

4 Diskussion

Proteinphosphorylierungen und -dephosphorylierungen sind zentrale Mechanismen in der eukaryotischen Signaltransduktion. In Pilz- und Tiersystemen ist gezeigt worden, daß die daran beteiligten Proteinkinasen wichtige Regulatoren in den meisten Adaptations- und Entwicklungsprozessen sind. In vielen Signalwegen sind die entsprechenden Kinasen kloniert und pharmakologisch, biochemisch und genetisch eingehend charakterisiert worden.

In Pflanzen ist die Situation grundlegend anders. Zwar wird davon ausgegangen, daß wie in anderen Eukaryoten ca. 2% der pflanzlichen Gene für Proteinkinasen kodieren (Stone und Walker, 1995; Hunter und Plowman, 1997), abgesehen von einigen gut untersuchten Vertretern ist über sie jedoch wenig bekannt. Mittlerweile ist eine Vielzahl von pflanzlichen Proteinkinasen kloniert worden, doch die Signalwege, in denen sie wirken, und ihre Regulatoren und Substrate müssen vielfach erst noch identifiziert werden. Es ist allerdings deutlich, daß die Proteinkinasen auch in Pflanzen wichtige Regulatoren in fast allen Lebensprozessen sind, z. B. der Regulation des Primär- und Sekundärstoffwechsels, der Zellzyklusregulation, der vegetativen Entwicklung und der Licht- und Stressignaltransduktion (Martin *et al.*, 1993; Kieber *et al.*, 1993; Stone und Walker, 1995; Clark *et al.*, 1997; MacKintosh, 1998; Lee *et al.*, 1999; Frankhauser *et al.*, 1999)

4.1 Die Aktivierung von MAPKs in der pflanzlichen Pathogenabwehr

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Nachweis elicitorresponsiver MAPKs in Petersilie zum ersten Mal die rezeptorvermittelte Aktivierung pflanzlicher MAPKs gezeigt werden. Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern und In-Gel-MBP-Kinase-Versuche zeigten übereinstimmend die schnelle und transiente Aktivierung von 3 MAPKs der Größen 40, 44 und 46 kDa in elicitorbehandelten Petersiliezellen. Während in anderen pflanzlichen Zellsuspensionskulturen die Grundaktivität einzelner MAPKs aufgrund der durch das Schütteln verursachten mechanischen Reizung vergleichsweise hoch ist (Bögre *et al.*, 1996), war in den unbehandelten Petersiliezellen keine MAPK-Aktivität nachweisbar. Die posttranslationale Modifikation der Kinasen durch Phosphorylierung des TEY-Motifs auf der MAPK-Aktivierungsschleife erfolgte innerhalb von 5 min nach Elicitorzugabe und ging mit der Aktivierung der Enzymaktivität einher. Das Aktivitätsmaximum wurde 5-10 min nach Elicitierung erreicht, danach setzte die Deaktivierung und Dephosphorylierung der Kinasen ein. Die Aktivierung der 40- und der 46-kDa-Kinase hielt jedoch auf niedrigerem Niveau für einige Stunden an, während die 44-kDa-Kinase bereits nach 30 min vollständig inaktiviert war.

Das Muster der elicitorinduzierten MAPK-Aktivierung in Petersilie gleicht demjenigen, das nach Elicitierung von Tabakzellsuspensionskulturen gefunden wurde. Cf9-exprimierende Tabakzellen, die mit avr9 behandelt wurden, und Tabakzellen, die mit

einer Zellwandpräparation von *Phytophthora parasitica* elicitiert wurden, zeigten übereinstimmend die schnelle und transiente Aktivierung einer 44- und einer 48-kDa MAPK (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Durch immunologische Studien konnte gezeigt werden, daß es sich bei der 48-kDa-MAPK um SIPK (salicylate-induced protein kinase) und bei der 44-kDa-MAPK um WIPK (wound-induced protein kinase) handelte (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Auch hier wurde die 48-kDa-MAPK viel stärker aktiviert und zeigte bis zu 4 h nach Elicitorzugabe eine erhöhte Aktivität, während die 44-kDa-MAPK eine geringere Aktivität hatte und schneller deaktiviert wurde (Zhang *et al.*, 1998; Romeis *et al.*, 1999). Ein vergleichbares Induktionsmuster wurde auch in Tabakpflanzen nach Infiltration der Blätter mit den gleichen Elicitoren gefunden (Zhang *et al.*, 1998, Romeis *et al.*, 1999). In diesen Infiltrationsexperimenten war neben der lang anhaltenden Aktivierung, die auf die Elicitoren zurückzuführen ist, jedoch auch eine viel transientere, nur einige Minuten andauernde Wundaktivierung der gleichen Kinasen zu beobachten (Zhang und Klessig, 1998a; Romeis *et al.*, 1999). Offensichtlich sind die 44- und die 48-kDa-MAPK auch durch Verwundung induzierbar, sie werden jedoch innerhalb von 15-30 min vollständig deaktiviert (Usami *et al.*, 1995; Zhang und Klessig, 1998a; Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). Verschiedene Autoren berichten allerdings, daß sie nach Verwundung jeweils nur eine der beiden Kinasen (WIPK oder SIPK) detektieren konnten (Usami *et al.*, 1995; Seo *et al.*, 1995; Klessig und Zhu, 1998a; Seo *et al.*, 1999). Vermutlich ist dies auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen bei den Proteinextraktionen, den In-Gel-MBP-Kinaseversuchen und den Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten zurückzuführen. Denn in Tabak (Romeis *et al.*, 1999) und Medikago (W. Ligterink und H. Hirt, persönliche Mitteilung) wurde unter geeigneten Bedingungen die transiente Wundaktivierung der 44- und der 48-kDa-MAPK gefunden.

Auch nach Infektion von Tabakpflanzen mit Tabak-Mosaik-Virus (TMV) wird eine R-Gen-abhängige Aktivierung der 44- und der 48-kDa-MAPKs gefunden (Zhang und Klessig, 1998b). Abgesehen von einer verzögerten Kinetik unterscheidet sich die Aktivierung der Kinasen dadurch, daß die posttranslationale Aktivierung der 44-kDa-WIPK durch Phosphorylierung durch ihre transkriptionelle Aktivierung und die Akkumulation des Proteins begleitet wird. In unbehandelten Tabakpflanzen wurde von den Autoren kein WIPK-Protein detektiert (Zhang und Klessig, 1998b). Dies steht in gewisser Diskrepanz zu anderen Arbeiten (Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). Hier wurde auch in unbehandelten Tabakpflanzen WIPK-Protein nachgewiesen; nach Elicitierung und Verwundung blieb das Protein-Niveau konstant.

Die Aktivierung einer 40-kDa-MAPK wird in den besprochenen Elicitor- oder Wundexperimenten nicht beschrieben, was vermutlich an der geringen Aktivität dieser Kinase im In-Gel-Nachweis liegt. Interessanterweise wird jedoch nach Behandlung von Tabakzellen mit Elicitinen, die außer der Aktivierung von Abwehrantworten auch Zelltod auslösen, neben der 44- und der 48-kDa-Kinase auch eine 40-kDa-MBP-Kinase aktiviert (Zhang *et al.*, 1998). Die Aktivierungskinetik der MAPKs nach Elicitinbehandlung unterscheidet sich grundsätzlich von der, die in den anderen Elicitorexperimenten gefunden wurde. Die 48-kDa-MAPK wird innerhalb von 5 min aktiviert und diese Aktivität bleibt bis zum Einsetzen des Zelltods nach ca. 4 h konstant hoch. Die

Aktivierung der 40- und der 44-kDa-Kinase erfolgt verzögert. Erst nach 15-60 min sind diese Kinaseaktivitäten nachweisbar und ihre Aktivität nimmt bis zum Einsetzen des Zelltods zu (Zhang *et al.*, 1998).

Während sich die Aktivierungsprofile der 44- und 46-kDa-MAPK in den In-Gel- und den Westernblot-Versuchen entsprechen, fällt bei der 40-kDa-MAPK der Unterschied zwischen der geringen Aktivität im In-Gel-Versuch und den deutlichen Signalen im Westernblot auf. Da auch bei Verwendung von Extrakten, die unter denaturierenden Bedingungen erhalten wurden, ein ebenso starkes Signal in den Westernblots gefunden wurde, ist auszuschließen, daß es sich bei der 40-kDa-Bande um ein nach der Extraktion entstandenes, wenig kinaseaktives Abbauprodukt einer elicitorresponsiven MAPK handelt. Obwohl die Kinase offensichtlich das TEY-Motiv enthält, deutet die geringe Aktivität in den In-Gel-Versuchen darauf hin, daß sie nicht so effizient renaturiert oder das MBP schlechter als Substrat akzeptiert. Ein weiterer Unterschied zu den bisher charakterisierten MAPKs aus Pflanzen ist die geringe Größe, die mindestens 2 kDa unter derjenigen der bisher klonierten oder detektierten pflanzlichen MAPKs liegt (Jonak *et al.*, 1998). Möglicherweise handelt es sich bei der 40-kDa-MAPK deshalb um einen Vertreter einer neuen Unterfamilie pflanzlicher MAPKs. Auch in Hefen und in Tieren wurden verschiedene MAPK-Unterfamilien mit deutlich unterschiedlichen Substratspezifitäten gefunden (Cano und Mahadevan, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Neben den zuerst identifizierten ERKs (extracellular signal-regulated kinase), denen die bisher klonierten pflanzlichen MAPKs am stärksten gleichen, existieren in Säugern die p38- und die JUN-(c-JUN N-terminal-protein) Kinaseunterfamilie (Lewis *et al.*, 1998), die anstelle des Glutamats im TEY-Motiv ein Glycin bzw. ein Prolin besitzen. Obwohl bisher keine pflanzlichen p38- oder JNK-Homologe beschrieben wurden, deuten die Westernblot-Experimente auf das Vorkommen zusätzlicher MAPK-Unterfamilien in Pflanzen hin.

Die unterschiedlichen Aktivierungsprofile der MAPKs nach den verschiedenen Stimuli (verschiedene Elicitoren, Verwundung, Infektion) lassen vermuten, daß für die Signalspezifität der pflanzlichen MAPK-Kaskaden nicht nur entscheidend ist, welche verschiedenen MAPK-Isoformen aktiviert werden, sondern auch wie lange ihre Aktivierung andauert. Denn vor allem wenn einzelne Signalkomponenten in verschiedenen Signalwegen aktiviert werden, kann ihr zeitliches Aktivierungsprofil Signalspezifität vermitteln und die Antwort des Systems determinieren. Die Bedeutung der Dauer der MAPK-Aktivierung für die Antwort einer Zelle auf einen gegebenen Stimulus wurde vor allem durch Arbeiten über die ERK1/2-Kinase in menschlichen Zellkulturen deutlich (Marshall, 1995; Cobb, 1999). So ist in der neuronalen Zelllinie P12 eine langandauernde Aktivierung von ERK1/2 notwendig und hinreichend für die Auslösung eines Differenzierungsprozesses und einen Arrest im Zellzyklus, während eine transiente Aktivierung der ERKs zu Zellproliferation führt (Traverse *et al.*, 1992; Heasley und Johnson, 1992; Cowley *et al.*, 1994; Traverse *et al.*, 1994). Wahrscheinlich bestimmt das ERK2-Aktivierungsprofil, wie effizient und langanhaltend einzelne Transkriptionsfaktoren aktiviert werden, die für die Auslösung des Differenzierungsprozesses benötigt werden (Marshall, 1995).

Über den Prozeß, der zur Deaktivierung der elicitorresponsiven MAPKs in Petersilie führt, ist wenig bekannt. Die Korrelation der MAPK-Aktivität mit der Phosphorylierung des TEY-Motivs deutet allerdings darauf hin, daß die elicitorresponsiven MAPKs ebenso wie MAPKs in Hefe- oder Säugerzellen durch spezifische Proteinphosphatasen dephosphoryliert und inaktiviert werden (Keyse, 1998). Möglicherweise werden diese Phosphatasen ebenso wie in anderen Systemen transkriptionell aktiviert (Ward *et al.*, 1994; Millar *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1997), denn in Medicago und Tabak wurde gefunden, daß für die Deaktivierung einer wundresponsiven MAPK die Transkription und Translation eines deaktivierenden Proteins, wahrscheinlich einer Proteinphosphatase, notwendig ist (Usami *et al.*, 1994; Bögre *et al.*, 1997). In Medicago wurde zudem gezeigt, daß die Deaktivierung der wundresponsiven MAPK MMK4 von der Transkription und Translation einer Proteinphosphatase 2C (MP2C) begleitet wird (Meskiene *et al.*, 1998). MP2C interferiert in Hefe negativ mit der MAPK-Kaskade des Pheromonsignalwegs, und die Zugabe von rekombinantem MP2C zu Proteinextrakten verwundeter Medicagoblätter führt zur Deaktivierung der wundresponsiven MMK4 (Meskiene *et al.*, 1998). Welche Kinasen der MMK4-Kaskade MP2C *in vivo* dephosphoryliert, ist jedoch noch nicht bekannt.

4.2 Die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ist ein rezeptorvermittelter Prozeß

Ein zentrales Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis, daß die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs ein rezeptorvermittelter Prozeß ist. Durch die Verwendung aktiver und inaktiver Pep13-Analoga konnte demonstriert werden, daß die MAPK-Aktivierung durch die Bindung des Pep13-Peptids an den plasmamembranständigen Pep13-Rezeptor ausgelöst wird. Obwohl die Natur des Pep13-Rezeptors noch unbekannt ist und die Kette von Signalschritten, die zur MAPK-Aktivierung und zur Auslösung der anderen Elicitorantworten führt, nur sehr unvollständig charakterisiert ist, ist die elicitorvermittelte Aktivierung der MAPKs ein eindringliches Beispiel für die Konservierung von Signalketten in Eukaryoten.

Vergleichbare, durch Peptidsignale aktivierte MAPK-Signalwege wurden in vielen Organismen beschrieben. Die am besten untersuchte Signalkaskade ist der Pheromon-Signalweg in Hefe. Nach Bindung eines Peptidpheromons an einen G-Proteingekoppelten Rezeptor wird durch wenige Signalschritte eine MAPK-Kaskade aktiviert, an deren Ende FUS3-Aktivierung steht (Herscowitz, 1995; Gustin *et al.*, 1998). Diese MAPK modifiziert Cytoskelettkomponenten und Regulatoren der Transkription und löst letztendlich die Fusion haploider Hefezellen aus. In Säugern führt die Bindung von Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, bei denen es sich ebenfalls um Peptide handelt, an Rezeptortyrosinkinasen zur Aktivierung von ERK1 und 2. Diese MAPKs modifizieren eine Vielzahl von Substraten (z. B. Transkriptionsfaktoren aktivieren) und lösen so Differenzierung oder Proliferation aus (Robinson und Cobb., 1997; Lewis *et al.*, 1998 ; Cobb, 1999).

4.3 Einordnung der elicitorresponsiven MAPKs in die Elicitorsignalkette

Die *loss-of-function*- und *gain-of-function*-Experimente mit A9C und Amphotericin B zeigen deutlich, daß die Aktivierung der MAPKs in der Elicitorsignalkette unterhalb des Anstiegs der cytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration und der elicitorstimulierten Ionenflüsse liegt und kausal mit diesen verknüpft ist. Welche Signalschritte zwischen den Ionenflüssen und der Aktivierung der MAPK-Kaskaden liegen, ist allerdings vollkommen unbekannt. Da die MAPKs eindeutig unterhalb der elicitorstimulierten Ionenflüsse lokalisiert sind, müssen die Angaben von Zhang *et al.* (1998) über die Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktionskette, die aus Inhibitorexperimenten mit Staurosporin und K252a abgeleitet worden sind, in Zweifel gezogen werden. Die Autoren fanden, daß Staurosporin und K252a in Tabakzellen die Aktivierung der MAPKs, die Alkalinisierung des Kulturmediums und die *PAL*-Transkription nach Elicitorbehandlung blockierten, und schlußfolgerten daraus, daß die MAPK-Aktivierung notwendig für die Protonenaufnahme und die *PAL*-Expression ist (Zhang *et al.*, 1998). Da K252a und Staurosporin eine sehr früh aktivierte Kinase inhibieren, die bereits an der Auslösung der elicitorstimulierten Ionenflüsse beteiligt ist (Grosskopf *et al.*, 1990; Conrath *et al.*, 1991; Viard *et al.*, 1994), ist die Inhibition der MAPK-Aktivierung als ein sekundärer Effekt anzusehen. Folglich lassen sich aus diesen Experimenten keine spezifischen Funktionen der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktion ableiten.

Die Beobachtung, daß die Inhibierung des "oxidative burst" durch DPI die Aktivierung der elicitorresponsiven MAPKs nicht blockiert, wirft die Frage auf, ob die MAPKs oberhalb des "oxidative burst" wirken oder in einem parallelen Signalweg lokalisiert sind. Experimente in Tabakzellkulturen, in denen gezeigt wurde, daß der MEK1-Inhibitor PD 098059 (Alessi *et al.*, 1995) zwar die Aktivierung der MAPKs, nicht aber die Produktion von ROS inhibiert (Romeis *et al.*, 1999), sprechen für eine Rolle der MAPKs in einem "oxidative burst"-unabhängigen Signalweg. Daß ein derartiger Signalweg in *Petersilie* existieren muß, wird durch die Tatsache deutlich, daß die Expression des Transkriptionsfaktors WRKY1, dessen Transkript bereits 15 min nach Elicitorapplikation detektierbar ist (Rushton *et al.*, 1996), durch DPI nicht inhibiert wird (T. Eulgem, persönliche Mitteilung). In Zukunft wird es deshalb von besonderem Interesse sein, mit Hilfe des Inhibitors DPI und des Effektors KO_2 (Jabs *et al.*, 1997) festzustellen, welche der elicitorresponsiven *Petersilie*gene durch den "oxidative burst" reguliert werden und welche nicht. Da die momentan verfügbaren spezifischen Inhibitoren der MAPK-Kaskade in *Petersilie*zellen unwirksam sind, lassen sich bezüglich der MAPKs zur Zeit keine vergleichbaren Experimente durchführen (vgl. 4.8).

4.4 Die Genfamilie der MAPKs in *Petersilie*

Die bisher klonierten pflanzlichen MAPK-cDNAs lassen sich aufgrund der Homologien der abgeleiteten Aminosäuresequenzen in 4 Gruppen einteilen (Mizoguchi *et al.*, 1997; Jonak *et al.*, 1999). Vermutlich spiegelt die Zugehörigkeit zur gleichen Gruppe gleiche

Funktionen der jeweiligen Kinasen in den unterschiedlichen Spezies wieder, bisher konnte allerdings für keine dieser Kinasen eine definierte Signalfunktion oder ein relevantes endogenes Substrat bestimmt werden. Für einige der pflanzlichen MAPKs wurde jedoch die posttranslationalen und teilweise auch die transkriptionelle Aktivierung nach verschiedenen Stimuli und in verschiedenen Entwicklungsprozessen gezeigt. Dazu gehören u. a. Verwundung, Trockenheit, Phytohormone, Mitose und Pathogeninfektion (Mizoguchi *et al.*, 1997; Hirt, 1997; Jonak *et al.*, 1999).

Auch in Petersilie konnten MAPKs aus allen 4 Gruppen nachgewiesen werden. MPK1 und 2 haben hohe Homologie zu Tabak-WIPK und Medicago-MMK4, für die u. a. Wund-, Kälte-, Berührungs- und Elicitorresponsivität beschrieben wurde (Jonak *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1996; Bögre *et al.*, 1997; Romeis *et al.*, 1999; Seo *et al.*, 1999). MPK3 ist homolog zur Tabak-SIPK, die durch Verwundung, SA, Elicitoren und Pathogene aktiviert wird (Zhang und Klessig, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Zhang und Klessig, 1998a; Zhang und Klessig, 1998b), und zur Medicago-MMK1 (Jonak *et al.*, 1993), die wund- und elicitorresponsiv ist (W. Ligterink und H. Hirt, persönliche Mitteilung). Southernblot-Experimente deuten darauf hin, daß es noch mindestens ein zusätzliches MPK3-Homolog im Petersilienom gibt, während MPK1 und 2 die einzigen Vertreter ihrer Gruppe in Petersilie zu sein scheinen. MPK4 und 5 besitzen hohe Homologie zu NTF6 aus Tabak (Wilson *et al.*, 1995), MMK2 (Jonak *et al.*, 1995) und MMK3 (Bögre *et al.*, 1999) aus Medicago und MPK4 und 5 (Mizoguchi *et al.*, 1993) aus Arabidopsis. Während für MMK3 und NTF6 Aktivierung innerhalb der Mitose beschrieben wurde (Calderini, 1998 ;Bögre *et al.*, 1999), sind für die anderen Kinasen dieser Gruppe keine aktivierenden Stimuli bekannt. Aus der vierten Gruppe von pflanzlichen MAPKs (Mizoguchi *et al.*, 1994; Decroocq-Ferrant *et al.*, 1995) ist bisher kein Petersilieklon isoliert worden. PCR-Experimente mit cDNA und genomischer DNA aus Petersilie zeigen jedoch, daß es auch MAPKs dieser Gruppe im Petersilienom gibt (A. Zunker und A. Neininger, persönliche Mitteilung). Welche Bedingungen zur Aktivierung dieser Kinasen führen, ist unbekannt. Der in Kapitel 4.1 diskutierte Vergleich der Ergebnisse der In-Gel-Versuche und der Westernblots mit den anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern und die Situation in anderen Eukaryoten deuten darauf hin, daß es neben den bisher bekannten MAPKs in Pflanzen noch zusätzliche MAPK-Unterfamilien gibt.

In Zukunft wird es von großer Bedeutung sein, durch die Analyse transgener Pflanzen, die induzierbar konstitutiv aktive Komponenten der MAPK-Kaskaden exprimieren, und "knock out"-Mutanten die Signalfunktion der einzelnen MAPKs zu untersuchen. Interessanterweise besitzen Pflanzen Paare hoch homologer MAPKs, wie z. B. Petersilie MPK1 und 2 bzw. MPK4 und 5 und Arabidopsis MPK4 und 5. Es stellt sich die Frage, ob diese Kinasen differentiell reguliert werden oder redundante Funktionen haben. Untersuchungen in Hefe haben beispielsweise gezeigt, daß dort jeder MAPK ein bestimmter Signalweg und definierte Signalfunktionen zugeordnet werden können (Gustin *et al.*, 1998).

4.5 Immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven Kinasen

Durch die immunologische Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs wurden wichtige Informationen über die Aktivierung der klonierten Petersiliekinasen in der Elicitorantwort gewonnen. Ein zentrales Hilfsmittel waren dabei die bakteriell exprimierten MAPKs MPK1, 2, 3 und 4, mit deren Hilfe die Kreuzreaktion der verwendeten Seren bestimmt wurde. Zudem war von entscheidender Bedeutung, daß mit Peptiden aus heterologen Sequenzbereichen Antikörper generiert werden konnten, die trotz der großen Homologie der verschiedenen Petersilie-MAPKs spezifisch zwischen den einzelnen Kinasegruppen diskriminierten.

Durch die Experimente mit den Seren P37, P38 und M11 kann mit großer Sicherheit ausgeschlossen werden, daß MPK4 oder 5 durch Elicitierung aktiviert werden. Alle 3 Seren erkannten mit hoher Spezifität das rekombinante MPK4, fällten in Immunpräzipitations-Kinaseexperimenten aber keine elicitorresponsive MBP-Kinaseaktivität. Es ist davon auszugehen, daß sich diese Ergebnisse auf MPK5 übertragen lassen, da sich der für die Antigenizität relevante Teil des C-Terminus von MPK5 nur in einer Aminosäure vom MPK4-C-Terminus unterscheidet. Zu dem für die Herstellung des M11-Serums verwendeten Peptid weisen der MPK4- und 5-C-Terminus sogar die gleiche Identität auf. Deshalb ist davon auszugehen, daß beide Kinasen gleich gut durch die M11-Antikörper detektiert werden. Die Homologen aus *Medicago* (MMK2 und MMK3) werden ebenfalls nicht durch Elicitierung (H. Hirt, persönliche Mitteilung) und auch nicht durch Verwundung (Bögre *et al.*, 1997) aktiviert und sind stattdessen möglicherweise in die Regulation der Zellwandsynthese involviert (Bögre *et al.*, 1999).

Die Experimente mit dem M7- und dem P82-Serum zeigen, daß MPK3 die elicitorresponsive 46-kDa-MAPK ist, die in den In-Gel-Versuchen und in Westernblots mit anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern identifiziert wurde. Durch beide Seren wurde das 46-kDa-große rekombinante MPK3 und in Petersilieproteinextrakt ein einziges, ebenso großes Protein detektiert. Gleichzeitig wurde mit beiden Seren eine elicitorresponsive MBP-Kinase präzipitiert, die das gleiche Aktivierungsprofil wie die 46-kDa-Kinase aufwies. Aufgrund der hohen Spezifität des P82-Serums, das ausschließlich MPK3 erkennt, und der hohen Sequenzheterogenität im N-Terminus der pflanzlichen MAPKs kann mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß eine andere MAPK als MPK3 die elicitorresponsive 46-kDa-MAPK ist. Daß neben MPK3 noch eine zusätzliche 46-kDa-MAPK aktiviert wird, kann durch die durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden, erscheint aber sehr unwahrscheinlich. Um Eindeutigkeit in dieser Frage zu schaffen, sollten Proteinextrakte nicht elicitierter und elicitierter Zellen mittels 2-dimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend durch Westernblot-Analyse mit den P82- und den anti-ACTIVETM-MAPK-Antikörpern analysiert werden. Auch in anderen Pflanzen wird durch Elicitierung die Aktivität von MPK3-Homologen induziert. Wie bereits in Kapitel 4.1 diskutiert wurde, werden die 48-kDa-SIPK aus Tabak (Zhang *et al.*, 1998) und MMK1 aus *Medicago* (H. Hirt und W.

Ligterink, persönliche Mitteilung) nach Elicitorbehandlung mit ähnlichem Aktivitätsprofil wie MPK3 aktiviert. Der Vergleich mit diesen Systemen läßt die Vermutung zu, daß MPK3 auch durch andere Streßformen, insbesondere durch Verwundung aktiviert wird. Spezifisch für die Elicitorantwort scheint aber die zuerst transiente und dann langanhaltende Aktivierung zu sein.

Das mit einem C-terminalen Peptid von MPK1 hergestellte Serum P97 detektierte mit hoher Spezifität MPK1, kreuzreagierte jedoch auch in geringem Maße mit MPK2. Da es in Immunpräzipitationsexperimenten keine MBP-Kinaseaktivität fällte, ist davon auszugehen, daß MPK1 entgegen unserer früheren Vermutung (Ligterink *et al.*, 1997) nicht elicitorresponsiv ist. Ob dahingegen MPK2 elicitorresponsiv ist, kann aufgrund der schlechten Erkennung durch das P97-Serum nicht beantwortet werden. Diese Frage soll jedoch in Zukunft untersucht werden, da die Homologen von MPK1 und 2 (WIPK bzw. MMK4) in Tabak- (Romeis *et al.*, 1999) und Medicago-Zellkulturen (Hirt und Ligterink, persönliche Mitteilung) durch Elicitierung aktiviert werden und die Identifizierung der elicitorresponsiven 44-kDa-MAPK in Petersilie noch aussteht. Um ein spezifisches Serum für die immunologische Charakterisierung von MPK2 herzustellen, sollte ein Peptid gewählt werden, das die letzten 10 C-terminalen Aminosäuren von MPK2 enthält. Dieses zeigt ausreichende Sequenzunterschiede zu den entsprechenden MPK1- und MPK3-Bereichen und verspricht die Produktion eines selektiven Serums.

4.6 Elicitorstimulierter Kerntransport von MPK3

In Hefen und in Tiersystemen sind MAPKs oft unmittelbar an der Regulation von Transkriptionsfaktoren beteiligt. Diese Funktion an der Schnittstelle zwischen cytosolischer Signaltransduktion und transkriptioneller Kontrolle der Genexpression spiegelt sich in der Beobachtung wieder, daß verschiedene MAPKs nach Phosphorylierung und Aktivierung im Zellkern akkumulieren (Chen *et al.*, 1992; Gonzalez *et al.*, 1993; Lenormand, 1993). Der Mechanismus, durch den der Kerntransport erfolgt, ist bisher jedoch weitgehend unbekannt, weil MAPKs - von Ausnahmen abgesehen - kein NLS ("nuclear localisation signal") besitzen. Untersuchungen mit ERK2 haben allerdings erste Erkenntnisse über den Prozeß geliefert. Nicht aktiviertes ERK2 bindet an seinen Aktivator MEK1, der ein funktionelles Kernexportsignal besitzt und in gleicher Menge wie ERK2 in der Zelle vorliegt (Fukuda *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 1997). Dadurch wird die nicht aktivierte MAPK im Cytoplasma zurückgehalten. Nach Phosphorylierung von ERK2 zerfällt der Komplex, und aktiviertes ERK2 akkumuliert im Nukleus. Das Modell, daß inaktives ERK2 im Cytoplasma durch seinen gleich abundanten Aktivator zurückgehalten wird, bietet eine Erklärung für die Beobachtung, daß ERK2 nach Überexpression präferentiell im Nukleus gefunden wird (Fukuda *et al.*, 1997). Andere Arbeiten haben gezeigt, daß ERK2 nach Aktivierung dimerisiert und in Form dieser Dimere in den Kern transportiert wird (Canagarajah *et al.*, 1997; Khokhlatchev *et al.*, 1998). Wird die Fähigkeit zur Dimerisierung zerstört, verbleiben die Kinasen auch in phosphorylierter Form im Cytoplasma. Weil die Kernlokalisierung in verschiedenen Systemen essentiell für die MAPK-Funktion ist (Robinson *et al.*, 1998; Brunet *et al.*, 1999), wurden in der

vorliegenden Arbeit Immunlokalisierungen mit dem M7-Serum und dem P82-Serum vorgenommen. Bei Verwendung des M7-Serums zeigte sich, daß die 46-kDa-Kinase nach Phosphorylierung im Kern akkumuliert, wo sie möglicherweise an der Aktivierung der Transkription elicitorresponsiver Gene beteiligt ist. Die Kernlokalisierung ist ebenso wie die Aktivierung durch Phosphorylierung transient. Während nach 5 min alle Kerne deutlich gefärbt sind, sind nach 60 min, wenn geringere MAPK-Aktivität detektiert wird, nur noch einzelne Kerne angefärbt. Der aufgrund der großen Vakuole nur sehr kleine Cytoplasmasaum der Suspensionszellen wird durch die gewählte Fixierung nur sehr schlecht konserviert. Dies ist wahrscheinlich die Ursache dafür, daß weder in den nicht behandelten noch in den behandelten Zellen eine Immunfärbung des Cytoplasmas sichtbar ist.

Bei Verwendung des P82-Serums in Immunlokalisationsexperimenten ließ sich der Kerntransport nicht zeigen. Es war lediglich eine starke Fluoreszenz der Zellwände in den behandelten und den unbehandelten Zellen sichtbar, die Kerne zeigten eindeutig keine Immunfluoreszenz. Eine Ursache für dieses Ergebnis ist möglicherweise, daß der N-Terminus im Gegensatz zum C-Terminus nach der Fixierung mit Formaldehyd für die Antikörper nicht mehr zugänglich ist. Um dieses zu überprüfen, wäre die Immunlokalisation mit P82-Serum in anders fixiertem Material notwendig. Mögliche Techniken wären Gefriersubstitution oder die Fixierung von Protoplasten durch Methanol (Neumann *et al.*, 1987). Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß MPK3 vor der Kernlokalisation N-terminal prozessiert wird. Ein solcher Prozeß wurde für MAPKs bisher nicht beschrieben und erscheint ausgeschlossen, da bei Westernblot-Analyse von Gesamtprotein elicierterter und nicht elicierterter Zellen mit P82- und M7-Serum lediglich eine einzige Bande von 46 kDa detektiert wird. Schließlich besteht die Möglichkeit, daß das M7-Serum neben MPK3 eine weitere elicitorresponsive 46-kDa-MAPK erkennt, die durch das P82-Serum nicht detektiert wird und im Gegensatz zu MPK3 im Kern akkumuliert. Um diese Möglichkeit auszuschließen, müßte Petersiliegesamtprotein in einer 2-dimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western-Transfer mit M7- und P82-Serum analysiert werden.

4.7 Eignung von Proteinkinaseinhibitoren für die funktionelle Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs

Der schnelle Kerntransport von MPK3 deutet darauf hin, daß zumindest einzelne der elicitorresponsiven MAPKs die Aktivität von Transkriptionsfaktoren regulieren und damit unmittelbar an der transkriptionellen Aktivierung von Abwehrgenen beteiligt sind. Um diese Hypothese zu untersuchen oder andere Funktionen der MAPKs in der Elicitorantwort zu bestimmen, sind *loss-of-function*-Experimente, in denen die Signalkette spezifisch auf der Ebene der MAPK-Kaskade unterbrochen wird, und *gain-of-function*-Experimente, in denen spezifisch die MAPK-Kaskade aktiviert wird, notwendig. Ein wichtiges Hilfsmittel für *loss-of-function*-Untersuchungen sind Inhibitoren. Der überwiegende Teil der Proteinkinaseinhibitoren hat jedoch ein sehr breites Wirkungsspektrum und war deshalb für die Bestimmung der MAPK-vermittelten

Abwehrantworten ungeeignet. Die Inhibitoren UO 126 (Favata *et al.*, 1998) und PD 096059 (Alessi *et al.*, 1995) inhibieren zwar sehr spezifisch die humane MEK1, erwiesen sich aber in Petersiliezellen als unwirksam in der Inhibition der MAPK-Aktivierung. In anderen Pflanzenzellkulturen scheinen sie jedoch wirksam zu sein. So wurde in Tabakzellkulturen gezeigt, daß die elicitorinduzierte Aktivierung der MAPKs WIPK und SIPK durch PD 096059 und durch UO 126 inhibiert wird (Romeis *et al.*, 1999; J. Lee, persönliche Mitteilung).

Für beide Inhibitoren wurde in *In-Vitro*-Untersuchungen gezeigt, daß sie nur MEK1 und 2, nicht aber andere MKKs wie z. B. MKK3, 4 und 6 inhibieren (Alessi *et al.*, 1995; Favata *et al.*, 1998). Angesichts dieser hohen Spezifität der Inhibitoren ist es erstaunlich, daß sie pflanzliche MKKs inhibieren, die, sofern ihre Sequenz bekannt ist, wesentlich geringere Sequenzhomologien zu MEK1 und 2 besitzen als die oben genannten Säuger MKKs (Morris *et al.*, 1997). Deshalb wird abschließende Gewißheit über die Aussagekraft und Spezifität der Inhibitorexperimente erst gegeben sein, wenn die elicitorresponsiven MKKs isoliert worden sind und die in *In-Vivo*-Versuchen erhaltenen Ergebnisse mit *In-Vitro*-Experimenten korreliert werden können. Besonders aufschlußreich wird hier ein Vergleich der *in vitro* und *in vivo* bestimmten IC50-Werte sein.

4.8 Kotransformationsexperimente

Da im Petersiliesystem keine Möglichkeit besteht, *loss-of-function*-Mutanten der MAPK-Kaskade zu isolieren, wurde eine Kotransformationsstrategie entwickelt, in der der Einfluß der Überexpression inaktiver und aktiver MAPKs auf die Elicitorsignaltransduktion untersucht werden kann. Derartige transiente Überexpressionsexperimente mit dominant negativ interferierenden MAPKs haben wichtige Ergebnisse zu den MAPK-Kaskaden in Säugerzellkulturen geliefert (Sontag *et al.*, 1993; Kortenjann, *et al.*, 1994; Cowley *et al.*, 1994; Minden *et al.*, 1995; Mahani *et al.*, 1997). Die Überexpression inaktiver MAPKs kann dabei auf drei Ebenen mit einer endogenen MAPK-Kaskade interferieren: auf der Ebene der Aktivatoren, der Ebene der aktivierten MAPKs und der Ebene der Substrate.

Über die Aktivatoren pflanzlicher MAPKs ist wenig bekannt. Zwar sind zahlreiche MKKs und MKKKs kloniert worden, vor allem aus Arabidopsis, doch ihre Zuordnung zu den einzelnen MAPK-Kaskaden ist unbekannt (Mizoguchi *et al.*, 1997; Jouannic *et al.*, 1999a; Jouannic *et al.*, 1999b). Aus Tiersystemen und aus Hefe weiß man, daß die MAPK-Kaskaden in Komplexen organisiert sind, die aufgrund von spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkungen zusammenhalten, und in dieser Form subzellulär genau lokalisiert sind (Whitmarsh und Davis, 1998). Einige MAPK-Komplexe werden durch direkte Interaktionen der einzelnen Kinasen der MAPK-Kaskade zusammengehalten (Posas und Saito, 1997; Su *et al.*, 1997; Xu und Cobb, 1997), in anderen Systemen werden die MAPK-Module durch Adapterproteine organisiert (Elion, 1995; Whitmarsh *et al.*, 1998; Schaeffer *et al.*, 1998), die neben den Kinasen der MAPK-Kaskade auch andere Signalmoleküle binden und in den Signalprozeß integrieren können (Inoye *et al.*,

1997; Leeuw *et al.*, 1998; Feng *et al.*, 1998). Derartige Adapterproteine werden vor allem dort angetroffen, wo einzelne MKKs oder MKKKs in verschiedenen MAPK-Kaskaden involviert sind und erst durch die Zusammensetzung der einzelnen Signalkomplexe Signalspezifität gewährleistet wird (Gustin *et al.*, 1998). In diesen Fällen wird die zelluläre Antwort nicht dadurch bestimmt, welche MKK oder MKKK aktiviert wird, sondern in welchem Kontext diese Aktivierung erfolgt und welche MAPK am Ende der Kaskade induziert wird. Bei Überexpression einer inaktiven MAPK kann diese die endogene Kinase aus dem Signalkomplex verdrängen und so die Signalweiterleitung unterbrechen. Der Effekt kann jedoch auch unspezifisch sein, wenn eine überexprimierte MAPK aufgrund ihrer hohen Abundanz eine andere MAPK aus ihren Aktivator-komplexen verdrängt und somit einen Signalweg unterbricht, in den sie nicht involviert ist. Dann sollte die Inhibition des Signalweges jedoch unabhängig von der Aktivität der überexprimierten Kinase sein, da diese auch in aktivierter Form den gegebenen Signalweg blockiert.

Inaktive MAPKs können allerdings auch aufgrund ihrer Wechselwirkung mit aktivierten MAPKs eine MAPK-Kaskade negativ beeinflussen. Aus kristallographischen Untersuchungen und Mikroinjektionsstudien mit ERK2 ist bekannt, daß phosphoryliertes ERK2 Homodimere mit aktiviertem und Heterodimere mit nicht aktiviertem ERK2 bildet und daß diese phosphorylierungsinduzierte Dimerisierung notwendig für den Kerntransport der aktivierten Kinase ist (Canagarajah *et al.*, 1997; Khokhlathev *et al.*, 1998). Viele MAPK-Substrate wie z. B. Steroidrezeptoren, basische Helix-Loop-Helix-Proteine und Leucin-Zipper-Proteine bilden ebenfalls Dimere (Hunter und Karin, 1992; Karin 1995; Kallunki *et al.*, 1996) und werden möglicherweise bei einer einzigen Interaktion mit dem aktiven MAPK-Dimer phosphoryliert und aktiviert. Bei einem Überschuß an inaktiver MAPK bilden sich nach einem Stimulus vorwiegend hemiaktive Dimere, die zwar in den Kern transportiert werden, aber nur eine Untereinheit der Substrate phosphorylieren können (Khokhlathev *et al.*, 1998). Die daraus resultierende unvollständige Aktivierung der Substrate führt zu einer reduzierten Antwort der Zelle.

Ein drittes Modell, um den dominant negativen Effekt nicht aktiver MAPKs auf einen gegebenen Signalweg zu erklären, beruht auf der Beobachtung, daß einige MAPKs in inaktiver Form an ihre Substrate binden und dadurch denjenigen Signalweg, den sie nach einem geeigneten Stimulus aktivieren, bei Ausbleiben dieses Stimulus zusätzlich reprimieren. Die Hefe MAPK KSS1, die bei Stickstoffmangel filamentöses Wachstum von Hefezellen induziert, bindet beispielsweise in unphosphorylierter Form an den Transkriptionsfaktor STE12 und reprimiert dadurch unter nicht induzierenden Umweltbedingungen filamentöses Wachstum (Madhani *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998). In *kss1*-Nullmutanten wird bei Stickstoffmangel, obwohl der MAPK-Weg unterbrochen ist, filamentöses Wachstum über einen parallelen Signalweg ausgelöst. Bei Expression einer kinaseinaktiven Form von KSS1 in *kss1*-Nullmutanten erfolgt unter den gleichen Umweltbedingungen kein filamentöses Wachstum (Madhani *et al.*, 1997). Mutationen in KSS1, die die Bindung mit STE12 blockieren, lösen unter induzierenden Bedingungen Hyperfilamentation aus. Werden diese Mutationen gemeinsam mit Mutationen, die die Kinaseaktivität zerstören und für sich alleine genommen Filamentation unterdrücken, in *KSS1* eingeführt, so erfolgt filamentöses Wachstum

(Madhani *et al.*, 1997). Durch einen ähnlichen Mechanismus kann eine im Überschuß vorliegende inaktive MAPK an Substrate binden und dadurch die Signalweiterleitung durch aktivierte Kinasen blockieren.

Die Kotransformationsexperimente in Petersilieprotoplasten mit unterschiedlichen MPK3-Varianten zeigen, daß in Abhängigkeit von der Aktivität des überexprimierten MPK3 ein dominant negativer Effekt auf die elicitorstimulierte Expression eines elicitorresponsiven Reportergens ausgeübt wird. Überexpression von unmodifiziertem MPK3 und Überexpression einer nicht aktivierbaren Variante von MPK3 reduzieren die elicitorresponsive Expression des Reportergens *GUS*. Überexpression einer MPK3-Variante, die voraussichtlich langanhaltend aktiviert bleibt, hat keinen reduzierenden Einfluß auf die elicitorinduzierte Reporterexpression. Diese Ergebnisse, die bei Verwendung elicitorresponsiver *PR1.1*- und *PR2*-Promotorfragmente gefunden wurden, deuten darauf hin, daß die elicitorresponsive MAPK MPK3 an der Regulation von Transkriptionsfaktoren und an der Induktion der Genexpression nach Elicitierung beteiligt ist.

Der dominant negative Effekt der nicht modifizierten MPK3 läßt sich damit erklären, daß bei MPK3-Überexpression aller Voraussicht nach nur ein geringer Anteil des gesamten MPK3-Pools nach Elicitierung phosphoryliert und aktiviert wird. Durch die Überexpression der MAPKs in Petersilie wird vermutlich ihre subzelluläre Lokalisierung gestört, was die Aktivierung der falsch lokalisierten Kinasen verhindert. Eine solche Aufhebung der korrekten subzellulären Lokalisation bei MAPK-Überexpression wurde in vielen Systemen gefunden. So finden sich beispielsweise überexprimierte ERKs und p38 nicht nur im Cytoplasma sondern überwiegend im Kern, wo sie ansonsten erst nach Aktivierung lokalisiert sind (Lenormand *et al.*, 1993; Fukuda *et al.*, 1997). Zudem ist wahrscheinlich die Kapazität der stromaufwärts gelegenen Aktivatoren nicht ausreichend, um nach Stimulierung die Gesamtheit des überexprimierten MPK3 zu aktivieren. Untersuchungen in Säugerzellen haben gezeigt, daß MAPKK und MAPK oftmals im gleichen stöchiometrischen Verhältnis vorliegen, während wesentlich weniger MKKK präsent ist (Ferrell, 1996; Huang und Ferrell; 1996). Eine Signalamplifikation erfolgt deshalb bei der Aktivierung des MKK-Pools durch die wenig abundante MKKK, nicht aber auf der Stufe der MAPK. Bereits 10 min nach Elicitierung setzt in den Petersiliezellen die Deaktivierung des MAPK-Weges ein. Diese wird voraussichtlich durch Proteinphosphatasen vermittelt und ist auf allen Ebenen der Kaskade wirksam. Die resultierende, bis zu 4 h nach Elicitorzugabe nachweisbare MPK3-Aktivität wird deshalb eher durch das Gleichgewicht zwischen aktivierenden und deaktivierenden Komponenten bestimmt, insbesondere durch die Menge an MPK3-Phosphatasen und aktiver MPK3-Kinase, als durch die absolute Menge an MPK3. Ein Anstieg der MPK3-Menge resultiert deshalb aller Voraussicht nach nicht in einer Zunahme von aktiver sondern von inaktiver MPK3.

Die Überexpression unmodifizierter MPK3 führt deshalb wahrscheinlich dazu, daß nach Elicitierung ein kleiner Anteil des gesamten zellulären MPK3 aktiv ist, während der Überschuß inaktiv bleibt und durch die Bildung hemiaktiver Dimere und Konkurrenz um Substrat dominant negativ mit dem Signalweg interferiert. Dies könnten die Gründe

dafür sein, daß die Überexpression der unmodifizierten MPK3 qualitativ den gleichen negativen Effekt auf die Induktion des *PR1.1*- und *PR2*-Promotorfragments hat wie die Überexpression inaktiver MPK3.

Bei Überexpression von MPK3^{D-N} wird die Elicitorresponsivität der Zellen dahingegen nicht reduziert. Unter der Annahme, daß MPK3^{D-N} tatsächlich in der Interaktion mit deaktivierenden Phosphatasen gestört ist und dadurch nicht oder nur verzögert inaktiviert wird, ist bei dieser Isoform mit einer nicht transienten sondern lang anhaltend starken Aktivierung von MPK3 zu rechnen. Es wird also möglicherweise für Stunden das Niveau aktiver MPK3 gehalten, das ansonsten nur für 5-10 min präsent ist. Der Anteil aktiver MPK3 am gesamten MPK3-Pool ist dadurch lange Zeit viel höher als bei Überexpression der nicht modifizierten MPK3, was zu einer effizienten Phosphorylierung der MPK3-Substrate und einer Aktivierung des MPK3-abhängigen Signalwegs führt. Die Tatsache, daß die Aktivierung elicitorresponsiver Promotorfragmente bei MPK3-Überexpression von der Aktivität der überexprimierten MPK3-Varianten bestimmt wird, deutet darauf hin, daß MPK3 tatsächlich in die Regulation dieser Promotoren involviert ist und daß die gefundenen Effekte nicht auf einer unspezifischen Interaktion mit dem Elicitorsignalweg oder einer Interferenz mit einer anderen MAPK-Kaskade beruhen.

Auch die Überexpression unmodifizierter und inaktiver MPK1 und 2 interferiert mit dem Signalweg, der zur *PR1.1*- und *PR2*-Transkription führt - allerdings schwächer als bei Verwendung der entsprechenden MPK3-Varianten,. Die D-N-Mutation kompensiert auch bei diesen Kinasen den reduzierenden Effekt. Zwar konnte eine Elicitoraktivierung, wie sie für MPK3 gezeigt wurde, für MPK1 und 2 nicht nachgewiesen werden, doch deuten die in Abschnitt 4.5 diskutierten Ergebnisse auf die Möglichkeit hin, daß zumindest eine dieser Kinasen nach Elicitierung aktiviert wird und identisch mit der elicitorresponsiven 44-kDa-MAPK ist. Die Resultate der Kotransformationsexperimente lassen zwei mögliche Schlußfolgerungen zu: Entweder haben MPK1 und 2 mit MPK3 überlappende Aktivatoren und Substrate und können so im gleichen Signalweg funktionieren, oder die Aktivierung von Kinasen aus beiden Gruppen ist für die vollständige Induktion der *PR1.1*- und *PR2*-Expression notwendig. In jedem Fall deuten die Ergebnisse der Kotransformationsexperimente darauf hin, daß MPK3 und vielleicht auch MPK1 und 2 eine zentrale Funktion bei der transkriptionellen Aktivierung elicitorresponsiver Gene haben. MPK4-Überexpression interferiert dahingegen nicht mit der elicitorstimulierten Aktivierung des *PR1.1*- und *PR2*-Promotors. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, daß MPK4 und 5 nicht in die Elicitorantwort impliziert sind.

Um die Interpretation der Kotransformationsexperimente experimentell abzusichern, ist es notwendig, in Zukunft das Aktivierungsprofil der überexprimierten MAPKs nach Elicitierung zu verfolgen. Dazu muß durch Immunpräzipitations-Kinaseexperimente verifiziert werden, ob die D-N-Mutante nach Elicitierung die postulierte langanhaltende Aktivierung zeigt. Dafür ist jedoch eine Epitopmarkierung der Kinasen erforderlich, wie sie in der vorliegenden Arbeit lediglich für die MPK1-Konstrukte vorgenommen wurde, weil in den Transformationsexperimenten nur 10-20% der Protoplasten transformiert werden. Infolgedessen liegt ein hohes Niveau endogener MAPKs vor, was eine

Interpretation von Immunpräzipitationsexperimenten mit MAPK-Antikörpern unmöglich macht.

Ein weiteres wichtiges Hilfsmittel für die Charakterisierung der elicitorresponsiven MAPKs in Petersilie wären *gain-of-function*-Versionen von Komponenten der Elicitor-MAPK-Kaskade. Da konstitutiv kinaseaktive Versionen der MAPKs nicht bekannt sind und nach Analyse der kristallographisch ermittelten Struktur der aktivierten und nicht aktivierten MAPKs nicht durch Deletionen oder einzelne Aminosäure-Austausche hergestellt werden können (Cobb und Goldsmith, 1995; Canagarajah *et al.*, 1997), müssten derartige *gain-of-function*-Versionen von den MKKs oder den MKKKs hergestellt werden. Die elicitorresponsiven MKKs und MKKKs sind bisher jedoch noch nicht identifiziert worden, und eine konstitutiv aktive Version der humanen MEK1 erwies sich im Protoplastensystem als inaktiv. Das Protoplastensystem bietet sich jedoch als Hilfsmittel an, um elicitorresponsive MKKs und MKKKs zu identifizieren. Dazu müssten durch Deletionen und Punktmutationen in bekannten pflanzlichen MKKKs und MKKs, beispielsweise den Arabidopsis-Kinasen, konstitutiv aktive Varianten hergestellt werden. Anschließend könnte man mit verschiedenen Reporterkonstrukten testen, ob die aktiven Kinasen in der Lage sind, elicitorunabhängig Reporterogenaktivierung zu induzieren.

Schließlich sollten in zukünftigen Experimenten Reporterkonstrukte mit den Promotoren von Genen benutzt werden, die schneller nach Elicitierung transkribiert werden als *PR1.1* und *PR2*. Die Transkripte beider Gene sind erst 1-2 h nach Elicitierung nachweisbar (van de Löcht *et al.*, 1990; Rushton *et al.*, 1996), und *PR1.1*-Transkription verlangt die Expression zusätzlicher Gene, die vermutlich für Transkriptionsfaktoren kodieren (T. Eulgem und I. Somssich, persönliche Mitteilung). Ein schnell induziertes Petersiliegen ist *WRKY1*, dessen Transkription bereits 15 min nach Elicitierung unabhängig von Proteinsynthese induziert wird. Der *WRKY1*-Promotor, der mittlerweile gut untersucht ist, stellt damit einen putativen Zielpromotor für Transkriptionsfaktoren dar, deren Aktivität unmittelbar durch elicitorresponsive MAPKs reguliert wird, und sollte in Zukunft in Kotransformationsexperimenten getestet werden. Vielleicht findet sich hier ein Bindeglied zwischen cytoplasmatischer Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation der Genexpression.

4.9 Identifizierung zusätzlicher Signalkomponenten durch einen Hefe-Zwei-Hybrid-Screen

Der genetische Screen nach interagierenden Proteinen mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems bietet prinzipiell die Möglichkeit, Regulatoren und Substrate des MAPK-Weges zu identifizieren. So sind beispielsweise für MKKKs, MKKs, Adapterproteine, Phosphatasen und Transkriptionsfaktoren Protein-Protein-Wechselwirkungen mit MAPKs beschrieben und z. T. auch mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems nachgewiesen worden (Printen und Sprague, 1994; Zanke *et al.*, 1996; Whitmarsh *et al.*, 1998; Bardwell *et al.*, 1996; Madhani *et al.*, 1997; Bardwell *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit der Erstellung einer Petersilie-cDNA-Bank und der Etablierung geeigneter Screeningbedingungen die Grundlagen für ein Screening nach Substraten und Regulatoren der elicitorresponsiven MAPKs gelegt. Mit MPK1 wurden 2×10^6 Primärtransformanten gescreent und bereits 2 positive Klone identifiziert. Da die Bank eine Komplexität von 3×10^6 unabhängigen Klonen aufweist, sollten für eine vollständige Analyse der Bank noch mindestens 4×10^6 Transformanten untersucht werden. In Zukunft sollte die Bank natürlich auch mit MPK3 und - wenn Elicitorresponsivität gezeigt werden kann - auch mit MPK2 durchsucht werden.

Eine Protein-Protein-Interaktion positiver Zwei-Hybrid-Klone mit dem "bait"-Protein, die im Hefesystem gezeigt wurde, muß zusätzlich *in vitro* verifiziert werden (Bartel *et al.*, 1993b; Wong *et al.*, 1997). Für die beiden mit MPK1 isolierten Klone 2H1 und 2H4 steht dieser Nachweis noch aus, ist aber, da bakteriell exprimiertes MPK1 vorliegt, einfach durchzuführen. Da 2H1 ein putatives Kernlokalisierungssignal besitzt, sollte, wenn sich die Interaktion mit MPK1 *in vitro* bestätigen läßt, ein Gesamtlängenklon isoliert werden, der möglicherweise Aufschlüsse über eine Funktion von 2H1 zuläßt. Die isolierte 2H4-cDNA enthält nach Vergleichen mit Homologen in anderen Pflanzen und Bakterien vermutlich fast den gesamten offenen Leserahmen der entsprechenden mRNA. Aus ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz läßt sich keine Funktion ableiten, was eine funktionelle Analyse dieses Gens extrem schwierig macht. Da das Gen in allen Organisationsformen gefunden wird, kann jedoch angenommen werden, daß es eine essentielle Funktion in den unterschiedlichen Organismen erfüllt. Die Verifikation dieser Hypothese und eine Funktionsanalyse ließen sich am einfachsten durch die Analyse von *Knock-Out*-Mutanten in Bakterien oder Hefen überprüfen.

4.10 Ausblick

Zukünftige Arbeiten über die elicitorresponsiven MAP-Kinasen in Petersilie sollten die Charakterisierung der 40- und der 44-kDa MAPK, die Identifizierung von Regulatoren und Substraten von MPK3 und die weitere Aufklärung der Funktion der MAPKs in der Elicitorsignaltransduktion zum Ziel haben.

Da die 40-kDa-MAPK wahrscheinlich einer bisher nicht beschriebenen Untergruppe pflanzlicher MAPK angehört, führt der direkteste Weg zu ihrer Identifizierung über die Aufreinigung des Proteins. Dabei kann die Kreuzreaktion mit dem anti-ActiveTM-MAPK-Antikörper sowohl als aktivitätsunabhängiges Reinigungskriterium als auch für eine sehr effiziente Immun-Affinitätschromatographie genutzt werden. Durch Herstellung eines MPK2-spezifischen Serums läßt sich in Zukunft die Frage beantworten, ob es sich bei der 44-kDa-Kinase um MPK2 handelt.

Zur Identifizierung von Regulatoren und Substraten von MPK3 bieten sich vor allem 3 verschiedene Wege an. Die in der vorliegenden Arbeit erstellte Hefe-Zwei-Hybrid cDNA-Bank sollte mit einem MPK3-Konstrukt unter den etablierten Screeningbedingungen nach Interaktionspartnern durchsucht werden. Positive Klone aus

diesem Screen können nach bakterieller Expression in Kopräzipitationsexperimenten auf *In-Vitro*-Interaktion mit bakteriell exprimiertem MPK3 getestet werden. Sollten auf diesem Weg potentielle Substrate der MAPK gefunden werden, so könnten diese in *In-Vitro*-Kinaseexperimenten mit immunpräzipitierter aktiver MPK3 untersucht werden. MKKs oder Proteinphosphatasen, die auf diesem Weg isoliert werden, können in *In-Vitro*-Experimenten bezüglich ihres Einflusses auf die Aktivität aktiver bzw. inaktiver MPK3 getestet werden. Ein anderer Ansatz, um Substrate von MPK3 zu isolieren, besteht im Screening einer Petersilieexpressions-cDNA-Bank mit immunpräzipitierter aktiver MPK3 und [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (Fukunaga und Hunter, 1997). *In-Vitro*-Substrate, die auf diesem Weg identifiziert werden, ließen sich in der Folge in *In-Vivo-Labeling*-Studien und Kopräzipitationsexperimenten näher charakterisieren. Eine weitere Möglichkeit, Interaktionspartner von MPK3 zu isolieren, bieten Kopräzipitationsexperimente mit dem sehr spezifischen P82-Serum. Aus Kernextrakten lassen sich auf diesem Weg unter Umständen mit MPK3 interagierende Transkriptionsfaktoren aufreinigen, aus der cytoplasmatischen Fraktion Komponenten der MAPK-Kaskade.

Wie bereits in Kapitel 4.8 diskutiert wurde, sollte in Zukunft durch Verwendung des *WRKY1*-Promotors in Kotransformationsexperimenten festgestellt werden, ob die Aktivitäten von Transkriptionsfaktoren, die die Expression dieses unmittelbar elicitorinduzierten Gens aktivieren, durch MAPKs reguliert werden. Wenn dies der Fall ist, sollte versucht werden die Faktoren zu klonieren, um den Mechanismus ihrer Regulation durch MAPKs näher charakterisieren zu können. Dies würde entscheidend zum Verständnis des Wechselspiels zwischen cytosolischer Signaltransduktion und transkriptioneller Regulation der Genexpression beitragen.