oomyzeten-Phytopathogen *P. infestans* ist als Erreger der Kraut- und Knollenfäule der *Solanaceae*n Kartoffel und Tomate beschrieben worden und ist trotz der morphologischen Ähnlichkeit phylogenetisch nicht mit Pilzen sondern mit Braun- und Kieselalgen verwandt (Fry & Godwin, 1997; Baldauf *et al.*, 2000). *P. infestans* wird den hemibiotrophen Pathogenen zugeordnet, d. h. zu Beginn der Infektion bildet er Ernährungsorgane (Haustorien-ähnliche Strukturen) in lebenden Wirtszellen um sich mit pflanzlichen Nährstoffen zu versorgen (Perfect & Green, 2001; Mendgen & Hahn, 2002). In der späteren nekrotrophen Phase der Infektion kommt es zu einer Ausbreitung der *P. infestans*-Hyphen über den Bereich der Primärinfektion hinaus und infolgedessen zum Absterben des infizierten Wirtsgewebes.

Grundlagen der Zytologie sowie der molekularen Mechanismen in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen *P. infestans* sind bisher hauptsächlich durch Kamoun *et al.* beschrieben worden. Demnach ist diese Nichtwirts-Interaktion durch eine HR-assoziierte Abwehrreaktion sowie durch Aktivierung des JA-abhängigen Signaltransduktionswegs gekennzeichnet (Huitema *et al.*, 2003). So deuten Genexpressionsanalysen des Pathosystems *A. thaliana* - *P. infestans* auf eine früh induzierte Expression des JA-abhängigen Markergens *PDF1.2* hin. Ebenso wurde eine Induzierung SA-abhängiger *PR*-Gene in späteren Phasen der Infektion beobachtet, was möglicherweise ein Hinweis für eine untergeordnete Funktion der SA-vermittelten Abwehr in der frühen Interaktion mit *P. infestans* ist (Huitema *et al.*, 2003).

1.8 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war zum einen die Etablierung und Charakterisierung des Nichtwirtspathosystems *Arabidopsis thaliana* – *Phytophthora infestans* und zum anderen die Identifizierung von Faktoren, welche eine Funktion in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz dieses Pathosystems haben.

Ausgehend von der *A. thaliana*-Mutante *pen2*, welche einen veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach Infektion mit *B. graminis* f. sp. *hordei* zeigt, sollten die zellulären Grundlagen in der Interaktion mit *P. infestans* sowie die dabei beteiligten pflanzlichen Abwehrreaktionen untersucht werden. Um weitere an der Resistenzausprägung in dieser Nichtwirts-Interaktion beteiligte Komponenten zu isolieren, erfolgte eine chemische Mutagenese von *pen2*-Samen. In einer folgenden Mutanten-Durchmusterung sollten sowohl Linien mit einer Verstärkung als auch Linien mit einer Abschwächung des *pen2*-abhängigen Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion isoliert und charakterisiert werden. Erste Kartierungsexperimente sollten Aufschluss über die Position der Mutanten-Loci im *A. thaliana*-Genom geben. Die Analyse des Phänotyps unterschiedlicher Signaltransduktionsmutanten im *pen2*-Hintergrund stellte einen weiteren Ansatz zur Analyse des Nichtwirtspathosystems dar.