

1 Einleitung

1.1 Mechanismen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Pflanzen müssen wie alle Lebensformen ständig auf Veränderungen in ihrer Umwelt reagieren. Deshalb besitzen sie Sensoren, mit denen sie für sie relevante Umweltparameter erfassen, Signalverarbeitungs- und Weiterleitungssysteme, die Informationen integrieren, beurteilen und an Effektorstrukturen vermitteln, und Antwortprogramme, die es den Pflanzen ermöglichen, auch unter Extrembedingungen zu überleben. Eine derartige Extremsituation stellt für Pflanzen der Befall mit pathogenen Mikroorganismen dar. Durch Eingriffe in den pflanzlichen Stoffwechsel, einen kontinuierlichen Entzug von Nährstoffen oder die Produktion von Toxinen können phytopathogene Bakterien, Pilze, Viren und Viroide den Tod oder zumindest eine deutliche Schwächung und damit die Verzögerung von Wachstum und Entwicklung der befallenen Pflanze bewirken. Vor allem Kulturpflanzen sind einem hohen Pathogendruck ausgesetzt, da ihr Anbau in Monokulturen die Ausbreitung und Adaptation von Schadorganismen begünstigt und weil ihre Widerstandsfähigkeit gegen Krankheiten im Vergleich zu Wildformen oftmals geschwächt ist. Dennoch sind Pflanzen gegen einen Befall durch die meisten möglichen Phytopathogene resistent. Diese Nichtwirts- oder Grundresistenz stützt sich auf induzierbare und passive, präformierte Schutzmechanismen (Prell, 1996; Kombrink und Somssich, 1995).

Präformierte Schutzmechanismen können mechanischer oder chemischer Art sein. Barrieren wie pflanzliche Zellwände oder die Wachsschichten der Kutikula verhindern das Eindringen von Mikroorganismen in die Pflanze (Ride 1983). Antibiotische Produkte des Sekundärstoffwechsels, die in Vakuolen gespeichert und in Zellwände eingelagert werden, unterdrücken mikrobielles Wachstum (Mansfield, 1983; Maher *et al.*, 1994; Osbourn, 1996). Gelangen dennoch Mikroorganismen in die Pflanze, so werden sie in der Regel durch die Pflanze erkannt, und die Auslösung einer zeitlich und räumlich genau definierten pflanzlichen Abwehrantwort verhindert ihr Wachstum und ihre Vermehrung (Scheel, 1992; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998). Dieses induzierte Abwehrprogramm setzt sich aus einer Vielzahl von Einzelreaktionen zusammen und wird über ein bisher nur unvollständig verstandenes Signalsystem ausgelöst. Da eine Pflanzenart auf den Befall mit unterschiedlichen Pathogenen oftmals mit den gleichen Abwehrantworten reagiert, ist in den meisten Fällen unbekannt, welche Abwehrreaktionen in einer bestimmten Pflanze-Pathogen-Interaktion für die Resistenz notwendig sind und wo Redundanz besteht. Die einzelnen Komponenten der komplexen pflanzlichen Antwort sind jedoch bei verschiedenen Pathogenen unterschiedlich wirksam und für die Bekämpfung eines bestimmten Mikroorganismus wäre in den meisten Fällen nicht das gesamte Spektrum der induzierten Abwehrantwort notwendig (Glazebrook und Ausubel, 1994; Thomma *et al.*, 1998; Kamoun *et al.*, 1999; Maleck und Dietrich, 1999).

Eine der schnellsten Reaktionen, die bei Infektion von Pflanzengewebe zu beobachten ist, ist die massive Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie z. B. OH⁻- und O₂⁻-Radikalen und H₂O₂. Dieser als "oxidative burst" bezeichnete Prozeß weist einige Ähnlichkeiten mit dem "respiratory burst" in Säugerleukocyten auf und geht nach weit

verbreiteter Auffassung ebenfalls auf die primäre Bildung von O₂⁻-Ionen durch eine NADPH-Oxidase zurück (Baker und Orlandi, 1995; Lamb und Dixon, 1997). Verschiedene Gene mit Homologien zur katalytischen Untereinheit der Säuger-NADPH-Oxidase sind in der Vergangenheit kloniert worden, doch konnte für die entsprechenden Genprodukte bisher weder NADPH-Oxidaseaktivität noch eine andere Funktion innerhalb des „oxidative burst“ nachgewiesen werden (Keller *et al.*, 1998; Torres *et al.*, 1998). Der „oxidative burst“ ist ein wichtiges Element der pflanzlichen Abwehrantwort und dient vermutlich u. a. dem Abtöten eingedrungener Schadorganismen und der Vernetzung von Zellwandbestandteilen (Peng und Kuc, 1992; Brisson *et al.*, 1994). Eine zunehmende Anzahl von Arbeiten deutet jedoch auch auf eine zentrale Rolle des „oxidative burst“ in der Signaltransduktion und bei der Auslösung der Resistenzantwort hin (Lamb und Dixon, 1997; Scheel, 1998).

Bei Pilzinfektion und Verwundung wird oftmals direkt an der Infektionsstelle eine Verstärkung der pflanzlichen Zellwände durch Auflagerung von Kallose beobachtet. Die Bildung dieser zusätzlichen physikalischen Barriere geht auf die allosterische Aktivierung einer β -(1-3)-Glucansynthase zurück, die konstitutiv im Plasmalemma vorhanden ist (Kauss *et al.*, 1989). Ebenfalls auf die Infektionsstelle begrenzt ist die hypersensitive Reaktion (HR). Dieses zentrale Element in der Abwehrreaktion vieler Pflanzen bewirkt das Absterben von Zellen in einem begrenzten Bereich rund um die Infektionsstelle und entzieht so dem Pathogen die Nahrungs- und Existenzgrundlage (Greenberg, 1997). Im Gegensatz zum Zelltod, der bei erfolgreicher Kolonisation einer Pflanze durch ein Pathogen beobachtet wird und ein Krankheitssymptom darstellt, ist der mit der HR assoziierte Zelltod ein aktiver Prozeß der Pflanzenzelle und wird aus diesem Grunde als programmierter Zelltod bezeichnet (Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997; Heath, 1998).

In einem begrenzten Bereich um die Infektionsstelle herum wird die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert bzw. reprimiert (Bowles, 1990; Scheel, 1991; Hammond-Kosack und Jones, 1996; Somssich und Hahlbrock, 1998). Einige dieser pathogenresponsiven Gene kodieren für Enzyme des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, was dazu führt, daß in vielen Pflanzen der allgemeine Phenylpropanstoffwechsel und die Synthese von Phenolen, wie z. B. den Vorstufen des Lignins hochreguliert wird (Dixon und Paiva, 1995; Weisshaar und Jenkins, 1998). Außerdem akkumulieren in vielen Pflanzen als Antwort auf Pathogenbefall und infolge der Expression der entsprechenden Enzyme antibiotisch wirkende Produkte des Sekundärstoffwechsels, sogenannte Phytoalexine (Smith, 1996). Neben Produkten, die auf den allgemeinen Phenylpropanstoffwechsel zurückgehen, wie z. B. Cumarine, Stilbene und Flavanole, können dies u. a. Alkaloide, Saponine oder Terpene sein (Bailey and Mansfield, 1982). Eine andere Gruppe von Genen, deren Transkription in der Pathogenantwort induziert wird, kodiert für Proteine, die unmittelbar der Zellwandverstärkung dienen. Neben Proteinen, die in die Zellwand eingelagert werden wie beispielsweise hydroxyprolinreiche Glycoproteine und glycinreiche Proteine, sind dies Peroxidasen, die eine zusätzliche Vernetzung der Zellwandbestandteile katalysieren (Kawallek *et al.*, 1995; Cassab, 1998). Ein Teil der Proteine, die nach Pathogeninfektion akkumulieren und deren Funktion nicht in allen Fällen bekannt ist, wurde unter dem Sammelbegriff PR-Proteine („pathogenesis-related“) zusammengefaßt (van Loon *et al.*, 1994; Kombrink und Somssich, 1997). Dazu

zählen u. a. hydrolytische Enzyme, wie beispielsweise β -(1-3)-Glucanasen, Proteasen und Chitinasen. Diese Enzyme akkumulieren in den pflanzlichen Vakuolen und im Apoplasten, wo sie möglicherweise pilzliche oder bakterielle Zellwände abbauen (Kombrink und Somssich, 1997). Neben diesen lokalen Reaktionen wird in vielen Pflanzen nach Infektion mit einem Pathogen eine systemische Resistenz ("systemic acquired resistance" SAR und "induced systemic resistance" ISR) in der gesamten Pflanze induziert, die gegen nachfolgende Infektionen mit verschiedenen Pathogenen immunisiert (z. B. Chitinasen und Glucanasen) (Ryals *et al.*, 1996; Van Lon, 1997; Dong, 1998).

Die Analyse der Promotorbereiche einer Vielzahl pathogenaktivierter Gene aus verschiedenen Pflanzen hat gezeigt, daß die pathogenresponsiven Promotoren bezüglich der Anzahl, Anordnung und Art der regulatorischen Elemente sehr voneinander abweichen (Somssich, 1994; Rushton und Somssich, 1998). Trotz dieser Unterschiede in der Promotorarchitektur finden sich einige typische *cis*-Elemente in den Promotoren pathogenaktivierter Gene, wie z. B. GCC-, W- und G-Boxen und MRE-ähnliche Sequenzen (Rushton und Somssich, 1998). Mit Hilfe dieser Elemente konnten DNA-bindende Proteine isoliert werden, die z. T. pflanzenspezifisch sind, wie die WRKY- und EREB-Proteine ("ethylen response element binding"), die an W- bzw. GCC-Boxen binden, z. T. aber auch in anderen Eukaryoten gefunden werden, wie MYP- und bZIP-Faktoren (Rushton und Somssich, 1998).

1.2 Pathogenerkennung

Das oben skizzierte Abwehrprogramm wird erst ausgelöst, wenn die Pflanze ein eindringendes Pathogen wahrgenommen hat. Die Pathogenerkennung ist in der Regel rezeptorvermittelt und erfolgt über Bestandteile des Pathogens oder Komponenten der pflanzlichen Zellwand, die durch die Wirkung hydrolytischer Enzyme des Pathogens freigesetzt werden (Ebel und Cosio, 1994; Hahn, 1996; Boller, 1995; Ebel und Scheel, 1997; Ebel und Mithöfer, 1998). Derartige, als Elicitoren bezeichnete Substanzen lösen z. T. nur in einzelnen Spezies, z. T. in verschiedenen Pflanzenarten in geringer Konzentration ein breites Spektrum pflanzlicher Resistenzreaktionen aus. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden in der Vergangenheit Polysaccharid-, Polypeptid-, Glycoprotein- und Lipidelicitoren gereinigt (Bostock *et al.*, 1981; Sharp *et al.*, 1984; Ricci *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1991). In der Plasmamembran einzelner Pflanzen konnten durch Bindungsstudien hochaffine Bindungsstellen für einige dieser Elicitoren nachgewiesen werden (Cosio *et al.*, 1990; Nürnberger *et al.*, 1994; Wendehenne *et al.*, 1995; Shibuya *et al.*, 1996; Hanania und Avni, 1997). Lediglich in einem Fall konnte bisher ein solcher Elicitorrezeptor bis zur Homogenität gereinigt und in der Folge kloniert werden (Mithöfer *et al.*, 1996; Umemoto *et al.*, 1997). Die Sequenz dieses klonierten Heptaglucanrezeptors aus Soja und die Eigenschaften der bisher charakterisierten Elicitorrezeptoren geben jedoch keinen Aufschluß darüber, wie durch sie das Signal zur Aktivierung der Pathogenabwehr ausgelöst wird. So gibt es bisher keine Hinweise, daß es sich bei ihnen um bekannte Rezeptortypen wie Rezeptortyrosinkinasen oder Serpentine-Rezeptoren handelt.

1.3 Rassenspezifische Resistenz

Trotz des wirkungsvollen Abwehrsystems der Pflanzen haben einzelne Pathogenarten Mechanismen entwickelt, um bestimmte Pflanzenspezies zu parasitieren. Durch Pathogenizitätsfaktoren sind sie in der Lage, die pflanzliche Abwehr auszuschalten, zu verzögern oder unschädlich zu machen (Prell, 1996). Eine solche Pflanze-Pathogen-Interaktion, die erfolgreich für das Pathogen verläuft, wird als kompatibel bezeichnet. Aufgrund der Koevolution zwischen Pathogenen und ihren Wirten existieren jedoch auch in Pflanzenarten, die suszeptibel für ein bestimmtes Pathogen sind, einzelne Sorten, die gegen bestimmte Rassen des Pathogens resistent sind. In der Regel gleicht das Muster der Abwehrantwort, das bei Vorliegen einer solchen Wirts- bzw. rassenspezifischen Resistenz beobachtet wird, dem Abwehrprogramm, das für die Nichtwirtsresistenz beschrieben wurde (Hammond-Kosack und Jones, 1996).

Die Wirtsresistenz ist vom Genotyp der Wirtspflanzensorte und der Pathogenrasse abhängig. Arbeiten von Flor über die Vererbung von Pflanzenresistenz und Pathogenvirulenz im Pathosystem Flachs/Flachsrost haben zur Aufstellung der Gen-für-Gen-Hypothese für die Beschreibung der Wirtsresistenz geführt (Flor, 1971). Dieses allgemein anerkannte Konzept besagt, daß eine Pflanze-Pathogen-Interaktion bei Vorliegen einer Grundkompatibilität nur dann inkompatibel ist, wenn das Pathogen ein Avirulenzgen (*avr*-Gen) trägt und der Wirt ein komplementäres Resistenzgen (*R*-Gen) besitzt. Die monogen determinierten Phänotypen Resistenz und Avirulenz sind in der Regel dominant, was zu der Hypothese geführt hat, daß in diesen Fällen *R*-Genprodukte Rezeptoren für *avr*-Genprodukte sind (de Witt, 1997). In der Tat konnte für einige *avr*-Genprodukte gezeigt werden, daß sie als rassenspezifische Elicitoren wirken, d. h. daß ihre Applikation in resistenten Pflanzensorten eine Resistenzantwort auslöst (van den Ackerveken *et al.*, 1992; Joosten *et al.*, 1994; Wewelsiep *et al.*, 1991; Knogge, 1996). Der Nachweis einer Rezeptorfunktion für die entsprechenden *R*-Genprodukte steht in fast allen Fällen jedoch noch aus, obwohl in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von *R*-Genen kloniert wurde (de Wit, 1997; Hammond-Kosack und Jones, 1997). Lediglich für das bakterielle *avr*-Gen *avrPto* konnte im Hefe-Zwei-Hybrid-System eine Protein-Protein-Wechselwirkung mit dem entsprechenden *R*-Gen *Pto* nachgewiesen werden (Scofield *et al.*, 1996; Tang *et al.*, 1996).

1.4 Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenabwehr

Die Signaltransduktion in der pflanzlichen Pathogenantwort wurde in der Vergangenheit vor allem genetisch in *Arabidopsis thaliana*, Gerste und Tomate und pharmakologisch in Zellsuspensionskulturen untersucht (Ebel und Scheel, 1992; Ebel und Scheel, 1997; Glazebrook *et al.*, 1997a; Ebel und Mitthöfer, 1998; Innes, 1998; Scheel, 1998). Die Ergebnisse von Mutantenscreens in *Arabidopsis*, bei denen auf Verlust oder Verminderung der *R*-Gen-vermittelten Resistenz oder Ausfall einzelner Aspekte in der Resistenzantwort selektiert wurde, deuten darauf hin, daß bereits sehr früh nach Pathogenerkennung eine Verzweigung der Signalwege erfolgt (Innes, 1998; van der

Biezen und Jones, 1998). Nur sehr wenige Mutanten zeigen einen vollständigen Verlust der Resistenz; in den meisten Fällen wird ein intermediärer Resistenzphänotyp beobachtet (Century *et al.*, 1995; Glazebrook *et al.*, 1996; Rogers and Ausubel, 1997; Glazebrook *et al.*, 1997b). Dabei sind alle bisher beschriebenen Signalmutationen Supressoren mehrerer, aber nicht aller *R*-Gene. Die *ndr1*-Mutation ("no disease resistance") suprimiert beispielsweise die *R*-Gene *RPM1*, *RPS2* und *RPS5*, die alle putative "leucine zipper" in ihrem N-Terminus besitzen (Century *et al.*, 1995). Die Mutation beeinträchtigt jedoch nicht die Funktion von *R*-Genen, die stattdessen im N-Terminus eine Domäne mit Homologien zur Effektor-domäne des *Drosophila* TOLL-Gens und Interleukin-1 Rezeptoren aus Säugern aufweisen (TIR-Domäne). Derartige Resistenzgene mit einer TIR-Domäne wie z. B. *RPS4*, *RPP2*, *RPP4*, *RPP5* und *RPP21* werden jedoch durch *eds1* ("enhanced disease susceptibility") suprimiert (Parker, *et al.*, 1996; Aarts *et al.*, 1998). Ein weiterer *R*-Genlocus (*RPP8*) wirkt unabhängig von *eds1* und *ndr1* (Aarts *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, daß unterschiedliche *R*-Gene verschiedene Signalwege benutzen. Inwiefern sich die dadurch ausgelösten Abwehrprogramme unterscheiden und ob die verschiedenen Signalwege an bestimmten Stellen konvergieren, ist unbekannt. Der *NDR1*- und der *EDS1*-Locus sind kloniert worden, doch die Funktion ihrer Genprodukte ist unbekannt, auch wenn Homologien der *EDS1*-Sequenz zu eukaryotischen Lipasen Anlaß zu Spekulationen geben (Century *et al.*, 1997; Falk *et al.*, 1999).

Eine Ausnahmestellung unter den bisher klonierten Resistenzgenen nimmt *Pto* aus Tomate ein. Dieses Gen kodiert für eine cytoplasmatische Serin/Threonin-Proteinkinase (S/T-Proteinkinase) und vermittelt Resistenz gegenüber *Pseudomonas syringae* Stämmen, die das Avirulenzgen *avrPto* besitzen (Martin *et al.*, 1993; Loh und Martin, 1996). Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte die direkte Interaktion zwischen *avrPto* und *Pto* nachgewiesen werden. Ebenfalls mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems wurden verschiedene Gene isoliert, deren Genprodukte mit *Pto* interagieren. *Pti1* ("Pto-interacting gene 1") kodiert für eine weitere S/T-Proteinkinase und wird durch *Pto* *in vitro* phosphoryliert (Zhou *et al.*, 1995). *Pti4*, *5* und *6* kodieren für putative Transkriptionsfaktoren mit Homologien zu EREB-Proteinen und binden an GCC-Boxen pathogenresponsiver Gene (Zhou *et al.*, 1997). Obwohl viele Aspekte dieser Signalkette unbekannt sind, läßt sich aus den dargelegten Ergebnissen ein Modell ableiten, in dem *Pto* nach Bindung an *avrPto* die Transkriptionsfaktoren *Pti4*, *5* und *6* phosphoryliert und damit *PR*-Genexpression induziert (Zhou *et al.*, 1997). Davon unabhängig wird über *Pti1*-Phosphorylierung ein paralleler Signalweg aktiviert, der möglicherweise die HR auslöst (Zhou *et al.*, 1995).

Untersuchungen in Suspensionszellkulturen zeigten als schnellste Reaktion nach Elicitorbehandlung einen Efflux von Cl^- und K^+ -Ionen, einen Influx extracellulärer Protonen und Ca^{2+} -Ionen und einen Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Felix *et al.*, 1993; Nürnberger *et al.*, 1994; Tavernier *et al.*, 1995; Chandra und Low, 1997). Verschiedene Inhibitor- und Effektorstudien deuten darauf hin, daß an der Auslösung der Ionenflüsse G-Proteine und Proteinkinasen beteiligt sind (Legendre *et al.*, 1992; Felix *et al.*, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; Gelli *et al.*, 1997). Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Ionenflüsse in den untersuchten Systemen notwendig und

hinreichend für die Auslösung der nachfolgenden Abwehrantworten sind (Jabs *et al.*, 1997; Pugin *et al.*, 1997). Ca^{2+} ist ein ubiquitärer "second messenger" in Eukaryoten - die Ca^{2+} -Homöostase und -Wirkung ist jedoch ausgesprochen komplex und in Pflanzen nur unvollständig verstanden (Trewavas und Malhó, 1998). Inhibitorstudien, Arbeiten mit Ca^{2+} -Chelatoren und Patch-Clamp-Untersuchungen zeigen, daß ein Teil des elicitorstimulierten Ca^{2+} -Einstroms durch Ca^{2+} -Kanäle der Plasmamembran erfolgt (Jabs *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 1997; Gelli *et al.*, 1997); inwiefern jedoch auch intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher involviert sind, ist unbekannt.

Die während des "oxidative burst" entstehenden ROS haben neben ihrer direkten Abwehrwirkung auch eine wichtige Signalfunktion (Lamb und Dixon, 1997). Inhibierung des „oxidative burst“ blockiert in zahlreichen Zellsuspensionskulturen verschiedene Aspekte der Resistenzantwort, und während in einigen Systemen die Applikation von H_2O_2 Abwehrantworten auslöst, ist dies in anderen Systemen nur durch O_2^- -Behandlung möglich (Levine *et al.*, 1994; Jabs *et al.*, 1996; Jabs *et al.*, 1997; Alvarez *et al.*, 1998).

Auch der aus Säugetieren bekannte "second messenger" Stickoxid (NO) ist möglicherweise eine wichtige Signalkomponente in der Auslösung der pflanzlichen Pathogenantwort. In Tabak wurde gezeigt, daß nach Infektion mit avirulenten Pathogenen NO-Synthaseaktivität induziert wird (Durner *et al.*, 1998). In Arabidopsispflanzen und Soja-Zellsuspensionskulturen haben NO und H_2O_2 synergistische Wirkung in der Auslösung von Zelltod (Delledonne *et al.*, 1998) und in Tabak induziert NO-Behandlung PR-Genexpression (Durner *et al.*, 1998), in Soja und Kartoffel Phytoalexinproduktion (Delledonne *et al.*, 1998; Noritake *et al.*, 1996). Möglicherweise wirkt NO ebenso wie in Säugern über ADP-Ribose und cyclisches GMP (Durner *et al.*, 1998). Weitere Komponenten, die die pflanzliche Pathogenabwehr und die Induktion der systemischen Resistenz regulieren, sind die Phytohormone Salicylsäure, Jasmonsäure und Ethylen (Dong, 1998; Reymond und Farmer, 1999).

Proteinkinasen sind zentrale Elemente der eukaryotischen Signaltransduktion und scheinen auch auf verschiedenen Ebenen der Aktivierung der Resistenzantwort eine wichtige Rolle zu spielen. Die beteiligten Proteinkinasen sind jedoch in der Regel bisher unbekannt. Eine Ausnahme bilden das bereits diskutierte R-Gen *Pto* und *Xa21*, das in Reis Resistenz gegen alle Rassen des bakteriellen Pathogens *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* vermittelt. *Xa21* kodiert für ein putatives Membranprotein mit einer N-terminalen S/T-Proteinkinasedomäne (Song *et al.*, 1995). Die übrigen bisher klonierten Resistenzgene besitzen zwar keine Proteinkinasedomänen, die Aktivierung von Kinasen könnte jedoch eines der frühesten Signale nach Erkennung der avr-Genprodukte sein (Innes, 1998; van der Biezen und Jones, 1998).

In verschiedenen Zellkulturmodellen wurde durch *In-Vivo*-Markierungsversuche gezeigt, daß sich das Phosphorylierungsmuster zellulärer Proteine sehr schnell nach Elicitierung verändert (Dietrich *et al.*, 1990; Felix *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1993; Raz und Fluhr, 1993; Viard *et al.*, 1994). Bereits die Auslösung der elicitorstimulierten Ionenflüsse wird vermutlich durch Proteinkinasen vermittelt, denn die Proteinkinaseinhibitoren K252a und Staurosporin inhibieren in verschiedenen Systemen die Alkalinisierung des Kulturmediums und den Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration (Grosskopf

et al., 1990; Conrath *et al.*, 1991; Felix *et al.*, 1993; Viard *et al.*, 1994; Mathieu *et al.*, 1996; B. Blume, persönliche Mitteilung). Gleichzeitig werden durch K252a und Staurosporin auch spätere Elicitorantworten, wie der "oxidative burst", Ethylen- und Jasmonat-Bildung und die Transkription von elicitorresponsiven Genen blockiert (Grosskopf *et al.*, 1990; Schwacke und Hager, 1992; Felix *et al.*, 1993; Kamada und Muto, 1994; Viard *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1995; Mathieu *et al.*, 1996; Menke *et al.*, 1999). Umgekehrt induzieren Proteinphosphataseinhibitoren wie z. B. Calyculin A und Cantharidin Ionenflüsse, den "oxidative burst" und die Transkription einiger Abwehrgene in verschiedenen Systemen (Felix *et al.*, 1994; MacKintosh *et al.*, 1994; Levine *et al.*, 1994; Chandra und Low, 1995; Mathieu *et al.*, 1996). Untersuchungen aus Kartoffel (Subramaniam *et al.*, 1997) deuten auf die Beteiligung einer Proteinkinase C (PKC) in der Ca^{2+} -vermittelten Elicitorsignaltransduktion hin. PKCs sind eine Klasse von S/T-Proteinkinasen, die in der Regel durch Ca^{2+} und Diacylglycerol aktiviert werden und nach Aktivierung mit der Plasmamembran assoziieren. PKC wurde aus Kartoffelproteinextrakt partiell gereinigt, immunologisch nachgewiesen und durch Ca^{2+} und den PKC-Aktivator TPA (12-O-Tetradecanylphorbol-13-acetat) aktiviert (Subramaniam *et al.*, 1997). Parallel dazu wurde gezeigt, daß der spezifische PKC-Inhibitor Sphingosin die durch Arachidonsäure ausgelöste Expression des *PR10a*-Gens in Kartoffelscheiben inhibiert, während TPA *PR10a*-Transkription induziert (Subramaniam *et al.*, 1997). Der direkte Nachweis einer elicitorresponsiven PKC-Aktivität wurde jedoch nicht erbracht.

Transkriptionsfaktoren stellen ein wichtiges Ziel von Signalketten dar, und ihre Aktivität wird in Pilzen und Säugern oftmals durch Proteinkinasen und -phosphatasen reguliert (Hill und Treisman, 1995). Phosphorylierungen können dabei die Lokalisierung der Transkriptionsfaktoren, die DNA-Bindung, ihr transaktivierendes Potential oder die Interaktion mit anderen Faktoren modifizieren (Hunter und Karin, 1992). Über die Regulation der Transkription pflanzlicher Gene durch Phosphorylierungen der entsprechenden Transkriptionsfaktoren ist wenig bekannt; es ist jedoch davon auszugehen, daß ähnliche Regulationsprozesse wie in anderen Eukaryoten existieren. In Soja konnte nachgewiesen werden, daß das bZIP-Protein G/HBF-1 nach Elicitierung phosphoryliert wird (Dröge-Laser *et al.*, 1997). G/HBF-1 wird konstitutiv exprimiert und bindet an G- und H-Box *cis*-Elemente, die in den Promotoren von Genen des Phenylpropanstoffwechsel gefunden werden und die Pathogen- und Elicitorresponsivität dieser Gene vermitteln (Dron *et al.*, 1988; Lois *et al.*, 1989; Loake *et al.*, 1992; Arias *et al.*, 1992). In Proteinextrakten aus Sojazellen konnte eine cytosolische, elicitorresponsive Proteinkinaseaktivität detektiert werden, die rekombinantes G/HBF-1 phosphoryliert und dadurch die Bindung von G/HBF-1 an G- und H-Box *cis*-Elemente eines elicitorresponsiven Chalkonsynthase-Promotors induziert (Dröge-Laser *et al.*, 1997). In Tabak und Kartoffel konnte für einzelne DNA-bindende Proteine eine phosphorylierungsabhängige Bindung an elicitorresponsive Promotorelemente gezeigt werden (Després *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1999).

1.5 Das Modellsystem aus einer Petersiliezellensuspensionskultur und Peptidelicitoren

Petersilie ist gegen Infektionen durch den phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora sojae* resistent. Auskeimende Zoosporen des Pilzes lösen in Petersilieblättern eine Nichtwirts-Resistenzantwort aus, die eine Ausbreitung des Pilzes wirkungsvoll verhindert und alle Komponenten umfaßt, die in Abschnitt 1.1 beschrieben worden sind, z. B. lokal begrenzter "oxidative burst", Kalloseapposition, HR, Expression von Abwehrgenen und Produktion von Furanocumarinphytoalexinen (Jahnen und Hahlbrock, 1988; Schmelzer *et al.*, 1989; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Hahlbrock *et al.*, 1995). Zellsuspensionskulturen der Petersilie und daraus isolierte Protoplasten reagieren nach Behandlung mit Kulturfiltrat oder Präparationen der Mycelwand von *Phytophthora sojae* mit einem Programm das der Resistenzantwort gleicht (Hauffe *et al.*, 1986; Kombrink und Hahlbrock, 1986; Dangl *et al.*, 1987; Somssich *et al.*, 1989; Kawalleck *et al.*, 1993; da Costa e Silva *et al.*, 1993; Kawalleck *et al.*, 1995; Logemann *et al.*, 1995; Hahlbrock *et al.*, 1995). Sie sind deshalb ein gutes Modellsystem um biochemisch und molekularbiologisch die Signalmechanismen zu untersuchen, die zur Erkennung des Pilzes und zur Auslösung der Abwehrantworten führen.

Aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora sojae* wurde ein 42-kDa-Glycoprotein aufgereinigt, das in geringen Konzentration die Abwehrantworten der Petersiliezellen auslöst (Parker *et al.*, 1991). Innerhalb dieses Glycoproteins konnte eine 13 Aminosäuren lange Peptidsequenz (Pep13) identifiziert werden, die notwendig und hinreichend für die Elicitoraktivität des Proteins ist (Nürnberger *et al.*, 1994). Pep13 oder Peptide, die dieses Motiv enthalten, wie das längere und stabilere Pep25 lösen in Suspensionszellen die gleichen Abwehrantworten aus, wie das *Phytophthora sojae*-Kulturfiltrat oder das 42-kDa-Glycoprotein. In Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem Pep13 wurde gezeigt, daß eine einzige Klasse hochaffiner Bindungsstellen in der Petersilieplasmamembran existiert, und daß die Pep13-Bindung reversibel und saturierbar ist (Nürnberger *et al.*, 1994). Durch Verwendung proteinvernetzender Substanzen konnte ein 100 kDa großes Plasmamembranprotein identifiziert werden, das möglicherweise den Rezeptor darstellt (Nürnberger *et al.*, 1995) und durch Affinitätschromatographie partiell gereinigt wurde (Nennstiel *et al.*, 1998).

Als schnellste Reaktion der Petersiliezellen nach Elicitorapplikation wurde eine Aufnahme von Ca^{2+} -Ionen, ein Ausstrom von Cl^- - und K^+ -Ionen, eine Alkalinisierung des Kulturmediums und ein Anstieg der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration gefunden (Nürnberger *et al.*, 1994; B. Blume, persönliche Mitteilung). Diese Ionenströme, die notwendig und hinreichend für die Auslösung aller späteren Antworten sind, gehen wahrscheinlich auf die Aktivierung elicitorresponsiver Ionenkanäle und -transporter zurück (Jabs, 1994; Jabs *et al.*, 1997). In patch clamp-Untersuchungen mit Petersilieprotoplasten konnte ein derartiger elicitorresponsiver Ca^{2+} -Kanal in der Plasmamembran identifiziert und charakterisiert werden (Zimmermann *et al.*, 1997).

Ebenfalls innerhalb von Minuten nach Elicitorzugabe wird die Akkumulation von ROS im Kulturmedium detektiert (Nürnberger *et al.*, 1994). Inhibierung des "oxidative burst"

durch DPI (Diphenyliodonium), einen Inhibitor NADPH-verbrauchender Enzyme (Cross und Jones, 1986), blockiert verschiedene Elicitorantworten wie z. B. die transkriptionelle Aktivierung einzelner elicitorresponsiver Gene und die Phytoalexinsynthese (Jabs *et al.*, 1997). Setzt man dem Kulturmedium dahingegen O_2^- zu, so wird die Phytoalexinsynthese induziert (Jabs *et al.*, 1997). Offensichtlich sind die O_2^- -Ionen nicht aber H_2O_2 frühe Komponenten der Elicitorsignalkette und notwendig und hinreichend für die Induktion der Furanocumarinsynthese.

Eine weitere sehr schnelle Antwort der Petersiliezellen auf Elicitorbehandlung ist die *De-Novo*-Synthese von Jasmonsäure (Kroj, 1995). Welche Signalfunktion die Jasmonsäure innerhalb der Elicitorsignaltransduktion in Petersilie spielt, ist bisher unbekannt, da die Inhibierung der elicitorstimulierten Jasmonatsynthese keinen Einfluß auf die Expression einzelner Abwehrgene und die Phytoalexinakkumulation hat (Kroj, 1995).

Die Promotoren einiger elicitorresponsiver Petersiliegene sind in der Vergangenheit detailliert untersucht worden. Dabei konnten verschiedene elicitorresponsive *cis*-Elemente identifiziert und daran bindende Proteine isoliert werden. Innerhalb der Promotoren der Petersiliegene *PR1.1* und *PR1.2* wurden beispielsweise jeweils zwei W-Boxen gefunden, die unabhängig voneinander funktionieren und notwendig für die Elicitorresponsivität der Promotoren sind (Rushton *et al.*, 1996). Mit Hilfe dieser *cis*-Elemente wurden drei WRKY-Proteine isoliert, die an die *PR1*-W-Boxen binden und deren Expression durch Elicitierung reguliert wird (Rushton *et al.*, 1996). Der Promotor von *WRKY1*, dessen Transkription innerhalb von 15 Minuten nach Elicitierung unabhängig von zusätzlicher Proteinsynthese aktiviert wird, enthält ebenfalls zwei elicitorresponsive W-Boxen (I. Somssich und T. Eulgem, persönliche Mitteilung). Dies deutet darauf hin, daß an der Aktivierung der *WRKY1*-Expression weitere, konstitutiv exprimierte WRKY-Transkriptionsfaktoren beteiligt sind.

Durch *In-Vivo*-“Footprinting“-Analyse wurden P- und L-Boxen im Promotor des Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-Gens (*PAL*) (Lois *et al.*, 1989) identifiziert, die auch in den Promotoren von elicitorresponsiven Genen des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels anderer Pflanzen gefunden wurden (Weisshaar und Jenkins, 1998). An die P-Box bindet BPF1, ein Protein, das Homologie zu MYB-Proteinen aufweist (da Costa e Silva *et al.*, 1993) und dessen Expression nach Elicitierung mit ähnlicher Kinetik induziert wird, wie die *WRKY1*- und *3*-Transkription (da Costa e Silva *et al.*, 1993; Rushton *et al.*, 1996). Auch innerhalb des Petersilie-*PR2*-Promotors wurden elicitorresponsive *cis*-Elemente identifiziert, an die das Homeodomain-Protein PRHP bindet (van de Löcht *et al.*, 1990; Korfhage *et al.*, 1994).

1.6 Ziele der Arbeit

In-Vivo-Phosphorylierungsstudien in Zellsuspensionskulturen der Petersilie haben gezeigt, daß sich das Phosphorylierungsmuster zellulärer Proteine nach Elicitorzugabe sehr schnell verändert (Dietrich *et al.*, 1990). Darüberhinaus werden durch Proteinkinase- und Phosphataseinhibitoren auf verschiedenen Ebenen der Elicitorsignalkette Antworten blockiert und induziert (Conrath *et al.*, 1991; Renelt *et al.*, 1993; B. Blume, persönliche

Mitteilung). Staurosporin und K252a blockieren die elicitorresponsiven Ionenflüsse, den Anstieg der cytoplasmatischen Calciumkonzentration und den "oxidative burst", aber induzieren die elicitorunabhängige Bildung von Phytoalexinen (Conrath *et al.*, 1991; B. Blume, persönliche Mitteilung). Zugabe des Phosphataseinhibitors Okadainsäure induziert ebenfalls die Phytoalexinsynthese (Renelt *et al.*, 1993). Diese Ergebnisse und der Vergleich mit gut untersuchten Signalwegen in Pilzen und Tieren erlaubt den Schluß, daß verschiedene Proteinkinasen mit reprimierender oder aktivierender Funktion auf unterschiedlichen Ebenen der Elicitorsignalkette wirken. Ihre molekulare Kenntnis und die Aufklärung ihrer Funktion würde einen entscheidenden Fortschritt im Verständnis der Elicitorsignaltransduktion bedeuten.

Vorausgegangene Arbeiten mit Tabakzellkulturen haben gezeigt, daß möglicherweise eine S/T-Proteinkinase aus der Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) durch Pilzelicitoren aktiviert wird (Suzuki und Shinshi, 1995). Ob es sich bei dieser elicitorresponsiven Kinase tatsächlich um eine MAPK handelt, wurde nicht demonstriert. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob MAPKs in der Elicitorantwort von *Petersilie* aktiviert werden. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob diese Aktivierung ein rezeptorvermittelter Prozeß oder lediglich eine unspezifische Reaktion der Pflanzenzellen auf pilzliche Zellwandbestandteile ist, und an welcher Stelle innerhalb der Elicitorsignalkette die MAPK-Aktivierung lokalisiert ist. Die elicitorresponsiven MAPKs sollten molekular charakterisiert werden, um anschließend ihre Funktion in der Elicitorsignaltransduktion bestimmen zu können und ausgehend von ihnen neue Signalelemente zu isolieren.