

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr .....	1
1.2 Pathogenerkennung .....	3
1.3 Rassenspezifische Resistenz .....	4
1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	4
1.5 Das Modellsystem aus einer Petersiliezellensuspensionskultur und Peptidelicitoren... 8	
1.6 Ziele der Arbeit .....	10
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide .....	11
2.2 Kultivierung, Behandlung und Aufarbeitung der Petersiliezellen und Petersilieprotoplasten.....	11
2.2.1 Gewinnung von Petersilieprotoplasten .....	11
2.2.2 Elicitorbehandlung der Petersiliezellen.....	11
2.2.3 Bestimmung der Phytoalexinakkumulation im Kulturmedium .....	12
2.2.4 Proteinextraktion aus Petersiliezellen .....	12
2.2.5 Transiente Transformation von Petersilieprotoplasten .....	12
2.3 Molekularbiologische Arbeiten .....	13
2.3.1 Bakterienstämme, Phagen, Plasmide .....	13
2.3.2 Reinigung von Plasmid-DNA .....	14
2.3.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	15
2.3.4 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten .....	15
2.3.5 Klonierung von PCR-Produkten .....	15
2.3.6 DNA-Sequenzierung .....	15
2.3.7 Computerunterstützte Auswertung von Sequenzdaten.....	15
2.3.8 Punktmutagenese .....	16
2.3.9 Konstruktion einer gerichteten cDNA-Bank für das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	16
2.3.10 Southernblots mit genomischer DNA .....	17
2.3.11 Screening einer Petersilie- $\lambda$ -ZAP <sup>TM</sup> II-cDNA-Bank .....	18
2.3.12 Bakterielle Expression von <i>MPK1</i> , 2, 3 und 4.....	18
2.4 Proteinanalytische Methoden .....	19
2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	19
2.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.4.3 Westernblots .....	19
2.5 Antikörperproduktion.....	20
2.5.1 Peptidsynthese.....	20
2.5.2 Gewinnung der Antiseren.....	20
2.6 In-Gel-MBP-Kinasenachweis.....	21
2.7 Immunpräzipitations-Kinasenachweis.....	21
2.8 Immunlokalisierung .....	23
2.9 Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	23

2.9.1 Hefestämme und Plasmide.....	23
2.9.2 Medien und Wachstumsbedingungen für Hefen.....	24
2.9.3 Herstellung des Plasmids pBD-HA.M1.....	25
2.9.4 Hefetransformation.....	25
2.9.5 Screening mit MPK1.....	25
2.9.6 Plasmidpräparation aus Hefe.....	26
2.9.7 Proteinextraktion aus Hefe.....	26
2.10 Analyse der Reporterexpression im Protoplastensystem.....	27
2.10.1 Proteinextraktion.....	27
2.10.2 Bestimmung der LUC-Aktivität.....	27
2.10.3 Bestimmung der GUS-Aktivität.....	27
2.10.4 Errechnung der normierten GUS-Aktivität.....	27

### **3 Ergebnisse.....28**

3.1 Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Petersiliezellen.....	28
3.1.1 Nachweis elicitorresponsiver Proteinkinasen mittels In-Gel-MBP-Kinaseversuchen.....	28
3.1.2 Identifizierung der elicitorresponsiven Kinasen als MAPKs.....	29
3.1.3 Immunpräzipitationsexperimente mit Antiseren gegen Medicago MAPKs.....	30
3.1.4 Westernblot-Analyse von Petersilieproteinen mit M7-Antiserum.....	31
3.2 Signalspezifität der MAPK-Aktivierung.....	31
3.3 Einordnung der MAPKs in die Elicitorsignal-transduktionskette.....	32
3.3.1 Einfluß des Ionenkanalinhibitors A9C auf die MAPK-Aktivierung.....	32
3.3.2 Einfluß des Polyenantibiotikums Amphotericin B auf die MAPK-Aktivität.....	33
3.3.3 Einfluß des NADPH-Oxidaseinhibitors DPI auf die MAPK-Aktivierung.....	34
3.3.4 Immunlokalisierung der elicitorresponsiven MAPK mit M7-Antiserum.....	34
3.3.5 Einfluß von Inhibitoren der MAPK-Kaskade auf die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs und die Phytoalexinproduktion.....	35
3.4 Klonierung und Charakterisierung 5 verschiedener Petersilie-MAPK-cDNAs.....	36
3.4.1 Screenen einer Petersilie-cDNA-Bank mit einer <i>MMK1</i> - und einer <i>MMK4</i> -Sonde.....	36
3.4.2 Analyse der Sequenzen der MAPK-cDNAs.....	37
3.4.3 Southern-Analyse genomischer DNA mit <i>MPK1</i> -, <i>MPK2</i> - und <i>MPK3</i> -Sonden.....	40
3.4.4 Expression von <i>MPK1</i> , <i>MPK2</i> , <i>MPK3</i> und <i>MPK4</i> in <i>E. coli</i> .....	40
3.4.4.1 Bestimmung der Kinaseaktivität des rekombinanten MPK1.....	41
3.4.5 Kreuzreaktion des M7- und des M11-Serums mit den rekombinanten Kinasen.....	42
3.4.6 Produktion von Antikörpern gegen N- und C-terminale Peptide der Kinasen MPK1, 3 und 4 .....	42
3.4.7 Kreuzreaktion der Antiseren mit den rekombinanten Kinasen und mit Petersilieproteinen ..	43
3.4.8 Immunpräzipitationsexperimente mit den Seren P82, P97, P37 und P38.....	44
3.5 Suche nach Interaktionspartnern von MPK1 mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid- Systems.....	46
3.5.1 Herstellung einer Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank aus Petersilie-mRNA.....	47
3.5.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Screen mit <i>MPK1</i> .....	48
3.5.2.1 Kontrollen zur Eignung des pBD-HA.M1-Konstrukts für einen Hefe-Zwei-Hybrid Screen .....	48
3.5.2.2 Ergebnis des Screens.....	49
3.5.2.3 Analyse der Sequenzen der Klone <i>2H1</i> und <i>2H4</i> .....	50
3.6 Transiente Überexpression von <i>MPK1</i> , 2, 3 und 4 in Petersilieprotoplasten.....	51
3.6.1 Konstrukte zur Überexpression aktiver und inaktiver MAPK-Varianten.....	51
3.6.2 Akkumulation von MPK1:HA in transient transformierten Petersilieprotoplasten.....	52

3.6.3 Kotransformationsexperimente mit MAPK-Varianten .....	53
3.6.4 Überexpression einer konstitutiv aktiven Variante der humanen MEK1 .....	56
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>57</b>
4.1 Die Aktivierung von MAPKs in der pflanzlichen Pathogenabwehr.....	57
4.2 Die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ist ein rezeptorvermittelter Prozeß .....	60
4.3 Einordnung der elicitorresponsiven MAPKs in die Elicitorsignalkette.....	61
4.4 Die Genfamilie der MAPKs in Petersilie.....	62
4.5 Immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven Kinasen .....	63
4.6 Elicitorstimulierter Kerntransport von MPK3.....	64
4.7 Eignung von Proteinkinaseinhibitoren für die funktionelle Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs.....	66
4.8 Kotransformationsexperimente .....	66
4.9 Identifizierung zusätzlicher Signalkomponenten durch einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen .....	71
4.10 Ausblick .....	72
<b>5 Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>75</b>
<b>7 Anhang.....</b>	<b>98</b>

## Abkürzungen

2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
4-MUG	4-Methylumbeliferylglucuronid
A9C	Anthracen-9-carbonsäure
Abb.	Abbildung
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
ATP	Adenosintriphosphat
avr-Gen	Avirulenzgen
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
b-ZIP	basischer "Leucin-Zipper"
Cam <sup>r</sup>	Chloramphenikolresistenz
CaMV	"cauliflower mosaik virus"
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	Diphenyliodonium
DTT	Dithiotreithol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EREB-	"ethylen response element binding"-
ERK	"extracellular signal-regulated protein kinase kinase"
Fmoc-	Fluoren-9-yl-methoxycarbonyl-
GUS	Glucuronidase
h	Stunden
HEPES	N-2-(Hydroxyethyl)piperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPLC	"high-performance-liquid-chromatoraphy"
HR	hypersensitive Reaktion
IC <sub>50</sub>	Inhibitorkonzentration für eine 50%ige Inhibierung
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
ISR	systemisch induzierte Resistenz
kDa	Kilodalton
KLH	"key limpet hemocyanin"
LUC	Luciferase

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK-Kinase
MAPKKK	MAPKK-Kinase
MBP	Myelin-assoziiertes basisches Protein
MEK	“mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase kinase“
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minuten
MRE	“MYB-response element“
NADPH	β-Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pfu	Plaue-bildende Einheiten
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Polyvinylpyrrolidon
PR-Protein	“pathogenesis-related“-Protein
pv.	Pathovar
R-Gen	Resistenzgen
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
S/T-Proteinkinase	Serin/Threonin-Proteinkinase
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Gelelektrophorese
SV40	Simian Virus 40
TPA	12-O-Tetradecanylphorbol-13-acetat
TMV	Tabak-Mosaikvirus
Tricine	N-tris[Hydroxymethyl]methylglycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid